ВЕСТНИК РОССИЙСКОГО ГОСУДАРСТВЕННОГО МЕДИЦИНСКОГО УНИВЕРСИТЕТА

НАУЧНЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ РНИМУ ИМ. Н. И. ПИРОГОВА

ГЛАВНЫЙ РЕДАКТОР Денис Ребриков, д. б. н.

ЗАМЕСТИТЕЛЬ ГЛАВНОГО РЕДАКТОРА Александр Эттингер, д. м. н.

РЕДАКТОРЫ Валентина Гейдебрехт, Лилия Егорова

ТЕХНИЧЕСКИЙ РЕДАКТОР Нина Тюрина

ПЕРЕВОДЧИКИ Екатерина Третьякова, Вячеслав Витюк

ДИЗАЙН И ВЕРСТКА Марина Доронина

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ

В. В. Белоусов, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Р. Богомильский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. К. Боженко, д. м. н., к. б. н., профессор (Москва, Россия)
Н. А. Былова, к. м. н., доцент (Москва, Россия)
Р. Р. Гайнетдинов, к. м. н. (Санкт-Петербург, Россия)
Е. К. Гинтер, академик РАН, д. б. н. (Москва, Россия)
А. В. Гудков, PhD, DSc (Буффало, США)
Н. В. Гуляева, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Е. И. Гусев, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Н. Даниленко, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
И. И. Затевахин, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Ю. Г. Кжышковска, д. б. н., профессор (Гейдельберг, Германия)
Ю. В. Котелевцев, к. х. н. (Москва, Россия)
М. А. Лебедев, PhD (Дарем, США)
Н. Е. Мантурова, д. м. н. (Москва, Россия)
С. А. Мошковский, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
Д. Б. Мунблит, MSc, PhD (Лондон, Великобритания)
В. В. Негребецкий, д. х. н., профессор (Москва, Россия)
А. А. Новиков, д. б. н. (Москва, Россия)
Н. В. Полунина, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. В. Порядин, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. М. Савельева, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. Ф. Семиглазов, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
Т. А. Славянская, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
А. Спаллоне, д. м. н., профессор (Рим, Италия)
В. И. Стародубов, академик РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
В. А. Степанов, член-корр. РАН, д. б. н., профессор (Томск, Россия)
С. В. Сучков, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Х. П. Тахчиди, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Г. Е. Труфанов, д. м. н., профессор (Санкт-Петербург, Россия)
О. О. Фаворова, д. б. н., профессор (Москва, Россия)
М. Л. Филипенко, к. б. н., в. н. с. (Новосибирск, Россия)
Р. Н. Хазипов, д. м. н. (Марсель, Франция)
Н. Л. Шимановский, член-корр. РАН, д. м. н., профессор (Москва, Россия)
Л. Н. Шишкина, д. б. н., с. н. с. (Новосибирск, Россия)
Р. И. Якубовская, д. б. н., профессор (Москва, Россия)

ПОДАЧА РУКОПИСЕЙ http://vestnikrgmu.ru/login
ПЕРЕПИСКА С РЕДАКЦИЕЙ editor@vestnikrgmu.ru
СОТРУДНИЧЕСТВО manager@vestnikrgmu.ru
АДРЕС РЕДАКЦИИ ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997

Журнал включён в Scopus с 2017 года

Журнал включён в WoS с 2018 года

Индекс Хирша (h^5) журнала по оценке Google Scholar: 3

Журнал включён в РИНЦ. IF 2017: 0,326

Журнал включён в Перечень 27.01.2016 (№ 1760)

Здесь находится открытый архив журнала

DOI выпуска: 10.24075/vrgmu.2018-06

Свидетельство о регистрации средства массовой информации № 012769 от 29 июля 1994 г.

Учредитель и издатель — Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова (Москва, Россия)

Журнал распространяется по лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International www.creativecommons.org

Подписано в печать 10.01.2019
Тираж 100 экз. Отпечатано в типографии Print.Formula
www.print-formula.ru

BULLETIN OF RUSSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY

BIOMEDICAL JOURNAL OF PIROGOV RUSSIAN NATIONAL RESEARCH MEDICAL UNIVERSITY

EDITOR-IN-CHIEF Denis Rebrikov, DSc

DEPUTY EDITOR-IN-CHIEF Alexander Oettinger, DSc

EDITORS Valentina Geidebrekht, Liliya Egorova

TECHNICAL EDITOR Nina Tyurina

TRANSLATORS Ekaterina Tretiyakova, Vyacheslav Vityuk

DESIGN AND LAYOUT Marina Doronina

EDITORIAL BOARD

Belousov VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bogomilskiy MR, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Bozhenko VK, DSc, CSc, professor (Moscow, Russia)
Bylova NA, CSc, docent (Moscow, Russia)
Gainetdinov RR, CSc (Saint-Petersburg, Russia)
Ginter EK, member of RAS, DSc (Moscow, Russia)
Gudkov AV, PhD, DSc (Buffalo, USA)
Gulyaeva NV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Gusev EI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Danilenko VN, DSc, professor (Moscow, Russia)
Zatevakhin II, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Kzyshkowska YuG, DSc, professor (Heidelberg, Germany)
Kotelevtsev YuV, CSc (Moscow, Russia)
Lebedev MA, PhD (Darem, USA)
Manturova NE, DSc (Moscow, Russia)
Moshkovskii SA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Munblit DB, MSc, PhD (London, Great Britain)
Negrebetsky VV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Novikov AA, DSc (Moscow, Russia)
Polunina NV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Poryadin GV, corr. member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Savelieva GM, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Semiglazov VF, corr. member of RAS, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Slavyanskaya TA, DSc, professor (Moscow, Russia)
Spallone A, DSc, professor (Rome, Italy)
Starodubov VI, member of RAS, DSc, professor (Moscow, Russia)
Stepanov VA, corr. member of RAS, DSc, professor (Tomsk, Russia)
Takhchidi KhP, corr.member of RAS, DSc (medicine), professor (Moscow, Russia)
Suchkov SV, DSc, professor (Moscow, Russia)
Trufanov GE, DSc, professor (Saint-Petersburg, Russia)
Favorova OO, DSc, professor (Moscow, Russia)
Filipenko ML, CSc, leading researcher (Novosibirsk, Russia)
Khazipov RN, DSc (Marsel, France)
Shimanovskii NL, corr. member of RAS, Dsc, professor (Moscow, Russia)
Shishkina LN, DSc, senior researcher (Novosibirsk, Russia)
Yakubovskaya RI, DSc, professor (Moscow, Russia)

SUBMISSION http://vestnikrgmu.ru/login?lang=en
CORRESPONDENCE editor@vestnikrgmu.ru
COLLABORATION manager@vestnikrgmu.ru
ADDRESS ul. Ostrovityanova, d. 1, Moscow, Russia, 117997

Indexed in Scopus since 2017

Indexed in WoS since 2018

Five-year h-index is 3

Indexed in RSCI. IF 2017: 0,326

Listed in HAC 27.01.2016 (no. 1760)

Open access to archive

Issue DOI: 10.24075/brsmu.2018-06
The mass media registration certificate no. 012769 issued on July 29, 1994
Founder and publisher is Pirogov Russian National Research Medical University (Moscow, Russia)
The journal is distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License www.creativecommons.org

Approved for print 10.01.2019
Circulation: 100 copies. Printed by Print.Formula
www.print-formula.ru

Содержание
Contents

ОБЗОР 5

Адресная доставка лекарственных нанопрепаратов в применении к моделям рака на доклиническом этапе исследований
С. Марчио, Ф. Буссолино

Targeted nanomedicines for applications in preclinical cancer models
Serena Marchio, Federico Bussolino

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 15

Исследование свойств трехмерной клеточной модели опухоли с использованием нанофотосенсибилизатора в качестве новой предклинической модели
Ю. С. Маклыгина, И. Д. Романишкин, А. В. Рябова, И. В. Яковец, Л. Болотин, В. Б. Лощенов

A novel spheroid model for preclinical intercellular nanophotosensitizer-mediated tumor study
Maklygina YuS, Romanishkin ID, Ryabova AV, Yakavets IV, Bolotin L, Loschenov VB

МНЕНИЕ 22

Магнитно-резонансная томография для персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки наноформуляций противоопухолевых препаратов
В. А. Науменко, А. С. Гаранина, С. С. Водопьянов, А. А. Никитин, А. О. Преловская, Е. И. Демихов, М. А. Абакумов, А. Г. Мажуга, В. П. Чехонин

Magnetic resonance imaging for predicting personalized antitumor nanomedicine efficacy
Naumenko VA, Garanina AS, Vodopyanov SS, Nikitin AA, Prelovskaya AO, Demikhov EI, Abakumov MA, Majouga AG, Chekhonin VP

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 27

Молекулярная природа ГКР-спектров суспензии *E. coli* при длинах волн возбуждения 532 и 785 нм с использованием золей наночастиц серебра в качестве ГКР-субстратов
Е. А. Дурович, Е. Г. Евтушенко, О. В. Сенько, Н. А. Степанов, Е. Н. Ефременко, А. В. Еременко, И. Н. Курочкин

Molecular origin of surface-enhanced Raman spectra of *E. coli* suspensions excited at 532 and 785 nm using silver nanoparticle sols as SERS substrates
Durovich EA, Evtushenko EG, Senko OV, Stepanov NA, Efremenko EN, Eremenko AV, Kurochkin IN

МНЕНИЕ 35

Разработка липосомальных форм лекарственных препаратов: методы оценки и показатели качества
Е. В. Мельникова, Д. В. Горячев, А. А. Чапленко, М. А. Водякова, А. Р. Сайфутдинова, В. А. Меркулов

Development of liposomal drug formulations: quality attributes and methods for quality control
Melnikova EV, Goryachev DV, Chaplenko AA, Vodyakova MA, Sayfutdinova AR, Merkulov VA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 43

Липидоподобные наночастицы оксида железа как платформа для доставки нуклеиновых кислот в печень
В. И. Уварова, Т. Р. Низамов, М. А. Абакумов, С. С. Водопьянов, Т. О. Абакумова, И. В. Салтыкова, П. С. Могильников, И. В. Щетинин, А. Г. Мажуга

Lipidoid iron oxide nanoparticles are a platform for nucleic acid delivery to the liver
Uvarova VI, Nizamov TR, Abakumov MA, Vodopyanov SS, Abakumova TO, Saltykova IV, Mogilnikov PS, Shchetinin IV, Majouga AG

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 53

Наночастицы способны направлять трансплантированные мезенхимальные стволовые клетки в посттравматический свищ у крыс с повреждениями спинного мозга
Чао Чжан, А. Ю. Морозова, В. П. Баклаушев, И. Л. Губский, П. А. Мельников, А. Н. Габашвили, Гуовен Ванг, Лили Ли, Хайсяо У, Ксин Ванг, В. П. Чехонин

Nanoparticles guided precise transplantation of varying numbers of mesenchymal stem cells into post–traumatic syrinx in spinal cord injury rat
Chao Zhang, Morozova AY, Baklaushev VP, Gubsky IL, Melnikov PA, Gabashvily AN, Guowen Wang, Lili Li, Haixiao Wu, Xin Wang, Chekhonin VP

МНЕНИЕ 62

Перспективные методы неинвазивной медицинской диагностики с использованием наноматериалов: спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния в исследовании клеток, клеточных органелл, маркеров нейромедиаторного обмена
Е. А. Гудилин, А. А. Семенова, О. Е. Еремина, Н. А. Браже, Е. А. Гудилина, Т. Ю. Данзанова, Г. В. Максимов, И. А. Веселова

Promising methods for noninvasive medical diagnosis based on the use of nanoparticles: surface-enhanced Raman spectroscopy in the study of cells, cell organelles and neurotransmitter metabolism markers
Goodilin EA, Semenova AA, Eremina OE, Brazhe NA, Goodilina EA, Danzanova TYu, Maksimov GV, Veselova IA

МНЕНИЕ 74

Математическое прогнозирование параметров опухоль-селективного накопления парамагнитных наночастиц клетками ретинобластомы
Р. Дж. Йохансен, А. А. Бухвостов, К. В. Ермаков, Д. А. Кузнецов

Towards a computational prediction for the tumor selective accumulation of paramagnetic nanoparticles in retinoblastoma cells
Johansen RJ, Bukhvostov AA, Ermakov KV, Kuznetsov DA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 80

Наноструктурированный фотосенсибилизатор на основе тетракатионного производного бактериохлорина для антибактериальной фотодинамической терапии
Г. А. Меерович, Е. В. Ахлюстина, И. Г. Тиганова, Е. А. Макарова, Н. И. Филипова, И. Д. Романишкин, Н. В. Алексеева, Е. А. Лукьянец, Ю. М. Романова, В. Б. Лощенов

Nanostructured photosensitizer based on a tetracationic derivative of bacteriochlorin for antibacterial photodynamic therapy
Meerovich GA, Akhlyustina EV, Tiganova IG, Makarova EA, Philipova NI, Romanishkin ID, Alekseeva NV, Lukyanets EA, Romanova YuM, Loschenov VB

МНЕНИЕ 86

Наночастицы золота для диагностики и терапии онкологических заболеваний
П. Б. Курапов, Е. Ю. Бахтенко

Gold nanoparticles in the diagnosis and treatment of cancer
Kurapov PB, Bakhtenko EYu

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 94

Наночастицы на основе гидроксиапатита и порфиринфуллерена для диагностического и терапевтического применения парамагнитных ионов и радионуклидов
М. А. Орлова, А. Л. Николаев, Т. П. Трофимова, А. П. Орлов, А. В. Северин, С. Н. Калмыков

Hydroxyapatite and porphyrin-fullerene nanoparticles for diagnostic and therapeutic delivery of paramagnetic ions and radionuclides
Orlova MA, Nikolaev AL, Trofimova TP, Orlov AP, Severin AV, Kalmykov SN

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 103

Исследование коллоидных квантовых точек $AgInS_2$/ZnS в качестве флуоресцентных меток для тераностики: физические свойства, биораспределение и биосовместимость
М. С. Истомина, Н. А. Печникова, Д. В. Королев, Е. И. Почкаева, Д. С. Мазинг, М. М. Галагудза, В. А. Мошников, Е. В. Шляхто

ZAIS-based colloidal QDs as fluorescent labels for theranostics: physical properties, biodistribution and biocompatibility
Istomina MS, Pechnikova NA, Korolev DV, Pochkayeva EI, Mazing DS, Galagudza MM, Moshnikov VA, Shlyakhto EV

МНЕНИЕ 111

Применение в наномедицине и фармакологии наночастиц металлов и их неорганических соединений, полученных межфазным и контактным взаимодействием
С. А. Воробьева, С. Э. Ржеусский

Nanoprticles of metals and their inorganic compounds obtained through interphase and redox-transmetalation interaction: application in medicine and pharmacology
Vorobyova SA, Rzheussky SE

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 116

Применение полимерных коллоидных носителей для таргетной доставки мозгового трофического фактора через гемато-энцефалический барьер при экспериментальном паркинсонизме
М. Ю. Капитонова, Р. Н. Аляутдин, Р. В. А. Л. Ван Шазли, М. Н. К. Нор-Ашикин, А. Ахмад, С. Норита, С. С. Дыдыкин

Application of nanoscale polymer colloid carriers for targeted delivery of the brain-derived neurotrophic factor through the blood-brain barrier in experimental parkinsonism
Kapitonova MYu, Alyautdin RN, Wan-Syazli RWAL, Nor-Ashikin MNK, Ahmad A, Norita S, Dydykin SS

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 123

Экспериментальные исследования дендримерной наноконструкции с RGD-пептидом для радионуклидной терапии онкологических заболеваний
Ю. В. Стукалов, Е. Ю. Григорьева, А. В. Смирнова, А. А. Липенгольц, И. Ю. Кубасова, Н. В. Позднякова, М. И. Лукашина

Experimental study of dendrimer-based nanoparticles with RGD-peptide for anticancer radionuclide therapy
Stukalov YuV, Grigorieva EYu, Smirnova AV, Lipengolts AA, Kubasova IYu, Pozdniakova NV, Lukashina MI

МНЕНИЕ 130

Лекарственные системы на основе поли-3-оксиалканоатов: микро- и наноструктура
А. П. Бонарцев, Г. А. Бонарцева, В. В. Воинова, М. П. Кирпичников, К. В. Шайтан

Poly(3-hydroxyalkanoate)-based drug formulations: the micro- and nanostructure
Bonartsev AP, Bonartseva GA, Voinova VV, Kirpichnikov MP, Shaitan KV

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 135

Использование магнитных наночастиц оксида железа сферической и кубической форм для доставки доксорубицина в клетки линии карциномы молочной железы мыши 4T1
Т. Р. Низамов, А. С. Гаранина, В. И. Уварова, В. А. Науменко, И. В. Щетинин, А. Г. Савченко

The use of iron oxide magnetic nanospheres and nanocubes for targeted doxorubicin delivery into 4T1 mouse breast carcinoma cells
Nizamov TR, Garanina AS, Uvarova VI, Naumenko VA, Schetinin IV, Savchenko AG

МНЕНИЕ 145

Использование передовых технологий для наномедицины: получение многофункциональных «волшебных пуль»
К. Мартина, Л. Серпе, Р. Кавалли, Д. Кравотто

Enabling Technologies for the Preparation of Multifunctional “Bullets” for Nanomedicine
Martina K, Serpe L, Cavalli R, Cravotto G

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 157

Определение активных форм кислорода в биологических жидкостях с помощью платинового наноэлектрода амперометрическим методом
А. Н. Ванеев, А. В. Алова, А. С. Ерофеев, П. В. Горелкин, А. Д. Алексашкин, О. В. Безнос, Н. Б. Чеснокова, О. А. Кост, А. Г. Мажуга, Ю. Е. Корчев, Н. Л. Клячко

Detecting reactive oxygen species in biological fluids by platinum nanoelectrode applying amperometric method
Vaneev AN, Alova AV, Erofeev AS, Gorelkin PV, Aleksashkin AD, Beznos OV, Chesnokova NB, Kost OA, Majouga AM, Korchev Y, Klyachko NL

МНЕНИЕ 164

Использование моноклональных антител для терапии аутоиммунных заболеваний
Е. М. Мерзляк, Д. С. Сырко, Е. А. Мусаткина, М. Израельсон

The use of monoclonal antibodies in autoimmunity treatment
Merzlyak EM, Syrko DS, Musatkina EA, Israelson MA

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 170

Экспрессия химерного антигенного рецептора в натуральных киллерах линии NK-92 путем трансдукции лентивирусными частицами, псевдотипированными поверхностными гликопротеинами вакцинного штамма вируса кори
Ю. Е. Кравченко, Д. И. Гагаринская, Е. И. Фролова, С. П. Чумаков

Chimeric antigen receptor expression in natural killer cell line NK-92 by transduction with lentiviral particles pseudotyped with the surface glycoproteins of the measles virus vaccine strain
Kravchenko YE, Gagarinskaya DI, Frolova EI, Chumakov SP

МНЕНИЕ 177

Современное состояние хирургии аневризм: «промикрохирургический» взгляд
А. В. Дубовой, А. В. Бервицкий, А. Спаллоне

Modern Aneurysm Surgery: a pro-open surgery view
Dubovoy AV, Bervitskiy AV, Spallone A

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ 183

Идентификация BRCA1/2-мутаций при раке молочной железы с применением технологии высокопроизводительного секвенирования
И. Ф. Стеценко, А. Ю. Красненко, У. С. Станоевич, А. А. Мещеряков, И. К. Воротников, О. С. Дружиловская, В. А. Белова, А. В. Чуров

Identification of BRCA1/2 mutations in breast cancer patients by next-generation sequencing
Stetsenko IF, Krasnenko AYu, Stanoevich US, Mescheryakov AA, Vorotnikov IK, Druzhilovskaya OS, Belova VA, Churov AV

АДРЕСНАЯ ДОСТАВКА ЛЕКАРСТВЕННЫХ НАНОПРЕПАРАТОВ В ПРИМЕНЕНИИ К МОДЕЛЯМ РАКА НА ДОКЛИНИЧЕСКОМ ЭТАПЕ ИССЛЕДОВАНИЙ

С. Марчио[1,2] ✉, Ф. Буссолино[1,2]

[1] Кафедра онкологии, Туринский университет, Кандиоло, Италия

[2] Институт онкологии (FPO-IRCCS), Кандиоло, Италия

Несмотря на значительные успехи в терапии рака, большое число пациентов пока не может быть излечено. Представленные в обзоре стратегии преодоления этой проблемы активно разрабатываются по двум направлениям: 1) оптимизация диагностических протоколов для обнаружения опухолей на ранних стадиях; 2) разработка персонализированных средств терапии для увеличения эффективности и селективности лечения. Проводимые в последнее время исследования были направлены на рациональное внедрение обоих подходов, а их результаты внесли вклад в разработку нанопрепаратов, которые можно адресно доставлять к пораженным тканям в целях тераностики опухолей на доклинических моделях. Эти модульные наносистемы достаточно гибки и позволяют объединить визуализацию и таргетирование лекарств для применения в онкологии. Они могут служить базой для дальнейшего усовершенствования методов лечения рака.

Ключевые слова: наночастицы, адресная доставка лекарств, доклинические исследования, нанофармакология, онкология, тераностика

✉ **Для корреспонденции:** Серена Марчио
Институт исследований и лечения рака, Университет Турина, 142 Km 3.95, Кандиоло, Италия, 10060; serena.marchio@ircc.it

Статья получена: 29.06.2018 **Статья принята к печати:** 21.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.081

TARGETED NANOMEDICINES FOR APPLICATIONS IN PRECLINICAL CANCER MODELS

Serena Marchiò[1,2] ✉, Federico Bussolino[1,2]

[1] Department of Oncology; University of Turin; Candiolo, Italy

[2] Candiolo Cancer Institute-FPO-IRCCS; Candiolo, Italy

Despite substantial advancements in cancer management, a considerable proportion of patients cannot yet be cured. Strategies to address this open medical need are actively pursued and include two main approaches: 1) optimizing diagnostic protocols to detect tumors at early stages, and 2) designing personalized therapies to increase efficiency and selectivity of clinical interventions. Our recent work has been directed to a rationally-designed implementation of both approaches. Particularly, we have contributed to the development of nanomedicines that can be targeted to diseased tissues for theranostic purposes in preclinical models of human cancers. Such modular nanoscale systems proved to be versatile platforms to combine imaging and drug delivery for applications in the oncological field and could be a basis for future improvements.

Keywords: theranostic, cancer, targeted nanomedicines, preclinical models

✉ **Correspondence should be addressed:** Serena Marchiò
Institute for Cancer Research and Treatment, University of Torino, 142 Km 3.95, Candiolo, Italy, 10060; serena.marchio@ircc.it

Received: 29.06.2018 **Accepted:** 21.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.081

Ранняя диагностика и эффективная терапия рака крайне важны для снижения заболеваемости и смертности от этой болезни. Чтобы добиться этих целей, нужно изучать и разрабатывать: 1) специфичные для каждой опухоли молекулы, которые могут служить как диагностическими маркерами, так и целями для таргетирования; 2) средства визуализации и доставки лекарств в пораженные участки тела, позволяющие эффективно проводить терапевтическое вмешательство, не затрагивая здоровые ткани. Несмотря на то что эти два подхода известны и широко обсуждаются, развитие персонализированной медицины идет довольно медленно, в частности из-за наличия малого числа подходящих молекулярных маркеров. Например, из ~1500 белков, предложенных в качестве биомаркеров рака в 2000–2010 гг, не более 20 были допущены к исследованиям Управлением по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов США (Food and Drug Administration, FDA) [1]. В то же время применение нанотехнологий в медицине (наномедицина) оказывает огромное влияние на развитие терапии рака нового поколения, как показывает количество проводимых клинических и доклинических испытаний с использованием этих технологий [2, 3]. Нанопрепарат — это терапевтический, диагностический или комбинированный (тераностический = терапевтический + диагностический) агент, помещенный внутрь наночастицы (НЧ) или присоединенный к ней. НЧ способствует лучшему биораспределению агента, повышает его эффективность или понижает токсичность. В ходе работы были идентифицированы новые биомаркеры и изучено применение нанопрепаратов таргетированной доставки для визуализации рака (флуоресцентные НЧ) и его терапии (содержащие лекарства липосомы) на моделях для доклинических исследований. В настоящем обзоре мы кратко описываем основные результаты этой работы.

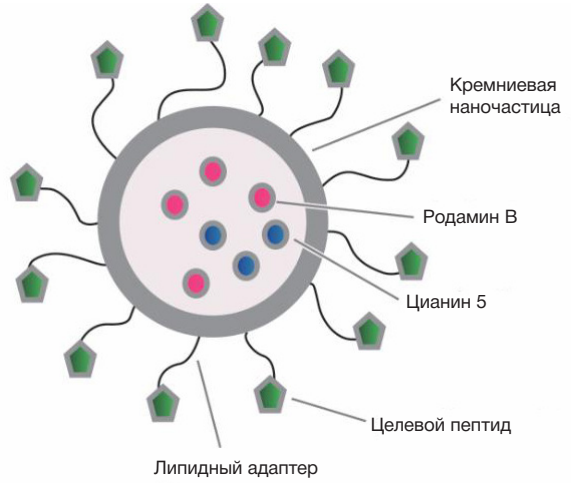
Прицельная молекулярная визуализация метастатического колоректального рака

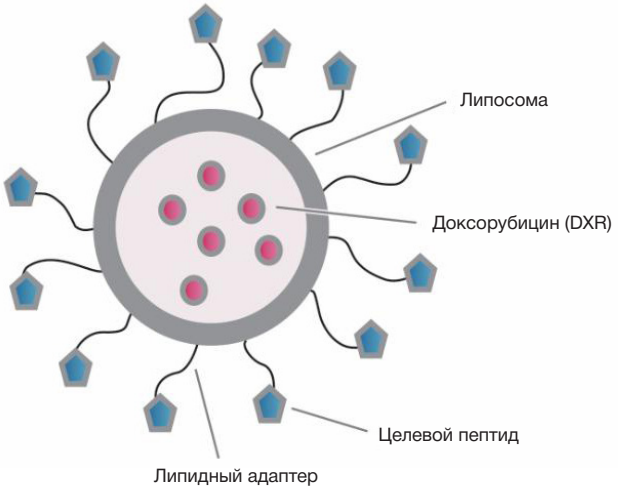
Наша исследовательская группа описала ранее неизвестный комплекс интегрина альфа-6 и Е-кадгерина, который присутствует на поверхности раковых клеток толстой кишки и отсутствует у нормальных клеток толстой кишки [4]. Мы идентифицировали также специфический лиганд к этому рецепторному комплексу, а именно ангиопоэтинподобный белок 6 — фактор, в больших количествах вырабатываемый здоровой печенью и физиологически вовлеченный в метаболизм липидов. Данный комплекс рецептора и лиганда участвует во вторичном распространении опухолей: раковые клетки толстой кишки выделяют рецептор, нормальные клетки печени секретируют лиганд, а их взаимное распознавание позволяет раковым клеткам заселить печень, в итоге образовывая там скопление метастазов [4].

Кроме того, описаны два пептида-аналога ангиопоэтинподобного белка 6, которые связывают комплекс интегрин альфа-6/Е-кадгерин. Эти пептиды, имеющие последовательность CGIYRLRS и CGVYSLRS (однобуквенный код аминокислот), благодаря способности конкурировать с ангиопоэтинподобным белком 6 при связывании рецепторного комплекса (и таким образом ингибировать метастазирование в печень) представляют собой потенциальное средство для идентификации клеток опухолей, которые вырабатывают как интегрин альфа-6, так и Е-кадгерин [4]. Мы использовали их способность к связыванию при создании нанопрепаратов для визуализации рака [5]. В данном исследовании были использованы кремниевые НЧ, которые имеют подходящий токсикологический профиль и хорошую биосовместимость *in vivo* в сочетании с легкостью выполнения манипуляций *in vitro* [6, 7]. Были созданы модульные наносистемы, чтобы получить визуализационную платформу, состоящую из флуоресцентных кремний-полиэтиденгликолевых (ПЭГ) НЧ, на поверхности которых присутствует пептид CGIYRLRS или CGVYSLRS. Такие НЧ имеют ядро из диоксида кремния, к которому добавлены один или несколько флуоресцентных красителей на основе алкоксисиланов; ядро заключено в мицеллу сополимера Pluronic®F127. Иными словами, они состоят из полиэтиленгликолевой оболочки, внутри которой находится ядро из диоксида кремния с добавлением красителя. Полиэтиленгликоль снаружи работает как стандартный полимер для обеспечения малозаметности, способствуя стабильной дисперсии в физиологических условиях и препятствуя поглощению клетками фагоцитарной системы. Кроме того, полиэтиленгликолевые хвосты могут быть дериватизированы для обеспечения возможности ковалентного присоединения пептидов направленного действия. Наши кремниевые НЧ имеют диаметр ядра SPN 11 ± 3 нм и гидродинамический диаметр 23 нм, они содержат краситель родамин А (Rhod), цианин 5 (Cy5) (одноцветные) или оба (двухцветные). Их специфичность была сначала изучена *ex vivo* на образцах метастазов печени пациента в сравнении с образцами нормальной печени и первичного рака толстой и прямой кишки (рис. 1). Срезы образцов замороженных человеческих тканей инкубировали с контролем (без метки) и с двухцветными (Rhod + Cy5) кремниевыми НЧ с пептидной меткой. Селективность НЧ оценивали методом конфокальной микроскопии (визуализация, рис. 1А–Г; количественные показатели, рис. 1Д), выявляя специфическое связывание кремниевых НЧ CGIYRLRS- и CGVYSLRS-(Rhod + Cy5) с клетками метастазов печени (рис. 1Б) и проводя сравнение с образцами ткани нормальной печени (рис. 1А) и толстой кишки (рис. 1В), а также первичной опухоли (рис. 1Г).

Кремниевые НЧ исследовали *in vivo* на модельных мышах с псевдо-метастатической опухолью (раковые клетки толстой кишки человека имплантировали в селезенку мышей с диабетом без ожирения/тяжелым комбинированным иммунодефицитом; рис. 2). Имеющим опухоли мышам ввели контроль и меченые кремниевые НЧ. Сигнал был зарегистрирован после того, как время циркуляции превысило 1 ч. Через 6 ч мы заметили значительное снижение фоновой флуоресценции, и величина соотношения сигнал–фон оставалась неизменной после 16 и после 24 ч. Это позволяет предположить, что освобождение лишенных метки НЧ сопровождается накоплением меченых кремниевых НЧ в метастатических очагах, обеспечивая большой временной интервал для переноса метода в клинику. Флуоресцентная визуализация методом стереомикроскопии и конфокальной микроскопии подтвердила специфичное накопление в метастазах кремниевых НЧ (Rhod)-CGIYRLRS (рис. 2А, Г, Ж, З), НЧ (Cy5)-CGIYRLR (рис. 2Б, Д, И, К) и НЧ (Rhod-Cy5)-CGIYRLRS (рис. 2В, Е, Л, М, Н, О). Трехмерная реконструкция нескольких конфокальных микрофотографий показала, что меченые кремниевые НЧ располагаются очень близко к кровеносным сосудам опухоли (рис. 2П, Р).

Интраоперационно флуоресцентные индикаторы начинают применять при раке простаты, желудка, мочевого пузыря и яичников [8–11]. Возможна флуоресцентная





визуализация наружных злокачественных образований, а именно немеланомных опухолей кожи [12]; уже разработаны эндоскопические системы флуоресцентной визуализации, предназначенные для применения при раке толстой и прямой кишки [13]. Все эти системы основаны на использовании лишенных метки флуоресцентных индикаторов, в то время как наши кремниевые НЧ имеют дополнительную функцию молекулярного нацеливания, что является еще одним доказательством клинической релевантности.

Целевая доставка препарата при метастатической нейробластоме

В последние годы были идентифицированы пептиды с уникальными функциями нацеливания для применения

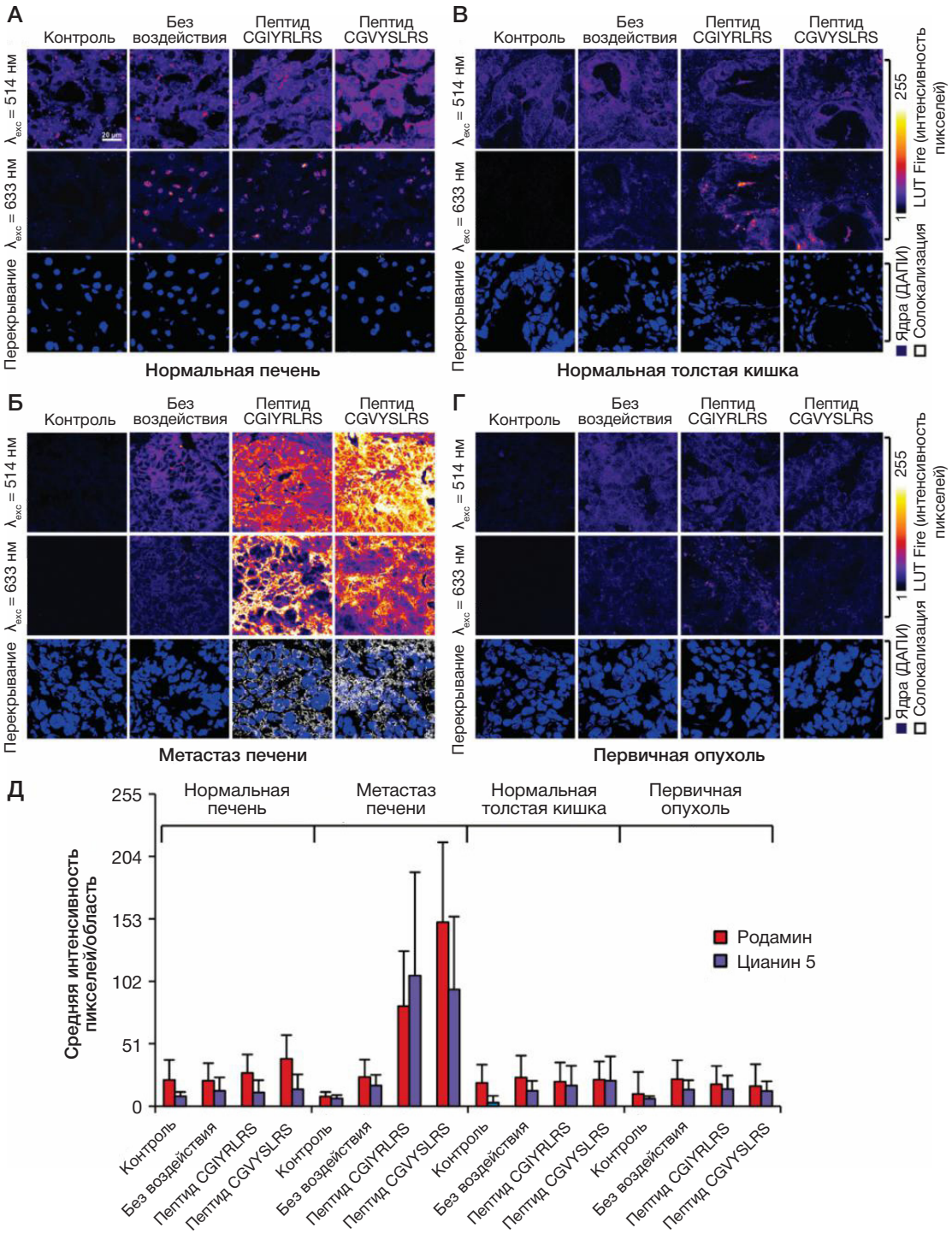


Рис. 1. Замороженные срезы нормальной печени (**А**), метастазов печени (**Б**), нормальной толстой кишки (**В**) и первичной опухоли (**Г**), которые были зафиксированы в 4%-м растворе формальдегида, после чего их инкубировали с лишенными метки кремниевыми наночастицами CGIYRLRS- или CGVYSLRS-(Rhod+Cy5) в течение 4 ч при комнатной температуре. После промывания испускаемую кремниевыми НЧ флуоресценцию проанализировали методом конфокальной микроскопии, а ответ преобразовали в ложно-цветное изображение LUT Fire для быстрой визуализации. Ядра были окрашены 4', 6-диамидин-2-фенилиндолом (ДАПИ). Солокализованные пиксели идентифицировали с помощью программного обеспечения ImageJ. В ходе экспериментов, показавших схожие результаты, использовали образцы, отобранные у 10 пациентов с метастатическим колоректальным раком; на примере представлены изображения тканей пациента #P85. (**Д**) Количественно связывание кремниевых НЧ выражается как интенсивность испускаемых пикселей после облучения на 514 нм (Rhod) и 633 нм (Cy5) и представляет собой среднее значение для пяти изображений каждой ткани. (По данным: Soster и др. [5].)

в лечении опухолей. Из них CPRECES [14] и CNGRC [15] (однобуквенный аминокислотный код) с высокой селективностью связываются с маркерами эндотелиальных/периваскулярных опухолей аминопептидазами A (APA) и N (APN) соответственно, поэтому они оптимальны для применения в доставке препаратов *in vivo* через кровяное русло.

Эти два пептида использовали в первом исследовании, целью которого была доклиническая оценка осуществимости доставки нанопрепаратов направленного действия для доксорубицина на моделях нейробластомы первой стадии [16]. Для этого были получены синтетические версии обоих пептидов путем слияния человеческого фактора некроза опухолей с коротким линкером KY (однобуквенный аминокислотный код) и последующего присоединения к полиэтиленгликолевым стелс-липосомам, в состав которых входят дистеароилфосфатидилэтанол-

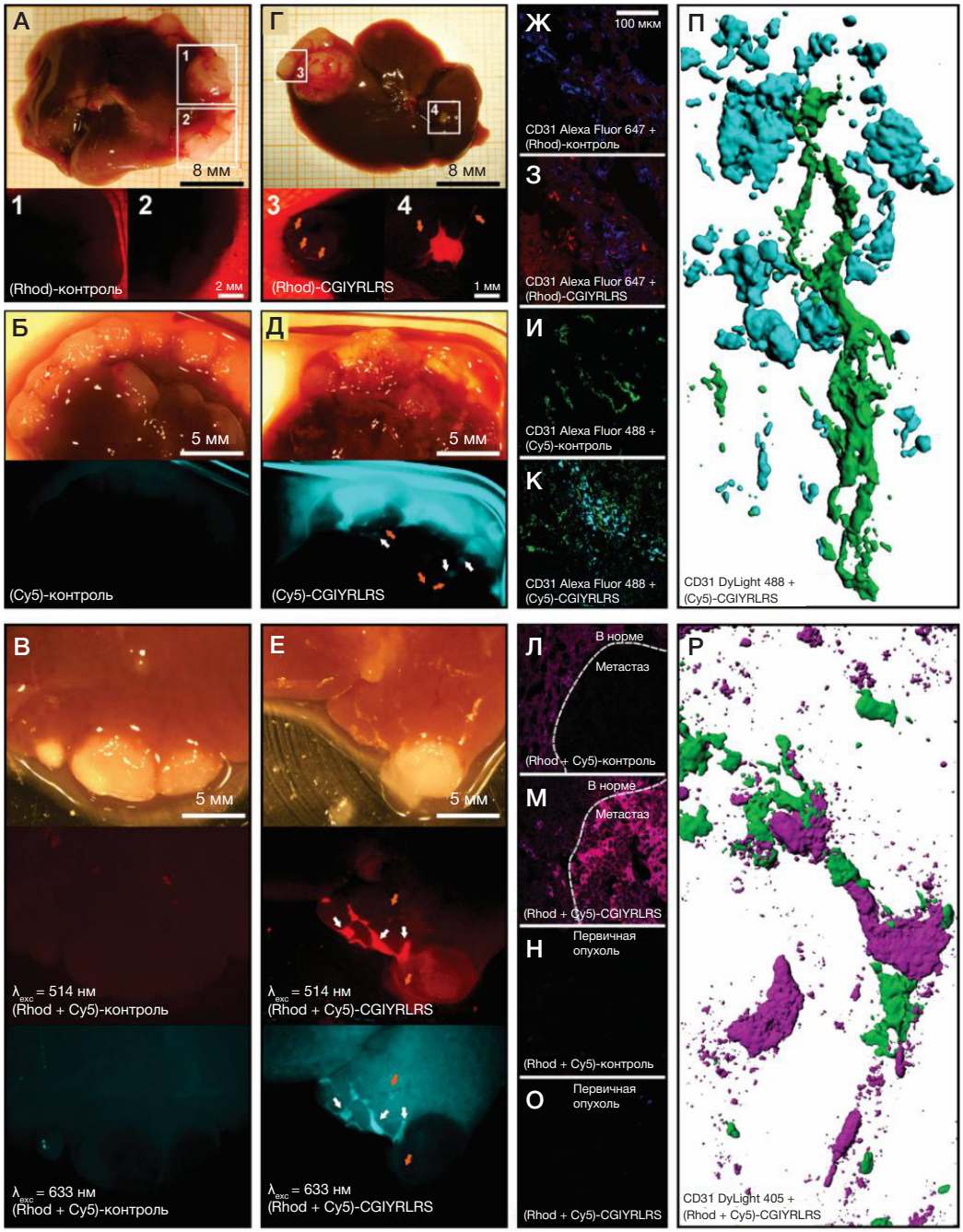


Рис. 2. Мышам с диабетом без ожирения/тяжелым комбинированным иммунодефицитом, имеющим первичные опухоли и множественные метастазы в печени, ввели одноцветные кремниевые НЧ (контроль (**А**, Rhod; **Б**, Cy5) или НЧ CGIYRLRS (**Г**, Rhod; **Д**, Cy5)), двухцветные НЧ (контроль (**В**) или НЧ CGIYRLRS (**Е**)). Через 16 ч мышей усыпили, а извлеченные органы сфотографировали на цифровую камеру высокого разрешения, подключенную к флуоресцентному стереомикроскопу. На рис. **Г**, **Д** и **Е** *оранжевыми стрелками* отмечены кровеносные сосуды, проходящие через метастазы печени; на рис. **Д** и **Е** *белыми стрелками* с субмиллиметровой точностью отмечены скопления метастазов. Образцы одних и тех же тканей заморозили методом ОСТ, порезали на срезы толщиной 10 мкм и исследовали методом конфокального анализа одноцветной (контроль (**Ж**, Rhod; **И**, Cy5), CGIYRLRS (**З**, Rhod; **К**, Cy5)) или двухцветной (контроль (**Л**), CGIYRLRS (**М**)) флуоресценции. Для визуализации кровеносных сосудов окрашивание CD31 было наложено на сигнал кремниевых НЧ и визуализировано с помощью вторичных антител Alexa Fluor®647 (**Ж**–**З**), Alexa Fluor®488 (**И**–**К**) и DyLightTM405 (**Л**–**О**), для перекрывания с сигналом НЧ (Rhod), (Cy5) и двухцветных НЧ соответственно. В случае с двухцветными кремниевыми НЧ на образцах первичных опухолей, взятых у мышей, которым ввели контроль (**Н**) или CGIYRLRS (**О**), кремниевые НЧ визуализируются как негативный контроль для дальнейшего использования. На рис. **П** (фрагмент поля на **К**) и **Р** (фрагмент поля на **М**) представлены трехмерные модели, полученные из 50–80 конфокальных снимков с помощью программного обеспечения IMARIS. (По данным: Soster и др. [5].)

аминполиэтиленгликоль, гидрогенизированный соевый фосфатидилхолин и холестерин. В такие стелс-липосомы (SL) был инкапсулирован доксорубицин (DXR) для получения наносистем направленного действия CPRECES-SL[DXR] и CNGRC-SL[DXR] соответственно, имеющих размеры 90–115 нм, инкапсуляцию препарата с выходом 95% и показатель связывания пептидов 4 мкг/мкмоль для каждой липосомы. Для проведения фармакокинетических исследований такие стелс-липосомы были снабжены двойной меткой путем встраивания 3H и 14C в холестерин и доксорубицин соответственно, что позволило продемонстрировать достаточную стабильность и продолжительное время

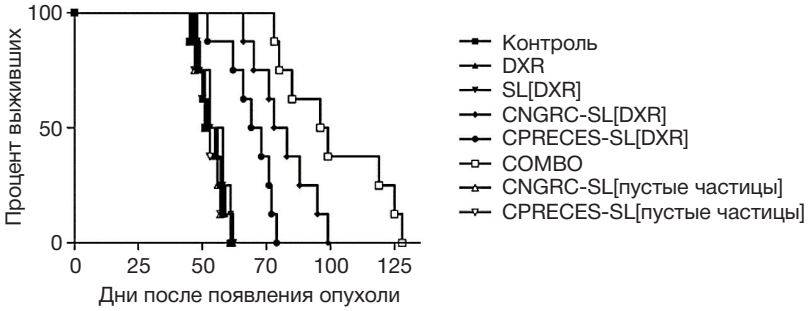


Рис. 3. Терапевтическая эффективность нацеленных на аминопептидазу N (APN) и A (APA) липосомных препаратов на модельных мышах с нейробластомой. Бестимусные мыши (по 8 в группе), которым провели ортотопическую имплантацию клеток человеческой нейробластомы, начиная с 21-го дня после имплантации получали лечение с использованием буферного раствора HEPES (контроль), стелс-липосом CNGRC-SL[пустых], стелс-липосом CPRECES-SL[пустых] или доксорубицина в дозировке 5 мг/кг, свободного или инкапсулированного в лишенные метки липосомы (SL[DXR]), липосомы, нацеленные на APN (CNGRC-SL[DXR]) или APA (CNGRC-SL[DXR]) или эквимолярную смесь CNGRC-SL[DXR] и CNGRC-SL[DXR] (COMBO), один раз в неделю в течение 5 недель. Эффективность каждого препарата оценивали по выживаемости, которая представлена на кривой Каплана–Майера в виде процента оставшихся в живых мышей для разных временных точек. (По данным: Loi и др. [18].)

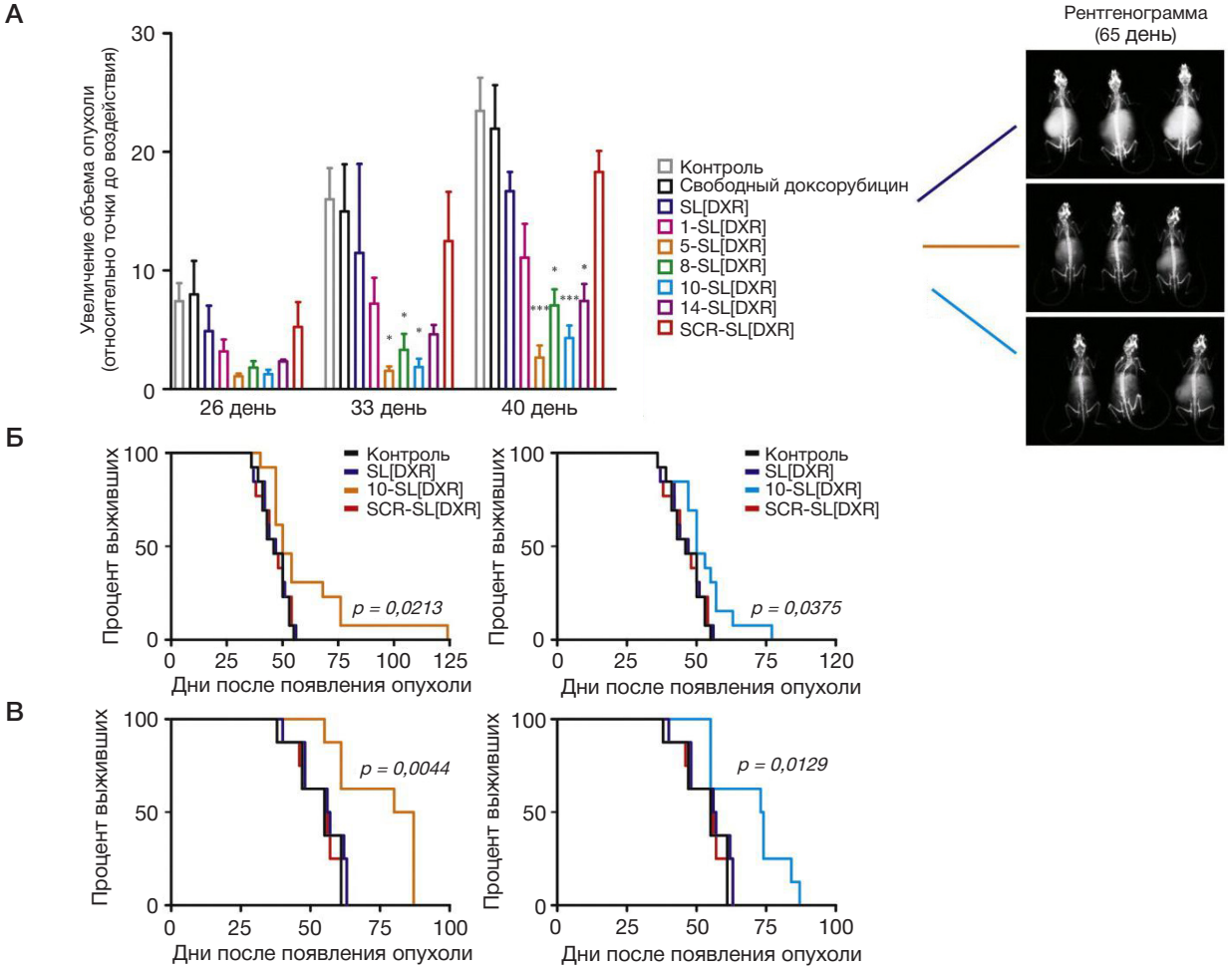


Рис. 4. А. Терапевтическая эффективность нацеленных на пептиды липосомных препаратов на модельных мышах, которым провели имплантацию экспрессирующих люциферазу клеток человеческой неробластомы. Лечение начали через 21 день после имплантации опухоли. Мышам (по 5 в группе) внутривенно вводили буферный раствор HEPES (контроль) или доксорубицин в дозировке 5 мг/кг, свободный (free DXR) или инкапсулированный в лишенные метки стелс-липосомы (SL[DXR]), липосомы с пептидной смесью (SCR-SL[DXR] или усовершенствованные пептидами липосомы направленного действия (1-, 5-, 8-, 10-, 14-SL[DRX]), один раз в неделю в течение трех недель. Мониторинг роста опухоли проводили методом биослойной интерферометрии (BLI) через 5 дней после каждого эпизода получения лечения (26-й, 33-й, 40-й день с момента имплантации опухоли). Представлены значения увеличения объема опухоли по сравнению с днем, предшествовавшим началу лечения (20-й день). На рисунках представлены рентгеновские снимки, полученные через месяц после окончания лечения (65-й день), для мышей, получавших SL[DXR], 5-SL[DXR] и 10-SL[DXR] соответственно. **Б–В**. Терапевтический эффект препаратов направленного действия оценивали по общей выживаемости для псевдо-метастатической модели (13 животных в группе; **Б**) и для ортотопической модели (8 животных в группе; **В**). Статистический анализ: **А**, *p vs*. SL[DXR]; **Б–В**, *p vs*. контроль, SL[DXR] и SCR-SL[DXR]. (По данным: Loi и др. [16].)

циркуляции (до 24 ч) [16]. Оценку эффективности этих композиций, как в виде одиночных агентов, так и в составе комбинированных препаратов (COMBO), провели на ортотопических моделях, полученных в результате имплантации человеческих клеток нейробластомы в левый надпочечник бестимусных мышей. Начиная с 21-го дня после имплантации опухолевых клеток, мышам раз в неделю в течение 5 недель вводили доксорубицин (свободный или инкапсулированный в липосомы) в дозировке 5 мг/кг; было показано, что введение CPRECES-SL[DXR], CNGRC-SL[DXR] или COMBO обеспечивало достоверное увеличение продолжительности жизни по сравнению с введением свободного препарата (до 17, 37 и 66 дней соответственно; рис. 3) [16].

Данная работа демонстрирует, что нацеливание препарата на микросреду опухоли повышает его эффективность и потому может быть использовано для разработки инновационных лекарственных препаратов.

На основании этих вдохновляющих результатов были проведены комбинированные *in vitro/ex vivo* скрининги пептидных библиотек, полученных методом фагового дисплея с целью идентификации новых пептидных мотивов, высокоспецифичных для человеческой нейробластомы [16]. Эти эксперименты были поставлены, чтобы изолировать пептиды, способные связывать первичную опухоль целиком (обнаружено 26 мотивов) или скопление метастазов (15 мотивов), микросреду первичной опухоли (57 мотивов) или микросреду метастазов (23 мотива). Специфичность пяти

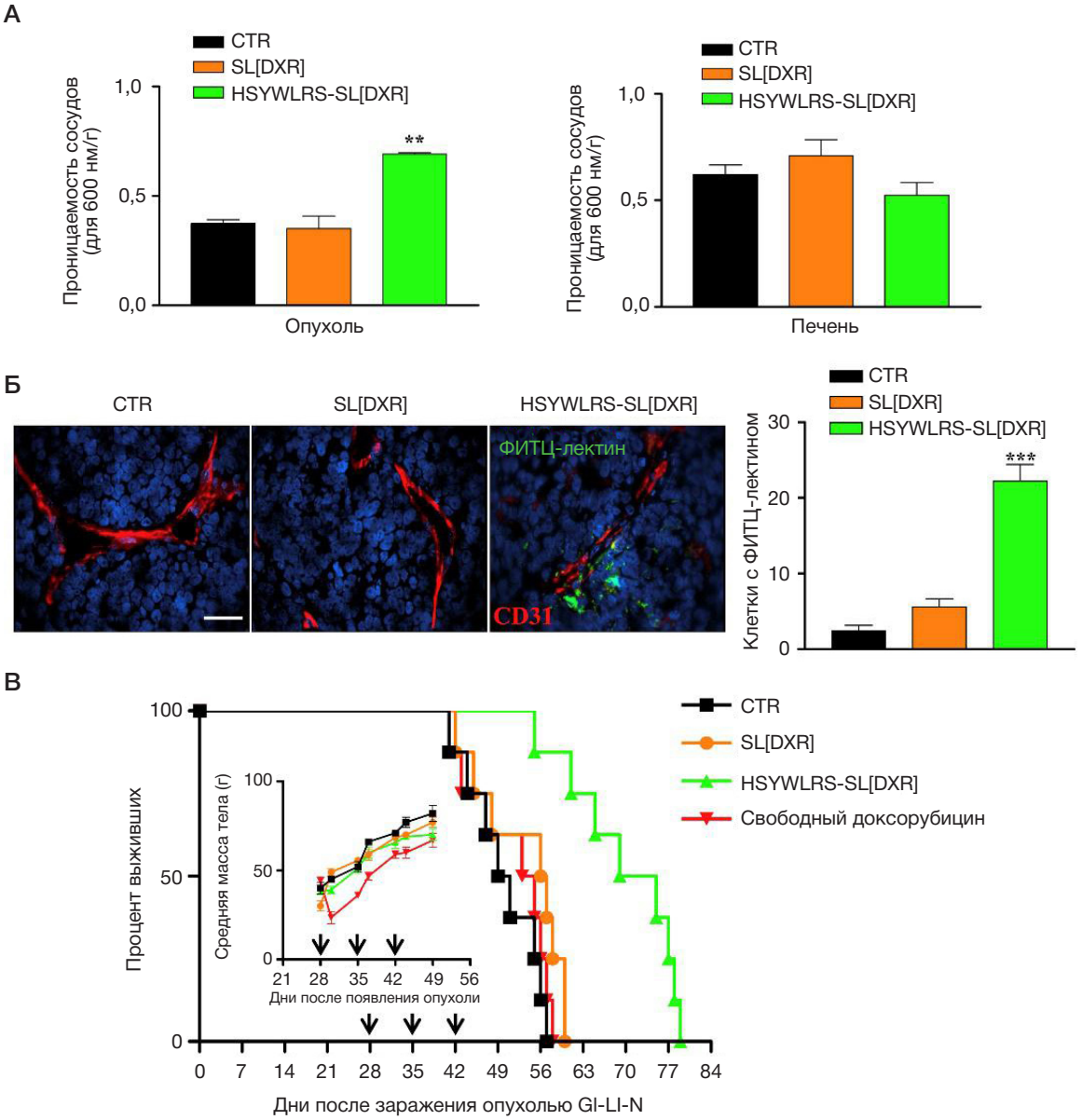


Рис. 5. А. Системная проницаемость *in vivo*. Мыши, имеющие ортотопические опухоли (по 3 в группе) 28 дней спустя получали одну дозу доксорубицина (5 мг/кг), инкапсулированного в лишенные метки стелс-липосомы (SL[DXR]) или нацеленные на HSYWLRS липосомы (HSYWLRS-SL[DXR]), вместе с 1 мг голубого Эванса. Мыши из контрольной группы (CTR) получали только буферный раствор HEPES. Через час мышам выполняли перфузию, извлекали опухоли и печень, экстрагировали голубой Эванс и измеряли его количество (на 600 нм). Результаты выражены в количестве голубого Эванса на 1 г ткани. **, $p < 0{,}01$: HSYWLRS-SL[DXR] *vs*. контроль и SL[DXR]. **Б**. Примеры срезов опухолей мышей из контрольной группы или мышей, получавших SL[DXR] или HSYWLRS-SL[DXR], которым ввели ФИТЦ-лектин (*зеленый*). *Красный*: CD31. *Синий*: клеточные ядра (ДАПИ). Шкала: 40 мкм. На графике *справа* количество ФИТЦ-положительных клеток. ***, $p < 0{,}001$, HSYWLRS-SL[DXR] *vs*. контроль и SL[DXR]. **В**. Потенцированная терапевтическая эффективность HSYWLRS-SL[DXR]. Мышам (по 8 в группе), имеющим ортотопические опухоли, внутривенно вводили доксорубицин в дозировке 5 мг/кг, свободный или инкапсулированный в стелс-липосомы SL[DXR] и HSYWLRS-SL[DXR], один раз в неделю в течение 3 недель (*стрелки*). Мыши из контрольной группы (CTR) получали только буферный раствор HEPES. Выживаемость: $p < 0{,}0008$: HSYWLRS-SL[DXR] *vs*. SL[DXR]). *Вставка*: средняя масса тела для разных временных точек. (По данным: Cossu и др. [17].)

пептидов, нацеленных на скопление метастазов (фаговый клон #14, пептидная последовательность KSFFLSH), микросреду первичной опухоли (#1, YEGLISR) и микросреду метастазов (#5, HSYWLRS; #8, WSWPREL; #10, ALAAHKL), была подтверждена *ex vivo* путем анализа связывания на срезах человеческой нейробластомы IV стадии и *in vivo* на модельных мышах. По этой причине пептиды синтезировали с присоединением N-концевого (YSHS, однобуквенный аминокислотный код) и С-концевого (GGG, однобуквенный аминокислотный код) доменов, связав их со стелс-липосомами, как было описано выше [16]. Потенциальную эффективность таких наносистем исследовали на ортотопической модели, полученной в результате имплантации трансдуцированных люциферазой клеток человеческой нейробластомы. Кроме того, в результате введения опухолевых клеток в хвостовую вену бестимусных мышей была получена псевдо-метастатическая модель. Мыши после ортотопической имплантации получали лечение раз в неделю в течение трех недель, начиная с 21-го дня после имплантации опухолевых клеток, а мыши после внутривенной имплантации получали лечение по той же схеме, но начиная с 4-го часа после имплантации опухолевых клеток. В первой серии экспериментов наблюдение за ростом ортотопических опухолей, экспрессирующих люциферазу, осуществляли методом биолюминесцентной визуализации на 26-й, 33-й и 40-й дни после имплантации (через 5 дней после каждого эпизода получения лечения). 5-SL[DXR] и 10-SL[DXR] наиболее эффективно задерживали рост опухоли, что подтвердили результаты рентгенологического исследования всего тела, проведенного через месяц после окончания лечения (рис. 4А). Оценка способности препаратов направленного действия увеличивать продолжительность жизни мышей с опухолями была проведена последовательно на псевдо-метастатической (рис. 4Б) и ортотопической (рис. 4В) моделях. И снова лечение 5-SL[DXR] или 10-SL[DXR] продемонстрировало более высокую выживаемость мышей с нейробластомой по сравнению с контрольными животными и даже с животными, которых лечили доксорубицином, как свободным, так и инкапсулированным в липосомные препараты ненаправленного действия [16].

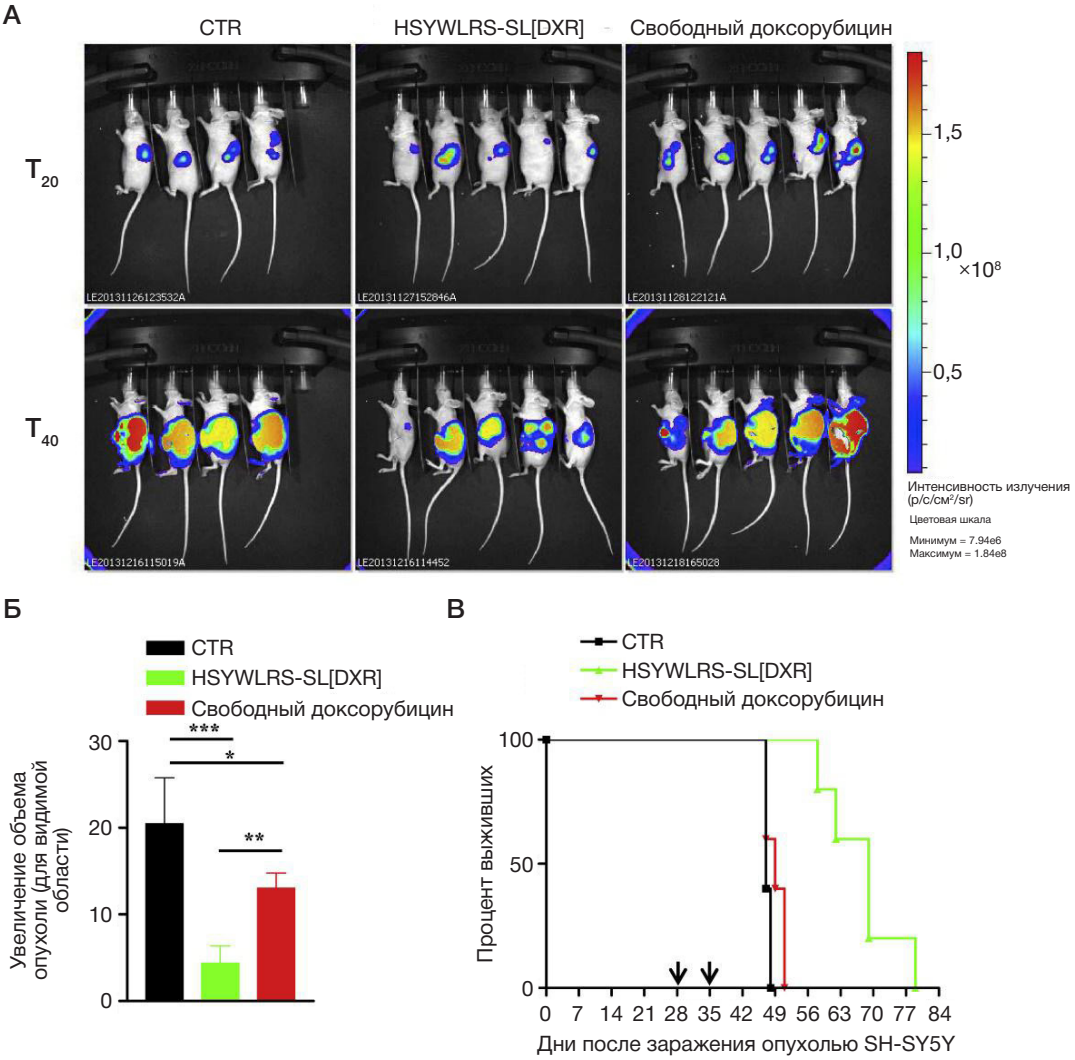


Рис. 6. А. Латеральные (со стороны опухоли) изображения мышей, которым была проведена ортотопическая имплантация экспрессирующих люциферазу клеток человеческой нейробластомы. Животные получали лечение внутривенно, один раз в неделю в течение 2 недель (*стрелки*), с использованием доксорубицина в дозировке 5 мг/кг — свободного (free DXR) или инкапсулированного в нацеленные на HSYWLRS липосомы (HSYWLRS-SL[DXR]). Мыши из контрольной группы (CTR) получали буферный раствор HEPES. Мониторинг роста опухоли проводили методом биослойной интерферометрии (BLI) на 20-й день (перед началом лечения) и на 40-й день (окончание лечения) после появления опухоли. **Б**. Противоопухолевый эффект после окончания лечения, значение представлено как увеличение объема опухоли на 40-й день по сравнению с 20-м днем. *, $p < 0{,}05$: свободный доксорубицин *vs*. контроль; **, $p < 0{,}01$: HSYWLRS-SL[DXR] *vs*. свободный доксорубицин; ***, $p < 0{,}001$: HSYWLRS-SL[DXR] *vs*. контроль. **В**. HSYWLRS-SL[DXR] демонстрирует потенцированную терапевтическую эффективность. Выживаемость: $p < 0{,}0025$: HSYWLRS-SL[DXR] *vs*. контроль и свободный доксорубицин. (По данным: Cossu и др. [17].)

Эти предварительные выводы были дополнены результатами последовательного углубленного изучения пептида HSYWLRS (#5 из предыдущего исследования) как компонента направленного действия для доклинического применения [17]. Специфичность связывания и интернализации были подтверждены на дополнительных клеточных линиях, а также на образцах тканей модельных животных и человеческой нейробластомы IV стадии. Таким образом, снабженные пептидной меткой стелс-липосомы с инкапсулированным доксорубицином (HSWYLRS-SL[DXR]) были созданы и исследованы как наносистемы для доставки препаратов *in vivo*. Оценка проницаемости сосудов была проведена путем введения голубого Эванса мышам с нейробластомой, получившим лечение HSYWLRS-SL[DXR], и отслеживания специфического повышения экстравазации красителя и аккумулирования в ортотопических опухолях, но не в неопухолевых тканях (рис. 5А). Лечение с помощью HSYWLRS-SL[DXR] также способствовало увеличению перфузии кровеносных сосудов опухолей, что было обнаружено в результате внутривенного введения лектин-флуоресцеин-изотиоцианата (ФИТЦ) и анализа испускаемой флуоресценции методом конфокальной микроскопии (рис. 5Б). Эти явления сопровождались: 1) увеличением аккумулирования HSYWLRS-SL[DXR] опухолью, но не доксорубицина, инкапсулированного в липосомные препараты ненаправленного действия; 2) увеличением продолжительности жизни животных (рис. 5В) при отсутствии признаков токсического воздействия, например потери веса (рис. 5В, на вставке). Кроме того, терапевтическую эффективность HSYWLRS-SL[DXR] сравнили с терапевтической эффективностью свободного доксорубицина, пронаблюдав за ростом экспрессирующих люциферазу клеток человеческой нейробластомы после ортотопической имплантации *in vivo* методом биослойной интерферометрии, и обнаружили, что только липосомный препарат направленного действия вызывает эффективный противоопухолевый ответ (рис. 6А–Б) и продлевает жизнь мышам с опухолями (рис. 6В). Этот эффект был подтвержден с помощью позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ) в сочетании с измерением поглощения глюкозы. Исследование показало, что лечение с помощью HSYWLRS-SL[DXR] существенно замедляет не только рост первичных опухолей, но и распространение вторичных опухолей (рис. 7А), что было подтверждено при аутопсии животных посредством определения количества метастатических очагов и общего объема метастазов (рис. 7В).

Все эти данные подтверждают, что нацеленный на нейробластому пептид HSYWLRS может стать мощным средством для терапевтического применения.

ВЫВОДЫ

Весьма актуальна проблема ранней диагностики опухолей и эффективного лечения, которое имело бы максимальный противоопухолевый эффект, но не затрагивало нормальные ткани. Появление нанопрепаратов может радикально изменить наш подход к визуализации и лечению рака при условии, что мы идентифицируем обладающие подходящими свойствами биомаркеры. В действительности, несмотря

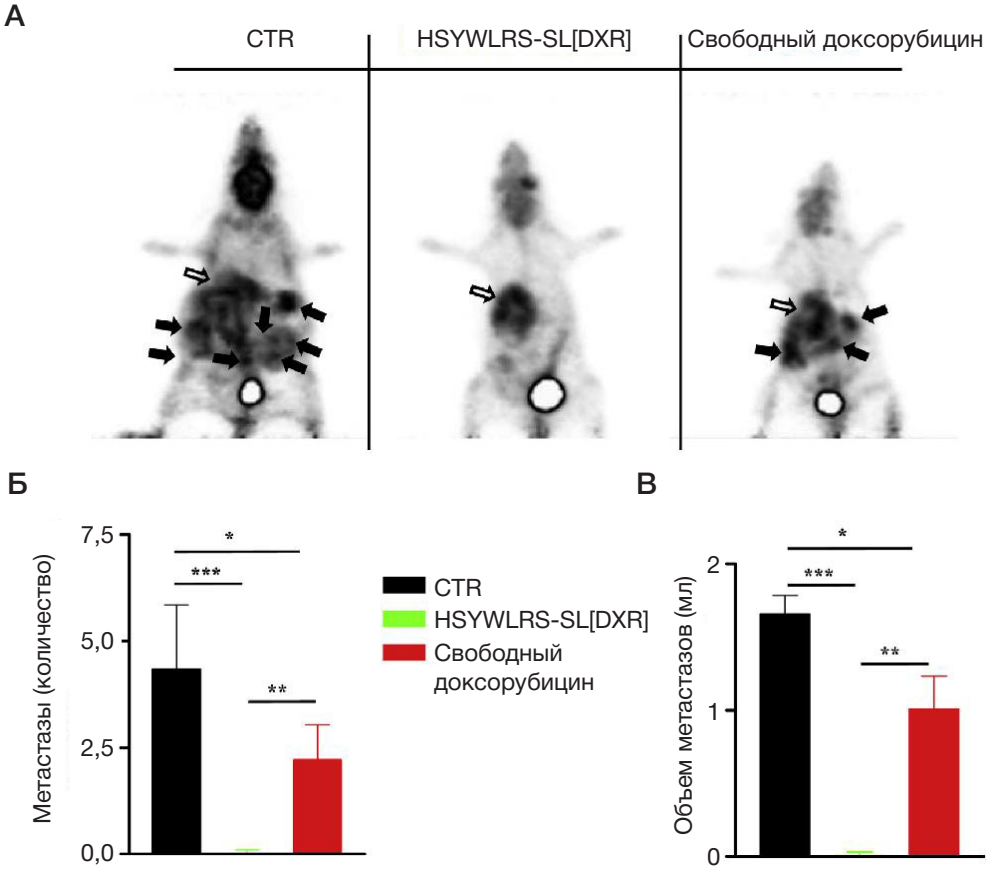


Рис. 7. Лечение с помощью HSYWLRS-SL[DXR] ингибирует вторичное распространение опухоли. Мыши (4 из контрольной группы, 5 получавших препарат), которым была проведена ортотопическая имплантация экспрессирующих люциферазу клеток человеческой нейробластомы, получали лечение, описанное в подписи к рис. 6. Оценка распространения опухоли была проведена методом ПЭТ через 41 день (**А**). Карты поглощения глюкозы (*белые стрелки*: первичная опухоль; *черные стрелки*: метастазы). Количество (**Б**) и объем метастазов (**В**) после лечения. *, $p < 0{,}05$: свободный доксорубицин *vs*. контроль; **, $p < 0{,}01$: HSYWLRS-SL[DXR] *vs*. свободный доксорубицин; ***, $p < 0{,}001$: HSYWLRS-SL [DXR] *vs*. контроль

на то что разработка наноматериалов стремительно развивается, нам по-прежнему необходимы мишени с более высокой селективностью, чтобы сделать возможным применение ориентированных на пациента методов. В нашей недавней работе обнаружен ряд мишеней и компонентов направленного действия лекарств, которые были проверены доклинически и могут быть использованы для дальнейшей разработки клинических методов.

Литература

1. Arap W, Pasqualini R, Montalti M, Petrizza L, Prodi L, Rampazzo E et al. Luminescent silica nanoparticles for cancer diagnosis. Curr Med Chem. 2013; 20 (17): 2195–211.
2. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. Pharm Res. 2016; 33 (10): 2373–87.
3. Caster JM, Patel AN, Zhang T, Wang A. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2017; 9 (1): e1456.
4. Marchiò S, Soster M, Cardaci S, Muratore A, Bartolini A, Barone V et al. A complex of alpha(6) integrin and E-cadherin drives liver metastasis of colorectal cancer cells through hepatic angiopoietin-like 6. EMBO Mol Med. 2012 Nov; 4 (11): 1156–75.
5. Soster M, Juris R, Bonacchi S, Genovese D, Montalti M, Rampazzo E et al. Targeted dual-color silica nanoparticles provide univocal identification of micrometastases in preclinical models of colorectal cancer. Int J Nanomed. 2012; (7): 4797–807.
6. Bonacchi S, Genovese D, Juris R, Montalti M, Prodi L, Rampazzo E et al. Luminescent chemosensors based on silica nanoparticles. Top Curr Chem. 2011; (300): 93–138.
7. Bonacchi S, Genovese D, Juris R, Montalti M, Prodi L, Rampazzo E et al. Luminescent silica nanoparticles: extending the frontiers of brightness. Angew Chem Int Ed Engl. 2011; 50 (18): 4056–66.
8. D'Hallewin MA, Kamuhabwa AR, Roskams T, De Witte PA, Baert L. Hypericin-based fluorescence diagnosis of bladder carcinoma. BJU Int. 2002; 89 (7): 760–3.
9. Miyashiro I, Miyoshi N, Hiratsuka M, Kishi K, Yamada T, Ohue M et al. Detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging: comparison with infrared imaging. Ann Surg Oncol. 2008; 15 (6): 1640–3.
10. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-alpha targeting: first in-human results. Nat Med. 2011; 17 (10): 1315–9.
11. van der Poel HG, Buckle T, Brouwer OR, Valdes Olmos RA, van Leeuwen FW. Intraoperative laparoscopic fluorescence guidance to the sentinel lymph node in prostate cancer patients: clinical proof of concept of an integrated functional imaging approach using a multimodal tracer. Eur Urol. 2011; 60 (4): 826–33.
12. de Leeuw J, van der Beek N, Neugebauer WD, Bjerring P, Neumann HA. Fluorescence detection and diagnosis of non-melanoma skin cancer at an early stage. Lasers Surg Med. 2009; 41 (2): 96–103.
13. Atlamazoglou V, Yova D, Kavantzas N, Loukas S. Microscopical examination of the localisation patterns of two novel rhodamine derivatives in normal and neoplastic colonic mucosa. Lasers Med Sci. 2001; 16 (4): 253–9.
14. Marchiò S, Lahdenranta J, Schlingemann RO, Valdembri D, Wesseling P, Arap MA et al. Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. Cancer Cell. 2004; 5 (2): 151–62.
15. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. Cancer Res. 2000; 60 (3): 722–7.
16. Loi M, Di Paolo D, Soster M, Brignole C, Bartolini A, Emionite L et al. Novel phage display-derived neuroblastoma-targeting peptides potentiate the effect of drug nanocarriers in preclinical settings. J Control Release. 2013; 170 (2): 233–41.
17. Cossu I, Bottoni G, Loi M, Emionite L, Bartolini A, Di Paolo D et al. Neuroblastoma-targeted nanocarriers improve drug delivery and penetration, delay tumor growth and abrogate metastatic diffusion. Biomaterials. 2015; (68): 89–99.
18. Loi M, Marchiò S, Becherini P, Di Paolo D, Soster M, Curnis F et al. Combined targeting of perivascular and endothelial tumor cells enhances anti-tumor efficacy of liposomal chemotherapy in neuroblastoma. J Control Release. 2010; 145 (1): 66–73.

References

1. Arap W, Pasqualini R, Montalti M, Petrizza L, Prodi L, Rampazzo E et al. Luminescent silica nanoparticles for cancer diagnosis. Curr Med Chem. 2013; 20 (17): 2195–211.
2. Bobo D, Robinson KJ, Islam J, Thurecht KJ, Corrie SR. Nanoparticle-based medicines: a review of FDA-approved materials and clinical trials to date. Pharm Res. 2016; 33 (10): 2373–87.
3. Caster JM, Patel AN, Zhang T, Wang A. Investigational nanomedicines in 2016: a review of nanotherapeutics currently undergoing clinical trials. Rev Nanomed Nanobiotechnol. 2017; 9 (1): e1456.
4. Marchiò S, Soster M, Cardaci S, Muratore A, Bartolini A, Barone V et al. A complex of alpha(6) integrin and E-cadherin drives liver metastasis of colorectal cancer cells through hepatic angiopoietin-like 6. EMBO Mol Med. 2012 Nov; 4 (11): 1156–75.
5. Soster M, Juris R, Bonacchi S, Genovese D, Montalti M, Rampazzo E et al. Targeted dual-color silica nanoparticles provide univocal identification of micrometastases in preclinical models of colorectal cancer. Int J Nanomed. 2012; (7): 4797–807.
6. Bonacchi S, Genovese D, Juris R, Montalti M, Prodi L, Rampazzo E et al. Luminescent chemosensors based on silica nanoparticles. Top Curr Chem. 2011; (300): 93–138.
7. Bonacchi S, Genovese D, Juris R, Montalti M, Prodi L, Rampazzo E et al. Luminescent silica nanoparticles: extending the frontiers of brightness. Angew Chem Int Ed Engl. 2011; 50 (18): 4056–66.
8. D'Hallewin MA, Kamuhabwa AR, Roskams T, De Witte PA, Baert L. Hypericin-based fluorescence diagnosis of bladder carcinoma. BJU Int. 2002; 89 (7): 760–3.
9. Miyashiro I, Miyoshi N, Hiratsuka M, Kishi K, Yamada T, Ohue M et al. Detection of sentinel node in gastric cancer surgery by indocyanine green fluorescence imaging: comparison with infrared imaging. Ann Surg Oncol. 2008; 15 (6): 1640–3.
10. van Dam GM, Themelis G, Crane LM, Harlaar NJ, Pleijhuis RG, Kelder W et al. Intraoperative tumor-specific fluorescence imaging in ovarian cancer by folate receptor-alpha targeting: first in-human results. Nat Med. 2011; 17 (10): 1315–9.
11. van der Poel HG, Buckle T, Brouwer OR, Valdes Olmos RA, van Leeuwen FW. Intraoperative laparoscopic fluorescence guidance to the sentinel lymph node in prostate cancer patients: clinical proof of concept of an integrated functional imaging approach using a multimodal tracer. Eur Urol. 2011; 60 (4): 826–33.
12. de Leeuw J, van der Beek N, Neugebauer WD, Bjerring P, Neumann HA. Fluorescence detection and diagnosis of non-melanoma skin cancer at an early stage. Lasers Surg Med. 2009; 41 (2): 96–103.
13. Atlamazoglou V, Yova D, Kavantzas N, Loukas S. Microscopical examination of the localisation patterns of two novel rhodamine derivatives in normal and neoplastic colonic mucosa. Lasers Med

Sci. 2001; 16 (4): 253–9.
14. Marchiò S, Lahdenranta J, Schlingemann RO, Valdembri D, Wesseling P, Arap MA et al. Aminopeptidase A is a functional target in angiogenic blood vessels. Cancer Cell. 2004; 5 (2): 151–62.
15. Pasqualini R, Koivunen E, Kain R, Lahdenranta J, Sakamoto M, Stryhn A. Aminopeptidase N is a receptor for tumor-homing peptides and a target for inhibiting angiogenesis. Cancer Res. 2000; 60 (3): 722–7.
16. Loi M, Di Paolo D, Soster M, Brignole C, Bartolini A, Emionite L et al. Novel phage display-derived neuroblastoma-targeting peptides potentiate the effect of drug nanocarriers in preclinical settings. J Control Release. 2013; 170 (2): 233–41.
17. Cossu I, Bottoni G, Loi M, Emionite L, Bartolini A, Di Paolo D et al. Neuroblastoma-targeted nanocarriers improve drug delivery and penetration, delay tumor growth and abrogate metastatic diffusion. Biomaterials. 2015; (68): 89–99.
18. Loi M, Marchiò S, Becherini P, Di Paolo D, Soster M, Curnis F et al. Combined targeting of perivascular and endothelial tumor cells enhances anti-tumor efficacy of liposomal chemotherapy in neuroblastoma. J Control Release. 2010; 145 (1): 66–73.

ИССЛЕДОВАНИЕ СВОЙСТВ ТРЕХМЕРНОЙ КЛЕТОЧНОЙ МОДЕЛИ ОПУХОЛИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОРА В КАЧЕСТВЕ НОВОЙ ПРЕДКЛИНИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ

Ю. С. Маклыгина[1] ✉, И. Д. Романишкин[1], А. В. Рябова[1], И. В. Яковец[2,3], Л. Болотин[2], В. Б. Лощенов[1,4]

[1] Институт общей физики имени А. М. Прохорова Российской академии наук, Москва

[2] Научно-исследовательский центр автоматики университета Лотарингии, Нанси, Франция

[3] Белорусский государственный университет, Минск, Белоруссия

[4] Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

Ввиду своих особенностей наночастицы (НЧ), состоящие из фталоцианина алюминия (НЧ AlPc), являются перспективным фотосенсибилизатором. НЧ AlPc не флуоресцируют в свободной наноформе, слабо флуоресцируют в нормальной ткани, сильно — в опухолях и очень сильно — в макрофагах. НЧ AlPc обладают уникальной особенностью приобретать способность к флуоресценции и фототоксичности в контакте с некоторыми биокомпонентами. При этом тип биокомпонентов, связывающихся с НЧ AlPc, влияет на интенсивность, время жизни и спектральное распределение флуоресценции. Целью работы было исследовать особенности захвата нанофотосенсибилизатора в 3D-моделях клеточных культур. Полученные данные демонстрируют захват НЧ AlPc клетками внутри сфероида в течение первого часа по росту флуоресцентного сигнала. Обнаружена гетерогенность клеточных 3D-моделей по анализу изменения сигнала флуоресценции НЧ AlPc внутри сфероида. В результате лазерного облучения (двухфотонного возбуждения с λ = 780/390 нм) наблюдали фотобличинг флуоресценции, который, вероятно, связан с деактивацией НЧ AlPc. Таким образом, созданная модель, состоящая из клеточной 3D-культуры с НЧ AlPc, позволяет лучше оценивать метаболитические процессы в клетках, чем монослойные клеточные 2D-культуры. Кроме того, модель позволяет оценивать фотодинамический эффект в зависимости от фенотипичных свойств различных областей в гетерогенной 3D-структуре.

Ключевые слова: фталоцианин алюминия, наночастицы, нанофотосенсибилизатор, многоклеточный опухолевый сфероид, лазерная сканирующая микроскопия

Финансирование: работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (соглашение RFMEFI61618X0096 № 14.616.21.0096 от 12.02.2018).

✉ **Для корреспонденции:** Юлия Сергеевна Маклыгина
ул. Вавилова, д. 38, г. Москва, 119991; us.samsonova@physics.msu.ru

Статья получена: 26.06.2018 **Статья принята к печати:** 23.10.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.079

A NOVEL SPHEROID MODEL FOR PRECLINICAL INTERCELLULAR NANOPHOTOSENSITIZER-MEDIATED TUMOR STUDY

Maklygina YuS[1] ✉, Romanishkin ID[1], Ryabova AV[1], Yakavets IV[2,3], Bolotin L[2], Loschenov VB[1,4]

[1] Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow

[2] Centre de Recherche en Automatique de Nancy (CRAN), Université de Lorraine, France

[3] Belarusian State University, Minsk, Belarus

[4] National Research Nuclear University «MEPhI», Moscow

Aluminum phthalocyanine nanoparticles (NP AlPc) possess the features that make them a promising photosensitizer. In particular, AlPc NPs do not fluoresce in free nanoform, fluoresce weakly in normal tissue, strongly in tumors and very strongly in macrophages. Also, such particles fluoresce and become phototoxic when contacting certain biocomponents. The type of biocomponents that bind to AlPc NPS defines intensity, lifetime, and spectral distribution of the fluorescence. This study aimed to investigate the peculiarities of nanophotosensitizer capturing in 3D models of cell cultures. The data obtained demonstrate that AlPc NPs are captured by cells inside the spheroid in the course of the first hour, as the fluorescent signal's growth shows. Having analyzed the fluctuations of the fluorescence signal of AlPc NPs inside a spheroid, we have also discovered that the cellular 3D models are heterogeneous. Laser irradiation (two-photon excitation at λ = 780/390 nm) resulted in photobleaching of fluorescence, which is probably associated with AlPc NP deactivation. Thus, the created model comprised of a 3D cell culture and AlPc NPs provides a better insight into metabolic processes in cells than monolayer 2D cell cultures. Besides, the model allows to evaluate the photodynamic effect depending on phenotypic properties of various areas in the heterogeneous 3D-structure.

Keywords: aluminum phthalocyanine, nanoparticles, nanophotosensitizer, multicellular tumor spheroid, laser scanning microscopy

Funding: the study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Agreement RFMEFI61618X0096 #14.616.21.0096 of February 12, 2018).

✉ **Correspondence should be addressed:** Yuliya S. Maklygina
Vavilova 38, Moscow, 119991; us.samsonova@physics.msu.ru

Received: 26.06.2018 **Accepted:** 23.10.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.079

Наночастицы (НЧ), в основе которых лежат молекулярные нанокристаллы фотосенсибилизаторов (ФС), являются многообещающими агентами для флуоресцентной диагностики (ФД) и фотодинамической терапии (ФДТ). Нанокристаллы фталоцианина алюминия (AlPc) обладают преимуществом над молекулярными ФС, используемыми в клиниках ввиду значительно более высокой селективности накопления наноразмерных материалов [1–4]. Более того, молекулы, из которых они состоят, способны флуоресцировать только в мономерной форме при взаимодействии с биологическими структурами, предоставляя таким образом достаточную для ФД эффективность детектирования [1, 2]. Тип взаимодействия, интенсивность, время жизни, а также спектр флуоресценции зависят от фенотипа взаимодействующих клеток. Интенсивность флуоресценции НЧ AlPc значительно выше в патологической ткани (воспаленной или злокачественной) по сравнению с нормальной [1, 2]. Более того, НЧ AlPc можно рассматривать как зонды для использования в тераностике, поскольку они обладают флуоресценцией и фотодинамической активностью.

Исследования *in vitro* новых противоопухолевых агентов, особенно ФС, в первую очередь опираются на исследование фототоксичности с использованием выделенных клеточных линий. Общепринятые двумерные клеточные культуры (2D-культуры) имеют быстрый неограниченный рост и не позволяют моделировать сложность и гетерогенность *in vivo* опухолей. Очевидно, что *in vivo* опухоли растут в трехмерной (3D) структуре со специфичной организацией и архитектурой, которую клеточный 2D-монослой не способен воспроизвести [5–7]. Клеточные 3D-культуры считаются более аккуратной и воспроизводимой моделью для осуществления исследования лекарственных препаратов *in vitro*. Эта модель обладает рядом признаков, характерных опухолям *in vivo*, таким как наличие внеклеточного матрикса, межклеточного взаимодействия, гипоксии, глубокого проникновения препаратов и сопротивления [8–10]. Следовательно, сфероидная *in vitro* модель является промежуточными этапом между 2D-исследованием *in vitro* и исследованием на животных моделях [11–13].

Целью работы было разработать модель, основанную на многоклеточных 3D-сфероидах, для исследования накопления и распределения НЧ AlPc.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Многоклеточные сфероиды выращивали путем засевания 10^4 клеток HeLa в планшет с 96 колодцами, предварительно покрытыми 1%-й агарозой. Среду в культуре клеток сфероида меняли каждые 2–3 суток. По достижению 140 ± 20 мкм в диаметре после 7 дней сфероиды использовали в эксперименте. В качестве ФС использовали НЧ фталоцианина алюминия, или НЧ AlPc (d ~ 100 нм, c = 10 мкг/мл). Исследование флуоресценции AlPc после различного времени инкубации производили методами лазерной сканирующей конфокальной микроскопии. Для микроскопии сфероиды промывали дважды предварительно нагретым натрий-фосфатным буфером (PBS). Все изображения получали при помощи лазерного сканирующего микроскопа LSM-710-NLO (Zeiss; Германия). Использовали объектив 20× с числовой апертурой (NA) = 1.4. ФС фталоцианин алюминия (НИОПИК; Россия) готовили для исследования сфероидной модели. Поликристаллический порошок AlPc добавляли в дистиллированную воду в концентрации 1 мг/мл. Полученную взвесь диспергировали в ультразвуковом гомогенизаторе SONOPLUS HD2070 (Bandelin; Германия) с насадкой KE76 (20 кГц, амплитуда 165 мкм) [2]. Используя многоугловой спектрометр динамического рассеяния света Photocor Complex (Photocor; Россия), определили, что средний диаметр частиц в водном коллоиде составлял 100–150 нм. Коллоид AlPc (в концентрации 10 мкг/мл) добавляли в среду с моделью сфероида для моделирования условий взаимодействия клеток опухоли с НЧ ФС. Основным свойством НЧ AlPc является способность к фотоактивации. Базовый коллоид НЧ AlPc не люминесцировал при возбуждении в полосу поглощения (на длине волны 633 нм и при двухфотонном возбуждении на 780 нм), т. е. нанокристаллы ФС в свободной форме не проявляли фотоактивности. Таким образом, коллоид НЧ AlPc изначально не был фотоактивным и не проявлял флуоресцентных свойств. Однако при взаимодействии НЧ AlPc с клетками в результате процессов метаболизма, происходящих в клетках, НЧ становятся фотоактивными (λ_{fl} ~ 670 нм при возбуждении на λ_{ex} ~ 633 нм и двухфотонном нелинейном возбуждении на 780 нм для более глубокого сканирования среза).

Эксперимент состоял из следующих этапов (рис. 1):

1) В начале эксперимента 10 сфероидов перенесли на чашку Петри. Коллоид НЧ AlPc добавили к 10 сфероидам в концентрации 10 мкг/мл. Инкубировали ФС при 37 °C в течение 15 мин в темноте.

2) В течение последующей инкубации автофлуоресценцию возбуждали лазером 488 нм, одновременно с этим флуоресценцию НЧ AlPc возбуждали лазером 633 нм в сканирующем лазерном микроскопе. Флуоресцентный сигнал переставал расти после 1 ч инкубации с НЧ.

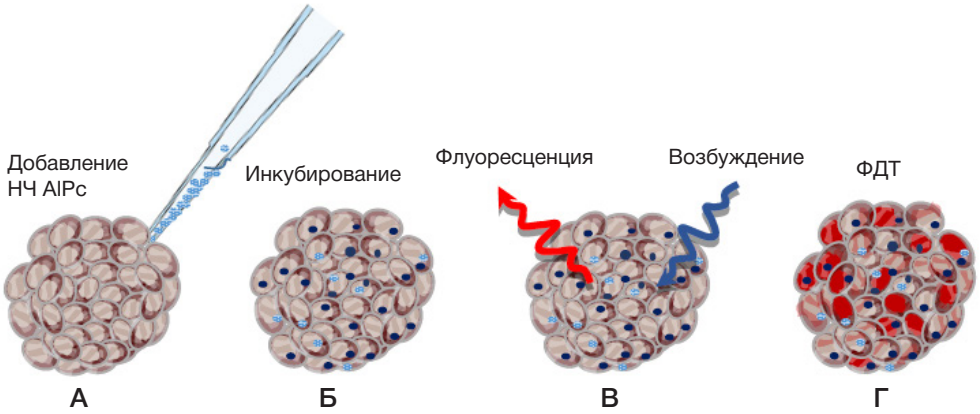


Рис. 1. Последовательная схема эксперимента со сфероидными моделями и НЧ AlPc

3) После этого сфероиды промывали дважды с PBS и рассматривали в флуоресцентном микроскопе. Флуоресцентные изображения получали с поверхности сфероида с использованием 20× объектива. После инкубации НЧ ФС фотоактивность НЧ была достаточной для ФД и ФДТ. Исходя из этого, обнаруженные зоны интереса облучали лазером с длиной волны 780/390 нм (двухфотонное возбуждение) после анализа накопления ФС.

4) Лазерное возбуждение проводили на длине волны 780/390 нм (двухфотонное возбуждение). Продолжительность лазерного воздействия адаптировали для каждого сеанса облучения. Оценку фотодинамического эффекта осуществляли путем окрашивания акридином оранжевым (АО) для определения здоровых клеток (MolecularProbes®; США) и бромистым этидием (ЕВ) для определения мертвых клеток (MolecularProbes®; США). Сфероиды в PBS, предварительно отмытые от клеточной среды, для окрашивания инкубировали в растворе красителей в течение 5 мин. Окрашенные сфероиды из планшета с 96 лунками для *in vitro* культур переносили на чашки Петри (толщина стекла 0,17 мм) с раствором PBS. Распределение флуоресцентного сигнала АО/ЕВ исследовали методами конфокальной микроскопии. Возбуждение флуоресценции АО производили лазером на длине волны 488 нм, его же флуоресценцию регистрировали в диапазоне длин волн 495–545 нм. Возбуждение флуоресценции ЕВ производили лазером на длине волны 561 нм, его же флуоресценцию регистрировали в диапазоне 580–690 нм. В результате получили флуоресцентные изображения АО (зеленый) и ЕВ (красный) в режиме проходящего света. Этот пошаговый подход позволил моделировать условия взаимодействия клеток опухоли с НЧ ФС в первый час и процессы ФД и ФДТ с НЧ AlPc *in vivo*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Захват НЧ AlPc оценивали в течение 1 ч. Значительное накопление наблюдали первые 30 мин (рис. 2А–В). После 40 мин инкубации флуоресцентный сигнал достиг плато без значительного дальнейшего изменения (рис. 2Г–Е). Усиление флуоресценции НЧ AlPc в пространстве и времени позволило отслеживать распределение ФС. Первые 15 мин аккумуляцию НЧ AlPc можно было наблюдать в периферических регионах. Именно периферические клетки имели доступ к НЧ и в первую очередь принимали участие в эндоцитозе. Только после 15 мин инкубации начали образовываться первые участки захвата НЧ. С течением времени они быстро неупорядоченно росли в центр сфероида (рис. 2В, Г). Непотревоженный участок при этом уменьшился до одной области с минимальным захватом НЧ в центре (рис. 2Д). Временная и пространственная динамика захвата НЧ AlPc, описанная выше, может быть объяснена гетерогенностью клеток в 3D-модели по метаболическим процессам и фенотипам. Иначе, захват НЧ AlPc наблюдался бы как однородный на периферии с небольшим концентрическим спадом в сторону центра сфероида.

Численная оценка захвата ФС в различных участках была получена за счет записи спектров флуоресценции (рис. 3). Перед началом анализа стоит ввести величину, называемую эквивалентным диаметром, которая в условиях неидеальной сферичности определяется как диаметр круга в 150 мкм (средний диаметр сфероида). Работу вели, предполагая, что площадь сфероида имеет то же значение, что и площадь поперечного сечения сфероида. Таким образом, полный флуоресцентный сигнал с участка был оцифрован и определены вклады от автофлуоресценции и флуоресценции НЧ AlPc (рис. 3А, Б). Сигнал автофлуоресценции измеряли в диапазоне 430–630 нм при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 488 нм. Максимум флуоресценции НЧ AlPc имеет длину волны 670 нм при возбуждении лазерным излучением с длиной волны 633 нм (рис. 3). Анализ спектров от концентрических участков среза показал, что захват НЧ AlPc уменьшается с ростом автофлуоресценции от периферии к центру сфероида (рис. 3Г).

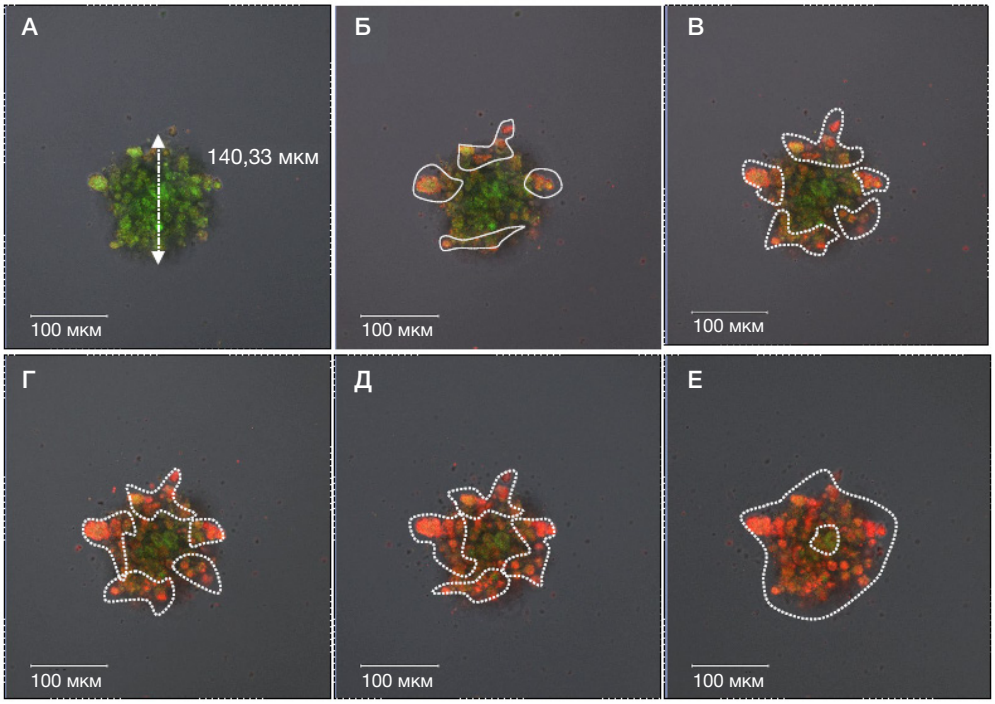


Рис. 2. Изображение разгорания флуоресценции НЧ AlPc с течением времени. Возбуждение автофлуоресценции (*показано зеленым*) с λ_{ex} ~ 488 нм и флуоресценции НЧ AlPc (*показано красным*) с λ_{ex} ~ 633 нм: 15 мин (**А**); 20 мин (**Б**); 30 мин (**В**); 40 мин (**Г**); 50 мин (**Д**); 1 ч (**Е**)

Распределение захвата НЧ ФС с учетом только флуоресцентного сигнала было представлено в виде четырех сечений для удобного восприятия (рис. 4), что также демонстрирует максимум захвата ФС на периферии с локальным минимумом в центре.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оценка способности к проникновению вглубь сфероида и фототоксичность НЧ AlPc были проверены методом конфокальной лазерной микроскопии. Полученное разнообразие захвата НЧ в различных участках сфероида свидетельствует о гетерогенности сфероидной модели по фенотипу клеток. Это предположение подтверждается разницей в фототоксическом эффекте в различных участках сфероида, обусловленной наличием кислорода. С этой точки зрения, данная модель для исследования захвата и фотоиндуцированной токсичности НЧ AlPc очень схожа с опухолями *in vivo* [14–15]. Такой результат можно объяснить различием в метаболитических процессах в клетках. Действительно, согласно предыдущим исследованиям, апоптотическое ядро начинает формироваться в сфероидах диаметром приблизительно 150–200 мкм [16]. Аналогично опухолям *in vivo* многоклеточные сфероиды включают гипоксическую и апоптотическую/некротическую области, возникающие как результат формирования кислородного и питательного градиентов. Стоит заметить, что в сфероидах гипоксия возникает постепенно по мере роста сфероида [17]. Таким образом, наличие градиента захвата НЧ AlPc может

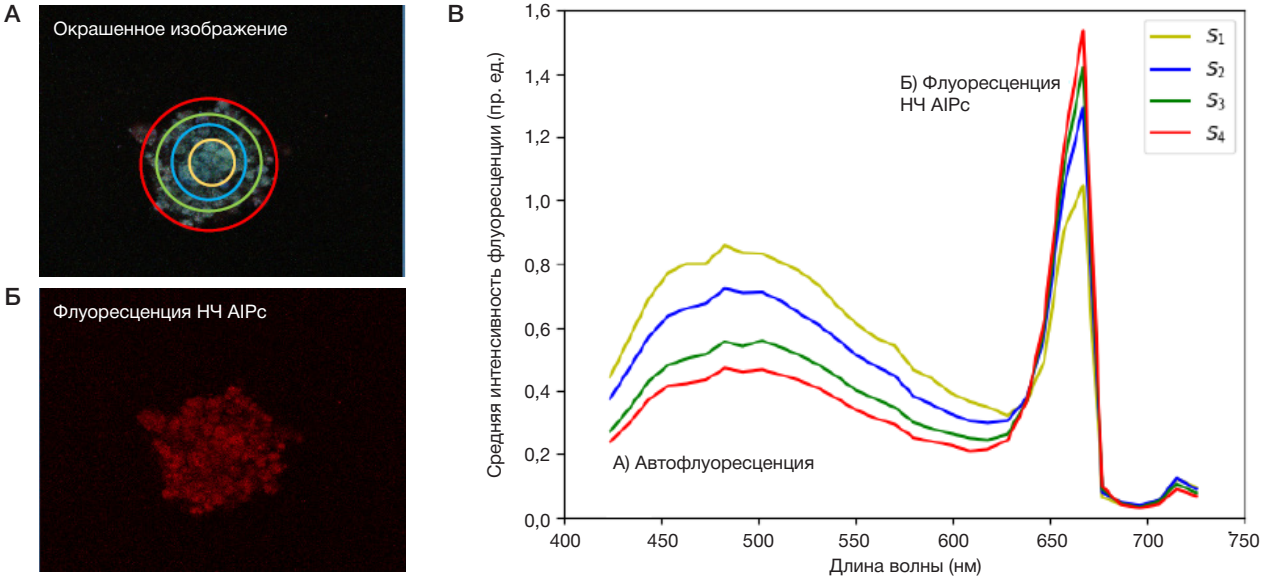


Рис. 3. Численное разделение сигналов: (**А**) флуоресцентное изображение, переведенное в RGB цветовую палитру; (**Б**) распределение флуоресценции НЧ AlPc; (**В**) спектры флуоресценции с цветом кривой, соответствующим цвету выделенной области. Спектры нормированы на площадь поверхности каждой области

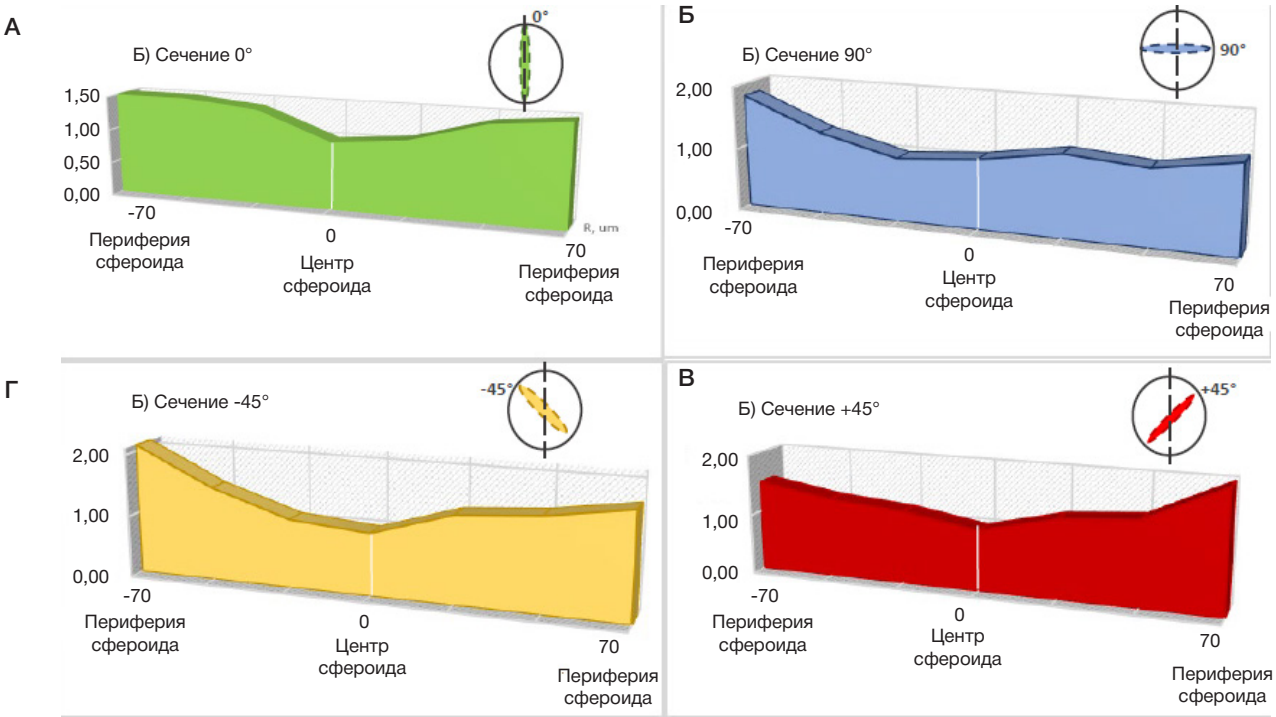


Рис. 4. Графическое представление захвата НЧ AlPc в четырех сечениях сфероида: (**А**) 0°; (**Б**) 90°; (**В**) 45°; (**Г**) –45°. Значения рассчитаны только с учетом флуоресценции ФС $\lambda_{флуоресценции}$ 670 нм (λ_{ex} ~ 633 нм), без автофлуоресценции клеток

быть объяснено существованием градиента питательных веществ и различий в фенотипе в клетках 3D-модели. Степень доступности молекулярного кислорода в различных участках можно оценить по скорости спада флуоресцентного сигнала во время фотодинамического облучения с тем условием, что фототоксичность зависит только от наличия молекулярного кислорода. Фотовоздействие приводит к переносу энергии в результате тушения флуоресценции ФС, а также провоцирует производство активных форм кислорода, приводящих к гибели клеток. Участки со значительным фотодинамическим эффектом были определены путем сравнения флуоресценции НЧ AlPc до и после сеанса ФДТ. Анализируя участки сфероида, можно заметить, что остаточный сигнал флуоресценции ФС наблюдался только в центре, в то время как в остальных областях он отсутствовал (рис. 5). Это может быть связано с гетерогенной структурой сфероида, с различной доступностью глубоких участков для облучающего света и с различной пролиферативной активностью клеток. В частности, отсутствие молекулярного кислорода в центральной области сфероида может приводить к ограниченному фотодинамическому воздействию с частичным спадом флуоресценции. Таким образом, градиент кислорода в сфероидах может быть косвенно оценен в ходе анализа эффектов фототоксичности ФС. Он также лежит в основе свойств опухолей *in vivo*, таких как гипоксия.

Фототоксичность была оценена по жизнеспособности клеток сфероидов после окрашивания и выявления живых и мертвых клеток. Это было продемонстрировано в сравнении с окраской первичных сфероидов и выявлением живых клеток (рис. 6А). Живые клетки были обнаружены после ФДТ только в центре сфероида (рис. 6Б), мертвые клетки занимали основной объем (рис. 6Б). Окрашивание, характеризующее жизнеспособность клеток, равномерно по всему объему 3D-модели, поскольку не учитывает метаболических процессов, происходящих в клетках в различных слоях сфероида.

Высокое накопление ФС и глубина проникновения являются самыми важными характеристиками для оценки противоопухолевой эффективности препарата. Эти характеристики нужно учитывать при исследовании новых ФС. Более того, основной причиной неполного уничтожения опухоли служит неоднородное распределение ФС. Поэтому особенно важно комплексное исследование пространственного и временного процесса распределения ФС в тканях. Сфероидные модели позволяют моделировать проникновение и внутриопухолевый транспорт НЧ ФС. На сегодняшний день было исследовано большое количество НЧ для эффективной и целевой доставки ФС. Недостатком некоторых наноносителей является ограниченное проникновение, но можно предположить, что размер НЧ тоже имеет большое значение [18–19]. Таким образом, можно заключить, что НЧ AlPc являются многообещающими ФС с высокой фототоксичностью, которые позволяют косвенно оценить распределения кислорода в тканях, клеточный фенотип и проводить анализ метаболических процессов в клетках. В то же время по оценке флуоресценции AlPc видно, что многоклеточные 3D-модели обладают такими характерными признаками опухолей *in vivo*, как межклеточное взаимодействие, гипоксия, градиент кислорода и градиент питательных веществ. Мы предполагаем, что сфероидная модель *in vitro* является хорошей платформой для исследования наноразмерных лекарств, включая ФС, до испытаний

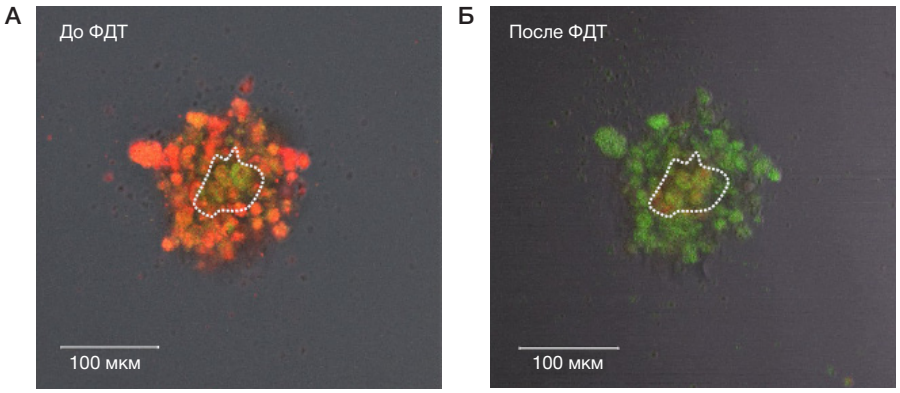


Рис. 5. Сравнение флуоресценции AlPc до ФДТ (**А**) и после ФДТ (**Б**). Возбуждение автофлуоресценции на λ ~ 488 нм, возбуждение НЧ AlPc на λ ~ 633 нм

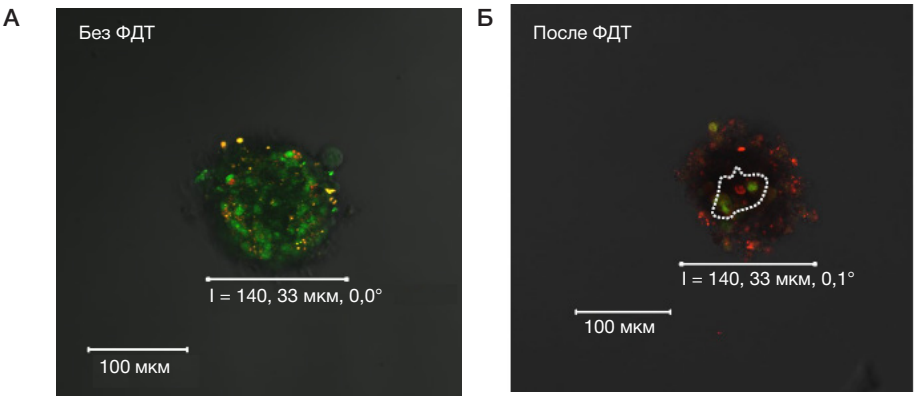


Рис. 6. Анализ жизнеспособности клеток после ФДТ, окраска акридином оранжевым (*зеленый цвет* — живые клетки) (**А**) и бромистым этидием (*красный цвет* — мертвые клетки) (**Б**). Возбуждение флуоресценции АО проводили при воздействии лазерного излучения с длиной волны 488 нм, возбуждение флуоресценции ЕВ проводили при воздействии лазерного излучения с длиной волны 561 нм

на животных моделях, в которых необходимо учитывать также иммунный ответ [20–24].

ВЫВОДЫ

В работе продемонстрировано преимущество использования НЧ AlPc в качестве ФС и многофункционального флуоресцентного зонда. НЧ AlPc имеют достаточную способность накапливаться, распределяться и проникать в сфероиды. С помощью микроскопических методик показано, что, несмотря на достаточное накопление, фотодинамическая активность НЧ AlPc зависит от биоокружения. В особенности НЧ AlPc позволили оценить гетерогенность опухолевой модели и косвенно определить концентрацию кислорода, фенотип клеток, составляющих 3D-модель, а также метаболические процессы в клетках. Это одни из самых важных параметров для специфической местной нанофототераностики. Полученные результаты могут быть полезны для исследования других клеточных моделей, например ко-культурных сфероидов, которые учитывают также иммунный ответ.

Литература

1. Breymayer J, Rück A, Ryabova AV, Loschenov VB, Steiner RW. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles. Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2014; 11(3): 380–90.
2. Vasilchenko SYu, Volkova AI, Ryabova AV, Loschenov VB, Konov VI, Mamedov AA et al. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantology. J Biophoton. 2010; 3 (5–6): 336–46.
3. Chiarante N, García Vior MC, Awruch J, Marino J, Roguin LP. Phototoxic action of a zinc (II) phthalocyanine encapsulated into poloxamine polymeric micelles in 2D and 3D colon carcinoma cell cultures. J Photochem Photobiol B. 2017; 170: 140–51.
4. Waite CL, Roth CM. Nanoscale drug delivery systems for enhanced drug penetration into solid tumors: current progress and opportunities. Crit Rev Biomed Eng. 2012; 40: 21–41.
5. Kumari P, Jain S, Ghosh B, Zorin V, Biswas S. Polylactide-Based Block Copolymeric Micelles Loaded with Chlorin e6 for Photodynamic Therapy: In Vitro Evaluation in Monolayer and 3D Spheroid Models. Mol Pharm. 2017 Nov 6; 14 (11): 3789–800.
6. Patel NR, Aryasomayajula B, Abouzeid AH, Torchilin VP. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. Ther Deliv. 2015; (6): 509–20.
7. Khanna S, Bhatt AN, Dwarakanath BS. Chapter 11 — multicellular spheroid: 3-D tissue culture model for cancer research A2. In: Ashish S Verma, Singh A, editors. Animal Biotechnology. San Diego: Academic Press, 2014; 195–210.
8. Kimlin LC, Casagrande G, Virador VMю In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. Mol Carcinog. 2013; (52): 167–82.
9. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. J Cell Sci. 2012; (125): 3015–24.
10. Wartenberg M et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. FASEB J. 2003; (17): 503–5.
11. Evans CL. Three-dimensional in vitro cancer spheroid models for photodynamic therapy: strengths and opportunities. Front Phys. 2015; 3 (15): 1–7.
12. Yakavets I, Yankovsky I, Millard M, Lamy L, Lassalle HP, Wiehe A et al. The alteration of temoporfin distribution in multicellular tumor spheroids by β-cyclodextrins. Int J Pharm. 2017; 529 (1–2): 568–75.
13. Ricketts KP, Cheema U, Nyga A, Castoldi A, Guazzoni C, Magdeldin T et al. A 3D in vitro cancer model as a platform for nanoparticle uptake and imaging investigations. 2014; 10 (19): 3954–61.
14. Kapinus VN, Kaplan MA, Yaroslavtseva-Isayeva EV, Spichenkova IS. Photodynamic therapy for head and neck basal cell skin cancer with additional interstitial laser irradiation. Biomedical Photonics. 2017; 6 (4): 20–6.
15. Abraham JA, Golubnitschaja O. Time for paradigm change in management of hepatocellular carcinoma: is a personalized approach on the horizon? Per Med. 2016; 13 (5): 455–67.
16. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. J Biotechnol. 2010; (148): 3–15.
17. Josef LB, Boyle RW. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. Theranostics. 2012; (2): 916–66.
18. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc. 2006; (1): 2315–9.
19. Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. J Natl Cancer Inst. 2006; (98): 335–44.
20. Dobiasova M, Urbanova Z, Samanek M Relations between particle size of HDL and LDL lipoproteins and cholesterol esterification rate. Physiol Res Acad Sci Bohemoslov. 2005; (54): 159–65.
21. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. Nat Rev Immunol. 2015; 15 (2): 73–86.
22. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. Trends Immunol. 2016; 37 (3): 208–20.
23. Long L, Yin M, Min W. 3D Co-culture System of Tumor-associated Macrophages and Ovarian Cancer. Cells Bio Protoc. 2018; 8 (8).
24. Sherman H, Gitschier HJ, Rossi AE. A novel three-dimensional immune oncology model for high-throughput testing of tumoricidal activity. Front Immunol. 2018 Apr 23; (9): 857.

References

1. Breymayer J, Rück A, Ryabova AV, Loschenov VB, Steiner RW. Fluorescence Investigation of the Effect of Monocytes/Macrophages and Skin Cells on Aluminium Phthalocyanine Nanoparticles. Journal Photodiagnosis and Photodynamic Therapy. 2014; 11(3): 380–90.
2. Vasilchenko SYu, Volkova AI, Ryabova AV, Loschenov VB, Konov VI, Mamedov AA et al. Application of aluminum phthalocyanine nanoparticles for fluorescent diagnostics in dentistry and skin autotransplantology. J Biophoton. 2010; 3 (5–6): 336–46.
3. Chiarante N, García Vior MC, Awruch J, Marino J, Roguin LP. Phototoxic action of a zinc (II) phthalocyanine encapsulated into poloxamine polymeric micelles in 2D and 3D colon carcinoma cell cultures. J Photochem Photobiol B. 2017; 170: 140–51.
4. Waite CL, Roth CM. Nanoscale drug delivery systems for

enhanced drug penetration into solid tumors: current progress and opportunities. Crit Rev Biomed Eng. 2012; 40: 21–41.
5. Kumari P, Jain S, Ghosh B, Zorin V, Biswas S. Polylactide-Based Block Copolymeric Micelles Loaded with Chlorin e6 for Photodynamic Therapy: In Vitro Evaluation in Monolayer and 3D Spheroid Models. Mol Pharm. 2017 Nov 6; 14 (11): 3789–800.
6. Patel NR, Aryasomayajula B, Abouzeid AH, Torchilin VP. Cancer cell spheroids for screening of chemotherapeutics and drug-delivery systems. Ther Deliv. 2015; (6): 509–20.
7. Khanna S, Bhatt AN, Dwarakanath BS. Chapter 11 — multicellular spheroid: 3-D tissue culture model for cancer research A2. In: Ashish S Verma, Singh A, editors. Animal Biotechnology. San Diego: Academic Press, 2014; 195–210.
8. Kimlin LC, Casagrande G, Virador VMю In vitro three-dimensional (3D) models in cancer research: an update. Mol Carcinog. 2013; (52): 167–82.
9. Baker BM, Chen CS. Deconstructing the third dimension: how 3D culture microenvironments alter cellular cues. J Cell Sci. 2012; (125): 3015–24.
10. Wartenberg M et al. Regulation of the multidrug resistance transporter P-glycoprotein in multicellular tumor spheroids by hypoxia-inducible factor (HIF-1) and reactive oxygen species. FASEB J. 2003; (17): 503–5.
11. Evans CL. Three-dimensional in vitro cancer spheroid models for photodynamic therapy: strengths and opportunities. Front Phys. 2015; 3 (15): 1–7.
12. Yakavets I, Yankovsky I, Millard M, Lamy L, Lassalle HP, Wiehe A et al. The alteration of temoporfin distribution in multicellular tumor spheroids by β-cyclodextrins. Int J Pharm. 2017; 529 (1–2): 568–75.
13. Ricketts KP, Cheema U, Nyga A, Castoldi A, Guazzoni C, Magdeldin T et al. A 3D in vitro cancer model as a platform for nanoparticle uptake and imaging investigations. 2014; 10 (19): 3954–61.
14. Kapinus VN, Kaplan MA, Yaroslavtseva-Isayeva EV, Spichenkova IS. Photodynamic therapy for head and neck basal cell skin cancer with additional interstitial laser irradiation. Biomedical Photonics. 2017; 6 (4): 20–6.
15. Abraham JA, Golubnitschaja O. Time for paradigm change in management of hepatocellular carcinoma: is a personalized approach on the horizon? Per Med. 2016; 13 (5): 455–67.
16. Hirschhaeuser F, Menne H, Dittfeld C, West J, Mueller-Klieser W, Kunz-Schughart LA. Multicellular tumor spheroids: an underestimated tool is catching up again. J Biotechnol. 2010; (148): 3–15.
17. Josef LB, Boyle RW. Unique diagnostic and therapeutic roles of porphyrins and phthalocyanines in photodynamic therapy, imaging and theranostics. Theranostics. 2012; (2): 916–66.
18. Franken NAP, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C. Clonogenic assay of cells in vitro. Nat Protoc. 2006; (1): 2315–9.
19. Dreher MR, Liu W, Michelich CR, Dewhirst MW, Yuan F, Chilkoti A. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. J Natl Cancer Inst. 2006; (98): 335–44.
20. Dobiasova M, Urbanova Z, Samanek M Relations between particle size of HDL and LDL lipoproteins and cholesterol esterification rate. Physiol Res Acad Sci Bohemoslov. 2005; (54): 159–65.
21. Kitamura T, Qian BZ, Pollard JW. Immune cell promotion of metastasis. Nat Rev Immunol. 2015; 15 (2): 73–86.
22. Kumar V, Patel S, Tcyganov E, Gabrilovich DI. The Nature of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Tumor Microenvironment. Trends Immunol. 2016; 37 (3): 208–20.
23. Long L, Yin M, Min W. 3D Co-culture System of Tumor-associated Macrophages and Ovarian Cancer. Cells Bio Protoc. 2018; 8 (8).
24. Sherman H, Gitschier HJ, Rossi AE. A novel three-dimensional immune oncology model for high-throughput testing of tumoricidal activity. Front Immunol. 2018 Apr 23; (9): 857.

МАГНИТНО-РЕЗОНАНСНАЯ ТОМОГРАФИЯ ДЛЯ ПЕРСОНАЛИЗИРОВАННОЙ ОЦЕНКИ И ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ДОСТАВКИ НАНОФОРМУЛЯЦИЙ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ПРЕПАРАТОВ

В. А. Науменко[1]✉, А. С. Гаранина[1,2], С. С. Водопьянов[1], А. А. Никитин[1,2], А. О. Преловская[1], Е. И. Демихов[4], М. А. Абакумов[1,3], А. Г. Мажуга[1,2,5], В. П. Чехонин[3]

[1] Лаборатория биомедицинских наноматериалов, Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

[2] Научно-исследовательская лаборатория тканеспецифических лигандов, Химический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[3] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

[4] Физический институт имени П. Н. Лебедева Российской академии наук, Москва

[5] Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва

Магнитно-резонансная томография (МРТ) широко используется для диагностики онкологических заболеваний, а также для исследования доставки препаратов на магнитных наноносителях. Накопление наночастиц в опухоли высоко вариабельно в популяции и зависит от биологических факторов, которые во многом остаются неизученными. В последние годы было высказано предположение о возможности использования МРТ для предсказания ответа на терапию наноформулированными препаратами на основе скрининговых данных о накоплении в опухоли магнитно-контрастных диагностикумов. Несмотря на то что пилотные испытания указывают на принципиальную возможность предложенного подхода, существует ряд концептуальных проблем и технических ограничений для внедрения технологии в клинику. В статье обсуждаются преимущества и недостатки методов, позволяющих стратифицировать опухоли по степени накопления наночастиц. Дальнейшие исследования в данной области позволят разработать эффективные алгоритмы индивидуального лечения противоопухолевыми препаратами, доставляемыми на наночастицах.

Ключевые слова: противоопухолевая терапия, магнитно-резонансная томография, наночастицы, персонализированная медицина

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ в рамках ФЦП «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы», соглашение от 27.09.2017 г. № 14.575.21.0147 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI57517X0147).

✉ **Для корреспонденции:** Виктор Алексеевич Науменко
Ленинский проспект, д. 4, г. Москва, 119049; naumenko.vict@gmail.com

Статья получена: 30.08.2018 **Статья принята к печати:** 25.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.086

MAGNETIC RESONANCE IMAGING FOR PREDICTING PERSONALIZED ANTITUMOR NANOMEDICINE EFFICACY

Naumenko VA[1]✉, Garanina AS[1,2], Vodopyanov SS[1], Nikitin AA[1,2], Prelovskaya AO[1], Demikhov EI[4], Abakumov MA[1,3], Majouga AG[1,2,5], Chekhonin VP[3]

[1] Biomedical Nanomaterials Laboratory, National University of Science and Technology MISIS, Moscow

[2] Tissue-specific Ligands Research Laboratory, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow

[3] Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

[4] Lebedev Physical Institute, Russian Academy of Sciences, Moscow

[5] Mendeleyev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

Magnetic resonance imaging (MRI) is widely used to diagnose cancer and study patterns and effectiveness of nanocarrier delivery of anticancer drugs. Accumulation of nanoparticles in a tumor varies widely in a given population; it is also highly dependent on biological factors, which remain largely unstudied. In recent years, there was developed a hypothesis that suggests that MRI can be used to predict response to nanoformulations-based anticancer therapy since it provides data on accumulation of MRI contrast agents in the tumor. Pilot tests prove feasibility of the approach based on this hypothesis, however, there is a number of conceptual and technical problems and limitations that hamper its introduction into the routine clinical practice. This article discusses the advantages and disadvantages of methods to stratify tumors by level of nanoparticles accumulation. Further research in this field would facilitate development of effective algorithms of personalized treatment with anticancer drugs delivered by nanoparticles.

Keywords: anticancer therapy, magnetic resonance imaging, nanoparticles, personalized medicine

Funding: the study was financially supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation under the Federal Targeted Programme for Research and Development in Priority Areas of Development of the Russian Scientific and Technological Complex for 2014–2020, Agreement #14.575.21.0147 of 27.09.2017 (Agreement ID RFMEFI57517X0147).

✉ **Correspondence should be addressed:** Victor A. Naumenko
Leninsky 4, Moscow, 119049; naumenko.vict@gmail.com

Received: 30.08.2018 **Accepted:** 25.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.086

Онкологические заболевания являются одной из основных причин смертности, потери трудоспособности, снижения качества жизни пациентов и сопряженных с этим экономических потерь. Низкая эффективность традиционных методов лечения злокачественных новообразований (радикальная операция, химио- и лучевая терапия) диктует необходимость поисков новых подходов к решению проблемы. Основными мировыми трендами в области диагностики и лечения злокачественных новообразований являются: 1) внедрение высокоинформативных методов диагностики онкопатологии; 2) разработка новых препаратов и способов их доставки в опухоль; 3) переход к персонализированной медицине.

Использование наночастиц (НЧ) представляется перспективным во всех перечисленных концепциях [1]. Во-первых, магнитные НЧ (МНЧ) успешно используются для диагностики опухолевых заболеваний методом магнитно-резонансной томографии (МРТ). Во-вторых, уже одобрены к клиническому использованию несколько наноформуляций для доставки в опухоль химиотерапевтических препаратов (липосомы, полимерные мицеллы, НЧ на основе альбумина). На пересечении диагностического и терапевтического потенциала НЧ возникает возможность использования их для предсказания эффективности лечения у отдельных пациентов. Основная идея применения лабораторно-инструментальных методов исследования в алгоритме персонализированной терапии наноформулированными противоопухолевыми препаратами (НПП) представлена на рис. 1. Для принятия решения о тактике лечения предлагается проводить скрининг опухолей на эффективность накопления наноносителей. В зависимости от результатов исследования (например, оценки степени накопления магнитного диагностикума в опухоли методом МРТ) можно составить прогноз накопления терапевтического препарата. Гипотеза заключается в том, что опухоли с эффективным накоплением контрастного диагностикума дадут более выраженный ответ на терапию нанопрепаратом.

Необходимость индивидуального прогноза обусловлена несколькими причинами. Во-первых, с точки зрения эффективности лечения, НПП следует назначать тогда, когда EPR-эффект (повышенная проницаемость кровеносных сосудов и сниженный лимфатический дренаж) обеспечивает аккумуляцию необходимой концентрации действующего вещества в опухоли. В противном случае перед назначением НПП необходимо использовать терапевтические стратегии, повышающие проницаемость опухолевых сосудов, например местную вазодилатацию путем нагревания, введения оксида азота, простагландинов (рис. 1). Доставка в опухоль может быть улучшена путем повышения артериального давления при введении ангиотензина II или коллагеназа-опосредованного разрушения опухолевого матрикса [2]. Наконец, недостаточность пассивного накопления препарата в опухоли можно преодолеть за счет использования НЧ с адресной доставкой [3, 4]. Во-вторых, с фармаэкономической точки зрения, при одинаковой эффективности противоопухолевого препарата в наноформуляции и без нее предпочтение должно отдаваться последнему, так как его себестоимость на несколько порядков ниже (например, стоимость 20 мг доксорубицина составляет 540 р., доксила — 42 300 р.).

Исследование прогностических факторов эффективности доставки противоопухолевых препаратов

На сегодняшний день в мировой практике отсутствуют клинические алгоритмы индивидуальной оценки EPR-эффекта и связанной с ним эффективности применения НПП. Однако в последние годы за рубежом запущены доклинические и клинические испытания, направленные на решение указанной проблемы.

В одной из работ на животной модели оценивали возможность использования магнитных частиц (ферумокситола) для определения эффективности лечения наноформулированным паклитакселом. После разделения животных на группы по степени выраженности EPR-эффекта на основании МРТ были показаны убедительные различия в уровне гибели опухолевых клеток и эффективности ответа на терапию в указанных группах [5]. В 2017 г. вышли первые результаты клинического исследования, в котором для оценки эффективности наноформулированного иринотекана у 13 пациентов с солидными опухолями использовали МРТ-данные о доставке в опухоль МНЧ

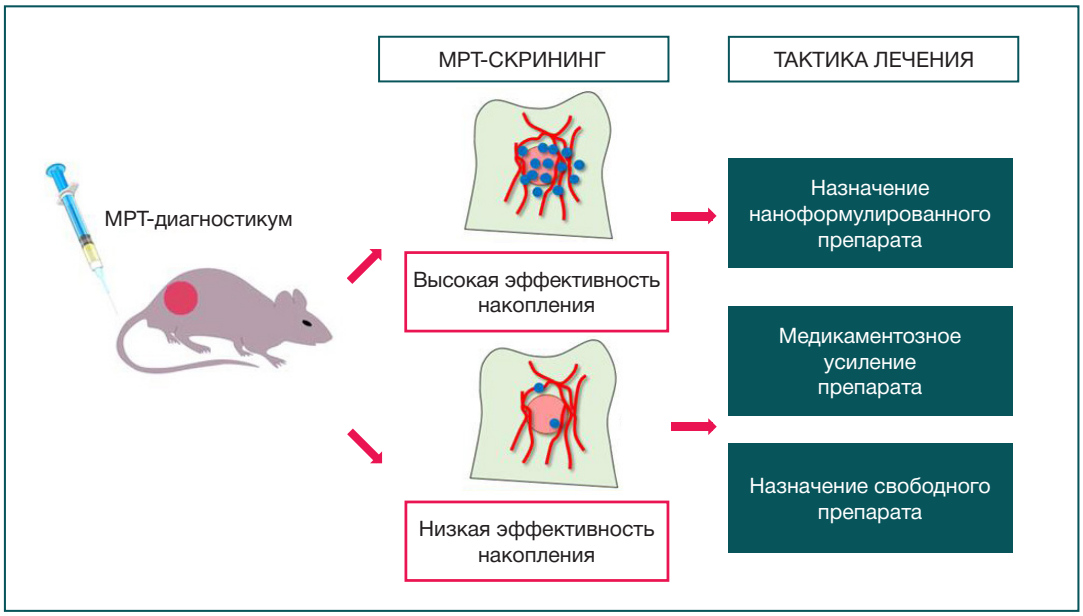


Рис. 1. Алгоритм персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки НПП на животной модели

(ферумокситола). Было показано, что высокие уровни накопления ферумокситола через 1–24 ч после введения коррелировали с уменьшением опухолевых очагов на фоне терапии [6]. Недостатком предложенного подхода является значительная разница в физических свойствах диагностических и терапевтических НЧ (в частности, их размер составлял 23 нм и 110 нм соответственно). Хорошо известно, что доставка НЧ в опухоль зависит от их гидродинамического размера: чем меньше частицы, тем эффективнее их экстравазация и перфузия в опухоли [7]. Проведение интравитальной микроскопии (ИВМ) для оценки фармакокинетики ферумокситола и PGLA-ПЭГ показало различия в скорости и локусах накопления двух типов НЧ с различным размером [5].

Прогноз эффективности лечения липосомным доксорубицином рака молочной железы у крыс оценивали путем маммографии после введения иодинсодержащих липосом размером 100 нм [8]. На основании данных о накоплении контрастного вещества в опухоли удалось выделить группу животных с хорошим прогнозом лечения, что подтвердилось впоследствии. К сожалению, эффективность данного подхода была показана только на одной опухолевой модели. Предложенный метод основан на использовании рентгенологического исследования, уступающего по своей чувствительности и безопасности МРТ, что ограничивает перспективы его внедрения в клиническую практику.

Представляют интерес результаты клинического исследования, в котором оценивали корреляцию между накоплением в опухоли ^{64}Cu-меченых HER2-направленных ПЭГ-модифицированных липосом, содержащих доксорубицин, и эффективностью терапии у 19 пациентов с HER2-позитивным метастатическим раком молочной железы. Детекцию радиоактивно меченных НЧ проводили методом позитронно-эмиссионной и компьютерной томографии. Высокий уровень накопления меченых частиц коррелировал с положительным ответом на терапию [9]. Дизайн данного исследования был первоначально направлен на решение другой задачи — оценку эффективности лечения рака молочной железы липосомным доксорубицином с трастузумабом в сочетании с циклофосфамидом. В связи с этим представляется затруднительной интерпретация вклада сопутствующих факторов в результаты эксперимента. Кроме того, объективно оценить применимость подхода не позволяло испытание лишь одной опухолевой модели.

Сходные данные получены в серии исследований с использованием наноформуляций доксорубицина, меченных радиоактивным технецием. На животной модели была показана корреляция интенсивности сигнала в опухоли по данным однофотонной эмиссионной компьютерной томографии с накоплением препарата в экстрагированных опухолях [10]. Эффективность данного подхода нашла подтверждение в клиническом испытании, где $^{(99m)}$Tc-меченый липосомный доксорубицин вводили 35 пациентам с мезотелиомой. Накопление препарата в опухоли коррелировало с ответом на лечение [11]. Однако технические сложности, связанные с использованием радиоактивных материалов, а также отсутствие необходимого оснащения в большинстве лечебно-профилактических учреждений ограничивают трансляционный потенциал данного подхода.

Для оценки EPR-эффекта наряду с использованием методов *in vivo* визуализации предложены генные, белковые и клеточные прогностические маркеры. Например, накопление липосом можно предсказать на основе соотношения металлопротеиназы 9 (MMP9) к тканевому ингибитору металлопротеиназы 1 (TIMP1) [12, 13]. Кроме того, исследуют возможность использования факторов роста эндотелиальных клеток (VEGFA) и фибробластов (FGF2), интерлейкинов (IL6, IL8), пептидов (эндостатин), а также клеток (эндотелиальных и их предшественников) в качестве маркеров EPR-эффекта [14, 15].

Проблемы и перспективы использования МРТ в прогностических алгоритмах противоопухолевой терапии

Наиболее перспективными нам представляются прогностические подходы, основанные на *in vivo* визуализации, которые были выполнены на животных моделях и вошли в стадию клинических испытаний. В отличие от анализа биомаркеров, в этих неинвазивных методах используют имеющиеся в лечебно-профилактических учреждениях оборудование и контрастные диагностикумы. К тому же МРТ обладает преимуществом перед радиоактивными и рентгенологическими методами оценки EPR-эффекта в силу своей безопасности и доступности. Однако существует ряд концептуальных проблем и технических ограничений, стоящих на пути создания технологии персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки НПП:

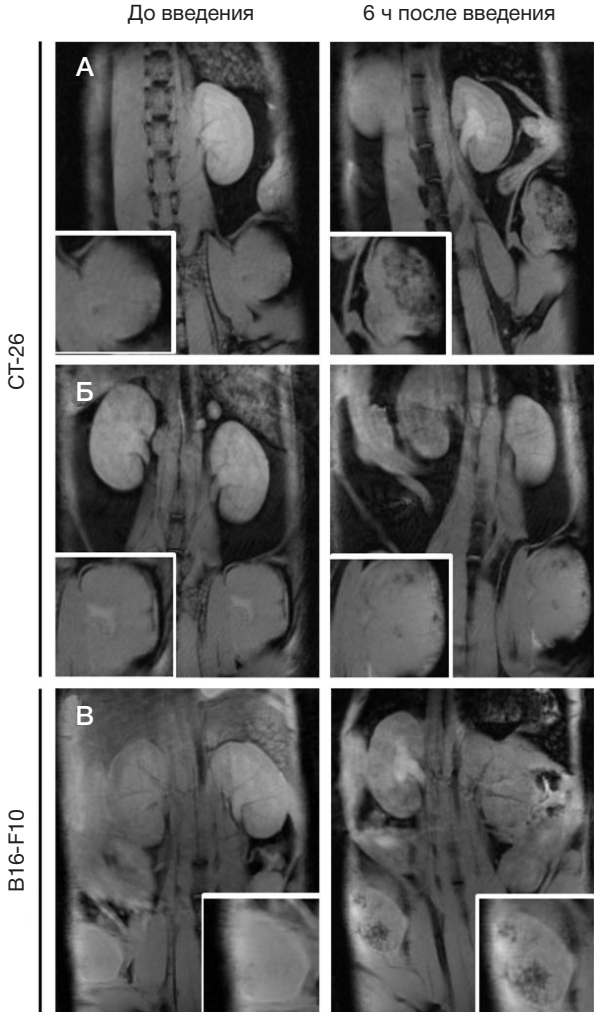


Рис. 2. Гетерогенность EPR-эффекта: внутригрупповая (**А–Б**); между разными моделями опухолей (**А–В**)

1) в качестве диагностических и терапевтических препаратов используют НЧ различной природы [5];

2) не исследована возможность того, что введение первой (диагностической) дозы наноформуляции может оказывать влияние на введение второй (терапевтической) дозы;

3) не исследованы временные изменения EPR-эффекта в одной и той же опухоли, что может определять различия в накоплении первой и второй дозы НЧ;

4) в большинстве случаев исследования выполнены ретроспективно на небольшой выборке с использованием одного типа опухоли;

5) исследования не связаны с прямой оценкой EPR-эффекта, а потому не позволяют исключить влияние сопутствующих факторов (например, сопутствующей противоопухолевой терапии).

Для всесторонней оценки гетерогенности EPR-эффекта и факторов, ее определяющих, необходимо исследование разных моделей (аллографтных и ксенографтных, ортотопических и гетеротопических) и типов опухолей. Внутригрупповая неоднородность может быть оценена путем анализа различий в накоплении частиц у разных животных в рамках одной опухолевой модели. Исследования, выполненные в нашей лаборатории с использованием магнитно-контрастных НЧ, показали, что МРТ может быть использована для оценки степени выраженности EPR-эффекта как для различных опухолевых моделей, так и для различных животных (рис. 2). На основе полученных данных возможно ранжирование животных на прогностические группы с последующей оценкой терапевтической эффективности нанопрепаратов. Неоднородность накопления НЧ также может быть связана с эволюцией опухолевых сосудов и изменением архитектоники тканей, что диктует необходимость оценки EPR-эффекта на разных этапах канцерогенеза.

Важным этапом внедрения в клинику индивидуального подхода к терапии нанопрепаратами является сравнение накопления первой и второй дозы НЧ. Во-первых, должны совпадать физико-химические свойства диагностических и терапевтических НЧ. Во-вторых, нельзя исключить, что введение первой дозы может оказывать влияние на последующие введения НЧ, например, за счет активации их захвата моноцитами/макрофагами — феномена, показанного ранее для последовательного введения онколитических вирусов. Наконец, описана возможность транзиторных изменений EPR-эффекта в одной и той же опухоли, что необходимо учитывать при оценке предсказательной силы первой дозы. Для моделирования биораспределения двух доз могут быть использованы НЧ, конъюгированные с разными красителями. ИВМ позволит оценить экстравазацию, диффузию, динамику накопления и клеточные мишени первой и второй доз в опухолевом микроокружении. Перспективным представляется также последовательное использование МРТ и ИВМ. Первый метод позволит осуществить скрининг опухолей с высоким и низким уровнями накопления НЧ, тогда как второй позволит исследовать клеточные механизмы, лежащие в основе различий EPR-эффекта.

ВЫВОДЫ

Концепция использования неинвазивных методов и МНЧ для создания индивидуальных терапевтических алгоритмов в онкологии представляется перспективной и реалистичной. Использование современных методов исследования механизмов, определяющих степень накопления НЧ в опухоли, а также валидация МРТ как скринингового метода на животных моделях послужат основой для последующего внедрения в клиниескую практику технологии персонализированной оценки и прогнозирования эффективности доставки НПП.

Литература

1. Shi J et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nat Rev Cancer. NIH Public Access, 2017; 17 (1): 20–37.
2. Prabhakar U et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. Cancer Res. 2013; 73 (8): 2412–17.
3. Davis ME et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. Nature. 2010; 464 (7291): 1067–70.
4. Hrkach J et al. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. Sci Transl Med. 2012; 4 (128): 128ra39.
5. Miller MA et al. Predicting therapeutic nanomedicine efficacy using a companion magnetic resonance imaging nanoparticle. Sci Transl Med. 2015; 7 (314): 314ra183.
6. Ramanathan RK et al. Correlation between Ferumoxytol Uptake in Tumor Lesions by MRI and Response to Nanoliposomal Irinotecan in Patients with Advanced Solid Tumors: A Pilot Study. Clin Cancer Res. 2017; 23 (14): 3638–48.
7. Wilhelm S et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. Nat Rev Mater. 2016; 1 (5): 16014.
8. Karathanasis E et al. Imaging nanoprobe for prediction of outcome of nanoparticle chemotherapy by using mammography. Radiology. 2009; 250 (2): 398–406.
9. Lee H et al. 64Cu-MM-302 Positron Emission Tomography Quantifies Variability of Enhanced Permeability and Retention of Nanoparticles in Relation to Treatment Response in Patients with Metastatic Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2017; 23 (15): 4190–02.
10. Head HW et al. Combination radiofrequency ablation and intravenous radiolabeled liposomal Doxorubicin: imaging and quantification of increased drug delivery to tumors. Radiology. 2010; 255 (2): 405–14.
11. Arrieta O et al. A phase II trial of prolonged, continuous infusion of low-dose gemcitabine plus cisplatin in patients with advanced malignant pleural mesothelioma. Cancer Chemother Pharmacol. 2014; 73 (5): 975–82.
12. Yokoi K et al. Capillary-Wall Collagen as a Biophysical Marker of Nanotherapeutic Permeability into the Tumor Microenvironment. Cancer Res. 2014; 74 (16): 4239–46.
13. Yokoi K et al. Serum biomarkers for personalization of nanotherapeutics-based therapy in different tumor and organ microenvironments. Cancer Lett. 2014; 345 (1): 48–55.
14. Sessa C et al. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? Nat Clin Pract Oncol. 2008; 5 (7): 378–91.
15. Sherwood LM, Parris EE, Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. N Engl J Med. 1971; 285 (21): 1182–6.

References

1. Shi J et al. Cancer nanomedicine: progress, challenges and opportunities. Nat Rev Cancer. NIH Public Access, 2017; 17 (1): 20–37.
2. Prabhakar U et al. Challenges and key considerations of the enhanced permeability and retention effect for nanomedicine drug delivery in oncology. Cancer Res. 2013; 73 (8): 2412–17.
3. Davis ME et al. Evidence of RNAi in humans from systemically administered siRNA via targeted nanoparticles. Nature. 2010; 464 (7291): 1067–70.
4. Hrkach J et al. Preclinical development and clinical translation of a PSMA-targeted docetaxel nanoparticle with a differentiated pharmacological profile. Sci Transl Med. 2012; 4 (128): 128ra39.
5. Miller MA et al. Predicting therapeutic nanomedicine efficacy using a companion magnetic resonance imaging nanoparticle. Sci Transl Med. 2015; 7 (314): 314ra183.
6. Ramanathan RK et al. Correlation between Ferumoxytol Uptake in Tumor Lesions by MRI and Response to Nanoliposomal Irinotecan in Patients with Advanced Solid Tumors: A Pilot Study. Clin Cancer Res. 2017; 23 (14): 3638–48.
7. Wilhelm S et al. Analysis of nanoparticle delivery to tumours. Nat Rev Mater. 2016; 1 (5): 16014.
8. Karathanasis E et al. Imaging nanoprobe for prediction of outcome of nanoparticle chemotherapy by using mammography. Radiology. 2009; 250 (2): 398–406.
9. Lee H et al. 64Cu-MM-302 Positron Emission Tomography Quantifies Variability of Enhanced Permeability and Retention of Nanoparticles in Relation to Treatment Response in Patients with Metastatic Breast Cancer. Clin Cancer Res. 2017; 23 (15): 4190–02.
10. Head HW et al. Combination radiofrequency ablation and intravenous radiolabeled liposomal Doxorubicin: imaging and quantification of increased drug delivery to tumors. Radiology. 2010; 255 (2): 405–14.
11. Arrieta O et al. A phase II trial of prolonged, continuous infusion of low-dose gemcitabine plus cisplatin in patients with advanced malignant pleural mesothelioma. Cancer Chemother Pharmacol. 2014; 73 (5): 975–82.
12. Yokoi K et al. Capillary-Wall Collagen as a Biophysical Marker of Nanotherapeutic Permeability into the Tumor Microenvironment. Cancer Res. 2014; 74 (16): 4239–46.
13. Yokoi K et al. Serum biomarkers for personalization of nanotherapeutics-based therapy in different tumor and organ microenvironments. Cancer Lett. 2014; 345 (1): 48–55.
14. Sessa C et al. Biomarkers of angiogenesis for the development of antiangiogenic therapies in oncology: tools or decorations? Nat Clin Pract Oncol. 2008; 5 (7): 378–91.
15. Sherwood LM, Parris EE, Folkman J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. N Engl J Med. 1971; 285 (21): 1182–6.

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ПРИРОДА ГКР-СПЕКТРОВ СУСПЕНЗИИ *E. COLI* ПРИ ДЛИНАХ ВОЛН ВОЗБУЖДЕНИЯ 532 И 785 НМ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЗОЛЕЙ НАНОЧАСТИЦ СЕРЕБРА В КАЧЕСТВЕ ГКР-СУБСТРАТОВ

Е. А. Дурович[1], Е. Г. Евтушенко[1,2] ✉, О. В. Сенько[1], Н. А. Степанов[1], Е. Н. Ефременко[1], А. В. Еременко[2], И. Н. Курочкин[1,2]

[1] Химический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[2] Институт биохимической физики имени Н. М. Эмануэля РАН, Москва

Вопрос о молекулярной природе спектров гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) бактерий является ключевым для оценки перспектив их дискриминации и идентификации данным методом в целях клинической диагностики, обеспечения безопасности пищевых продуктов и др. Ранее было показано, что при использовании в качестве ГКР-субстрата агрегированных и покрытых слоем SiO_2 золотых наночастиц на твердой поверхности источником спектра при длине волны возбуждения 785 нм является смесь шести пуриновых производных (аденина, гуанина, АМФ, гипоксантина, ксантина и мочевой кислоты), выделяемая клетками в раствор. Целью настоящей работы было показать применимость данной интерпретации спектров на примере суспензии клеток *Escherichia coli* штамма DH5α для другого класса ГКР-субстратов — золей наночастиц серебра при длинах волн возбуждения 785 и 532 нм. Золи получали восстановлением нитрата серебра хлоридом гидроксиламина в щелочной среде, среднечисловой размер частиц составил 43 ± 2 нм. Выявлены две важные особенности: во-первых, спектр пуриновых метаболитов регистрируется только при наличии живых клеток; во-вторых, при использовании золей наночастиц серебра в качестве ГКР-субстрата спектрам даже одного и того же штамма присуща значительная вариативность вследствие изменения соотношения концентраций пуриновых метаболитов, выделяемых клетками в раствор.

Ключевые слова: ГКР-спектры бактерий, *E. coli*, наночастицы серебра, пуриновые производные

✉ **Для корреспонденции:** Евгений Геннадиевич Евтушенко
Ленинские горы, д. 1, стр. 3, г. Москва, 119991; evtushenko@enzyme.chem.msu.ru

Статья получена: 15.08.2018 **Статья принята к печати:** 09.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.088

MOLECULAR ORIGIN OF SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTRA OF *E. COLI* SUSPENSIONS EXCITED AT 532 AND 785 NM USING SILVER NANOPARTICLE SOLS AS SERS SUBSTRATES

Durovich EA[1], Evtushenko EG[1,2] ✉, Senko OV[1], Stepanov NA[1], Efremenko EN[1], Eremenko AV[2], Kurochkin IN[1,2]

[1] Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia

[2] Emanuel Institute of Biochemical Physics of RAS, Moscow, Russia

Research into the molecular origin of surface-enhanced Raman spectra (SERS) of bacteria is a crucial step in assessing the future of SERS-based discrimination and identification of bacteria in clinical analysis, food quality control, etc. Previous studies have revealed that at 785 nm excitation wavelength SERS of bacterial cells placed on a solid surface functionalized with *in-situ* grown aggregated gold nanoparticles covered with SiO_2 originate from a mixture of 6 purine derivatives (adenine, guanine, AMP, hypoxanthine, xanthine, and uric acid) that are released by the cells into the medium. The aim of the present work was to investigate whether such interpretation is possible with a different class of SERS substrates: silver nanoparticle sols at excitation wavelengths of 785 and 532 nm. The suspension of the *Escherichia coli* DH5α strain was used as a model bacterium. Sols of silver nanoparticles were obtained by reducing silver nitrate in the presence of alkaline hydroxylamine hydrochloride. Number-weighted mean hydrodynamic diameter of the particles was 43±2 nm. We confirm that at both excitation wavelengths the spectra can be best described as a superposition of 4 purine derivatives: adenine, guanine, hypoxanthine, and xanthine. Importantly, we have discovered that 1) the spectra of the purine mixture are characteristic of viable cells only; 2) due to the variations in the concentrations of purine metabolites released by the cells into the surrounding medium the spectra of a bacterial strain can vary significantly when a silver nanoparticle sol is used as a SERS substrate.

Keywords: SERS of bacteria, *E. coli*, silver nanoparticles, purines

✉ **Correspondence should be addressed:** Evgeniy G. Evtushenko
Leninskie gory 1, bl. 3, Moscow, 119991; evtushenko@enzyme.chem.msu.ru

Received: 15.08.2018 **Accepted:** 09.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.088

Явление гигантского комбинационного рассеяния (ГКР), заключающееся в значительном усилении интенсивности полос в спектрах комбинационного рассеяния (КР) при нахождении интересующих молекул вблизи наноструктурированной поверхности металла, в течение последних десятилетий привлекает внимание исследователей, разрабатывающих биоаналитические платформы и методики. Интерес к данному методу детектирования обусловлен простотой его аппаратного оформления, экспрессностью, возможностью локального анализа, потенциальной мультиплексностью и возможностью достижения высокой чувствительности. Используемые металлические наноструктуры,

называемые ГКР-субстратами, разделяют на два основных класса: наноструктуры на твердых поверхностях и коллоидные растворы (золи) металлических наночастиц.

Первые ГКР-спектры бактерий с использованием возбуждающего лазера с длиной волны 514,5 нм наблюдали на примере *Escherichia coli* и *Bacillus megaterium* [1]. Вскоре было выявлено, что при использовании длин волн возбуждения (ДВВ) 488 и 514,5 нм ГКР-спектры различных грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также выделенных клеточных мембран практически не отличаются друг от друга и представляют собой ГКР-спектр рибофлавина в восстановленной или окисленной форме [2–4]. Благодаря перекрыванию этих ДВВ с полосой поглощения рибофлавина реализуются условия резонансного усиления его спектра [3]. Рибофлавин в форме различных кофакторов окислительно-восстановительных ферментов и электрон-транспортных белков локализован в мембранах бактериальных клеток, что обеспечивает его близость к поверхности металла как в случае адсорбции клеток на твердых ГКР-субстратах, так и при адсорбции или синтезе металлических наночастиц на поверхности клеток [3, 4]. С биоаналитической точки зрения это означает, что использование коротковолновых лазеров (488 и 514,5 нм) не позволяет проводить дискриминацию/идентификацию бактерий.

В то же время при использовании длинноволновых источников возбуждения, прежде всего 785 нм, в ГКР-спектрах бактериальных клеток отсутствуют характерные полосы рибофлавина. Более того, спектры разных видов, а в ряде случаев и штаммов бактерий различаются между собой, а также между нативными и инактивированными препаратами одного штамма [5–7]. Этот факт позволил уже в середине 2000-х гг. выдвинуть гипотезу о возможности детектирования и дискриминации бактериальных видов/штаммов на основе их ГКР-спектров при данной ДВВ. Такой подход можно было бы с успехом применять для быстрого обнаружения и типирования патогенных бактерий в клинических образцах, пищевых продуктах, объектах окружающей среды. Однако молекулярная природа регистрируемых спектров на протяжении длительного времени оставалась неясной. По аналогии с коротковолновыми лазерами, предполагалось, что источниками полос служат молекулы, локализованные в клеточной оболочке бактерий: слизистом слое, капсуле, клеточной стенке или мембране. Предложения считать источником полос N-ацетил-D-глюкозамин [6], аминокислотные остатки, пептиды, простетические группы белков, фосфолипиды, метаболиты (например, глюкозу или ацетоуксусную кислоту), ДНК и ее компоненты аденин и гуанин [5, 7–13] были несостоятельны, так как ограничивались интерпретацией отдельных полос, но не всего спектра в целом, что вызывало сомнения в корректности таких предположений. В отсутствие четкой молекулярной интерпретации в данной научной области в течение длительного времени главенствовал формальный математический подход, основанный на снижении размерности экспериментальных данных (спектров) при помощи метода главных компонент с последующим использованием различных модификаций дискриминантного и кластерного анализа с целью демонстрации возможности различать бактерии разных родов, видов или штаммов на основании их ГКР-спектров [6, 12–15].

В 2016 г. было убедительно показано, что источником ГКР-спектров всех 10 исследованных бактериальных препаратов при ДВВ 785 нм являются 6 пуриновых производных (аденин, гуанин, аденозинмонофосфат, гипоксантин, ксантин и мочевая кислота), выделяемых бактериями во внеклеточную среду [16]. Такая интерпретация кардинально сужает применимость ГКР-спектров бактерий для их идентификации/дискриминации, поскольку различия в спектрах вызваны не широким разнообразием молекул на поверхности клеток, а всего лишь 6 секретируемыми клетками пуриновыми производными. Было, например, показано, что ГКР-спектр мутанта *E. coli* с неактивным геном аденозиндезаминазы и, как следствие, не содержащего гипоксантин, гораздо ближе к спектру *Staphylococcus aureus*, нежели к спектру родительского штамма *E. coli*. Такие результаты были получены для ДВВ 785 нм и ГКР-субстратов в виде агрегированных золотых наночастиц, нанесенных на твердую поверхность и покрытых тонким слоем диоксида кремния. Целью нашей работы было проверить данные выводы, во-первых, на принципиально ином типе ГКР-субстратов, а именно золях серебряных наночастиц, и, во-вторых, изучить молекулярную природу ГКР-спектров бактерий при ДВВ 532 нм, являющейся промежуточной между областью доминирования рибофлавина (488, 514.5 нм) и инфракрасной областью (785, 1064 нм).

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве модельного штамма использовали *E. coli* DH5α (Thermo Fisher Scientific; США). Культивирование клеток проводили на жидкой питательной среде, состоящей из 10,0 г/л триптона (Difco; США), 5,0 г/л дрожжевого экстракта (Difco; США), 10,0 г/л NaCl х. ч. (Химмед; Россия) с pH 6,8, при 37 °C в течение 14–16 ч до начала стационарной фазы роста. В литературе подчеркивается важность тщательной отмывки клеток от компонентов культуральной среды [17], поэтому использовали следующую процедуру: клетки осаждали при 8000 об./мин в течение 7 мин с использованием центрифуги Beckman J-2-21 (Beckman Coulter; США). Осадок отмывали равным объемом 0,9% раствора NaCl. Процедуру осаждения-промывки повторяли 2 раза. Полученную биомассу разбавляли 0,9% раствором NaCl в объеме, необходимом для получения суспензии с концентрацией клеток $1 \cdot 10^8$ кл./мл. Концентрацию определяли по мутности суспензии клеток при длине волны 540 нм.

Частичную инактивацию бактерий проводили путем нагрева суспензий клеток при 70 °C или 90 °C в течение 1 ч на водяной бане. В качестве показателя степени инактивации измеряли концентрацию внутриклеточного АТФ люциферин-люциферазным методом с использованием набора реагентов и калибровочных стандартов (Люмтек; Россия).

В качестве ГКР-субстрата использовали золь наночастиц серебра (НЧС), получаемый путем восстановления нитрата серебра гидрохлоридом гидроксиламина с использованием $AgNO_3$ ч. д. а. (Sigma-Aldrich; США), $NH_2OH{\bullet}HCl$ ч (Prime Chemicals Group; Россия), NaOH ч. д. а. (Мосреактив; Россия). В соответствии с рекомендациями авторов оригинальной методики [18] раствор нитрата серебра приливали к щелочному раствору гидроксиламина, конечные концентрации реагентов в смеси составляли 1 мМ $AgNO_3$, 1,5 мМ $NH_2OH{\bullet}HCl$, 3 мМ NaOH. Полученные золи использовали не более 3 дней с момента получения.

Характеризацию НЧС проводили при помощи регистрации спектров поглощения в УФ-видимой области (300–750 нм) на кюветном спектрофотометре UV-1800

(Shimadzu; Япония), а также с использованием метода анализа траекторий наночастиц на приборе Nanosight LM10 HS-BF (Nanosight Ltd; Великобритания).

Для всех бактериальных препаратов, как нативных, так и инактивированных, ГКР-спектры регистрировали в день получения препарата. До измерения препараты хранили при +4 °C. Непосредственно перед измерением аликвоту препарата дважды центрифугировали при 3700 об./мин в течение 5 мин на центрифуге Biofuge A (Heraeus Sepatech; Германия) и промывали равным объемом деионизированной воды. Полученную суспензию клеток в воде смешивали с золем НЧС в соотношении 1 : 1, инкубировали 1 мин и добавляли раствор NaCl в конечной концентрации 40 мМ для агрегации наночастиц и усиления ГКР-сигнала. Полученный образец в количестве 260 мкл переносили в лунку алюминиевого планшета, использовавшегося для минимизации фонового сигнала и улучшения теплоотвода от измеряемого образца. С каждого образца регистрировали 3–4 повторных спектра, перемешивая образец в лунке пипетированием между измерениями.

При изучении динамики изменения спектров ГКР суспензии *E. coli* со временем 5 мл препарата были однократно переведены в воду по описанной выше методике. Полученный препарат хранили при +4 °C и в течение 4 ч отбирали аликвоты для регистрации ГКР-спектров.

Для получения фильтрата суспензии клеток использовали медленное фильтрование через шприцевую фильтрующую насадку SFNY030022S (Membrane Solutions; США) диаметром 30 мм и размером пор 0,22 мкм.

Для регистрации спектров КР при ДВВ 785 нм использовали КР-спектрометр innoRam BWS445(B)-785S (BWTek; США) с диапазоном измерения 64–3011 см$^{-1}$, разрешением 4 см$^{-1}$, диодным лазером 785 нм, объективом ×20 PL L 20/0.40. Условия получения спектров: мощность луча на образце — 42 мВт, время накопления сигнала — 5 с, количество автоматически усредняемых повторов — 20. Для регистрации спектров при ДВВ 532 нм использовали КР-спектрометр iRaman BWS415-532S (BWTek; США) с диапазоном измерения 174–4001 см$^{-1}$, разрешением 4 см$^{-1}$, диодным лазером 532 нм, объективом ×20 PL L 20/0.40. Условия получения спектров: мощность луча на образце — 20 мВт, время накопления сигнала — 5 с, количество автоматически усредняемых повторов — 20.

Обработку полученных спектров проводили с использованием программы OPUS 7.0 (Bruker Optik GmbH; Германия). Обработка включала в себя: выделение области спектра в диапазоне 500–1800 см$^{-1}$, вычитание базовой линии с использованием встроенного в программу инструмента Background correction. Определение положения и интенсивности полос проводили без дополнительного сглаживания спектров. При графическом представлении спектров их сглаживали инструментом Smooth с использованием рамки шириной 9 см$^{-1}$. При необходимости графической демонстрации качественных различий в серии спектров проводили их векторную нормировку, при необходимости сравнения интенсивностей спектров нормировку не использовали.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Золи НЧС, получаемые гидроксиламиновым методом [18], завоевали широкую популярность в качестве ГКР-субстрата благодаря простоте и воспроизводимости получения, а также высокой интенсивности регистрируемых с их помощью ГКР-спектров различных аналитов, в том числе бактериальных клеток [19–21]. Полученные нами препараты золей НЧС имеют желто-коричневый цвет, прозрачны и не содержат осадка. Они демонстрируют интенсивную широкую полосу поглощения в ближней УФ — синей области, соответствующую локализованному плазмонному резонансу НЧС с максимумом при 407–409 нм и поглощением в максимуме, меняющемся в пределах от 16,5 до 18 (с учетом разведения деионизованной водой в 30 раз при измерении). Среднечисловой гидродинамический диаметр частиц, измеренный методом анализа траекторий наночастиц для трех независимых партий НЧС, составил 43 ± 2 нм; суммарная концентрация частиц равна (8,0 ± 1,7) • 10^{11} частиц/мл. Полученные золи НЧС при агрегации раствором 40 мМ NaCl не имеют собственного ГКР-спектра при обоих значениях ДВВ, за исключением широкой низкоинтенсивной полосы материала планшета (алюминия) в области 1200–1700 см$^{-1}$. Эту полосу можно полностью удалить в виде базовой линии при обработке спектров.

Для изучения повторяемости ГКР-спектров нативных *E. coli* при ДВВ 785 нм были проведены: а) повторные измерения одного и того же образца, подготовленного для ГКР из одной аликвоты суспензии бактерий; б) измерения разных аликвот одного и того же препарата бактерий как с одним и тем же препаратом НЧС, так и с разными; в) измерения независимо культивированных и выделенных препаратов *E. coli* с одним и тем же препаратом наночастиц. В целом, измерения одного и того же бактериального препарата демонстрируют хорошую повторяемость (рис. 1А). В то же время ГКР-спектры независимых бактериальных препаратов подвержены значительным вариациям (рис. 1Б). Наибольшие различия наблюдаются в областях: 508–532, 655, 730–734, 958, 1450, 1570–1576 см$^{-1}$.

При исследовании динамики изменения ГКР-спектров *E. coli* при хранении в воде при +4 °C на временном интервале 4 ч (рис. 1В) с течением времени наблюдали медленный рост общей интенсивности спектра с изменением соотношения интенсивностей отдельных полос. Например, отношение I_{730} / I_{655} = 1,2 оставалось постоянным для всех значений времен, а отношение I_{1325} / I_{655} монотонно снижалось от начального значения, равного 1,6, до 1,0 при 4 ч хранения.

С целью изучения локализации молекул, ответственных за формирование ГКР-спектров, было проведено сравнение ГКР-спектра нативного препарата *E. coli* в воде с фильтратом (0,22 мкм) того же препарата (рис. 1Г). Учитывая продемонстрированные ранее медленные изменения, спектры аликвот исходной суспензии клеток были зарегистрированы по времени как до, так и после проведения фильтрования и регистрации спектров фильтрата. Все полосы спектра клеточной суспензии присутствовали и в спектре фильтрата. Более того, общая интенсивность спектра фильтрата была значимо выше.

Для ответа на вопрос, являются ли наблюдаемые ГКР-спектры признаком наличия жизнеспособных клеток *E. coli* или для их появления достаточно инактивированной бактериальной биомассы, было проведено сравнение ГКР-спектров нативных клеток и инактивированных нагреванием при 70 °C или 90 °C в течение 60 мин (рис. 2). Для всех трех препаратов была также измерена остаточная концентрация внутриклеточного АТФ, отражающая уровень жизнеспособности клеток. Она составила 1 • 10^{-9}, 5,6 • 10^{-12} и 4,1 • 10^{-12} моль на 1 мл суспензии клеток (для исходного препарата, 70 °C и 90 °C соответственно). В целом, как и

для разных партий бактерий, наблюдались значительные вариации числа и положения полос. Однако можно отметить тенденцию к снижению общей интенсивности спектра. Для практически полностью инактивированного препарата (90 °C) в спектре присутствовали лишь четыре полосы нативных *E. coli* крайне низкой интенсивности при 730, 1002, 1325 и 1450 см$^{-1}$, а также появлялись две низкоинтенсивные полосы амид III (1230–1270 см$^{-1}$) и амид I (1640–1680 см$^{-1}$).

Эксперименты по изучению повторяемости регистрации ГКР-спектров нативных препаратов *E. coli* были также проведены с использованием ДВВ, равной 532 нм. Необходимо отметить примерно в 2 раза более высокую интенсивность спектров при ДВВ 532 нм по сравнению с ДВВ 785 нм, что приводит к увеличению числа информативных полос и точности определения их положения. Так же как и в случае с ДВВ 785 нм, при 532 нм наблюдается высокая повторяемость спектров одной и

Таблица. Перечень всех наблюдаемых полос в ГКР-спектрах *E. coli*, включая фильтраты клеточных суспензий, и их отнесение в соответствии со спектрами пуриновых производных, приведенными в более ранней работе [16]. А — аденин, Г — гуанин, Гк — гипоксантин, Кс — ксантин

785 нм		532 нм		Отнесение
Положение полосы, см$^{-1}$	Частота встречаемости в спектрах, %	Положение полосы, см$^{-1}$	Частота встречаемости в спектрах, %	
502–515	75	502–512	50	Кс, Г
522–540	100	526	75	Г
		549–550	25	Гк, А
561–574	100			Кс, Г, А
621–633	50	617–623 (sh)	100	Гк, А, Г
653–667	100	648–651	100	Г, Кс, А
680–683	38			Кс, А
724–735	100	721–728	100	А, Гк
780–792	63	770	25	Гк
		788	25	А
838–842	38	833	25	Тирозин (?)
		848–850	50	
867–883	63	875–878	25	Г, Кс
925–930	38			Гк
958–966	100	952–955	100	Кс, Г, Гк, А
1002–1008	88	1000–1006	100	Фенилаланин (?), взаимодействие А + Гк + Кс (?)
1027–1033	25	1024–1027	100	Г, А, Гк
		1043–1045	75	Г, Кс
1084–1096	50	1085–1095	100	Гк
1115–1130	38	1129–1140	100	Кс, Г, А
1157–1160	25	1154	25	Гк
1175–1189	63			Г, А
1213–1215	25	1215–1233	100	Г, Гк, А
1245–1251	50	1242	25	Кс
1267–1276	25	1276	25	Г, А
1310–1315	25			Кс, А
1324–1334	63	1322–1325	75	Гк
		1330–1331	50	Гк
		1341	25	А
1362–1380	63	1371–1379	100	Г, Кс, Гк, А
1389–1390	13	1399	25	Кс, Гк
1444–1453	88	1444	25	Гк, Г, А
1464–1473	75	1457–1468	100	Гк, Г, Кс, А
1508	13	1506	25	Взаимодействие А + Гк + Кс (?)
1528–1534	25	1532–1538	100	Г, Гк, К
1568–1578	63	1567–1575	50	Г, А
1582–1591	25	1584–1595	25	Кс, Гк
1630–1721 (широкая)	75	1646	25	Г, А
		1692–1698	100	Кс, Гк, Г

той же аликвоты и одного и того же препарата бактерий (рис. 3А). Но ГКР-спектры независимо культивированных и выделенных партий бактерий тоже демонстрируют значительную вариативность (рис. 3Б).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты экспериментов при ДВВ 785 нм по повторяемости и динамике изменения ГКР-спектров *E. coli* при хранении в воде свидетельствуют о том, что формирование спектров определяет не индивидуальное соединение, а смесь небольшого числа компонентов, так как вся совокупность зарегистрированных спектров содержит лишь фиксированный набор полос (см. таблицу). Соотношения компонентов в данной смеси медленно меняются при хранении клеток в воде (рис. 1В) и значительно различаются для независимо культивированных нативных препаратов (рис. 1Б). Сравнение спектров нативного препарата и его фильтрата (рис. 1Г) свидетельствует о том, что данная смесь соединений не связана с поверхностью клеток, а присутствует в растворе. Более того, значимое повышение общей интенсивности спектра фильтрата по сравнению со спектром суспензии клеток позволяет предположить, что с точки зрения ГКР-регистрации клетки являются мешающим компонентом, например, за счет адсорбции доли частиц на их поверхности.

Эксперименты по инактивации клеток демонстрируют, что данная смесь соединений связана с уровнем жизнеспособности клеток (рис. 2), не являясь продуктом пассивной десорбции веществ с поверхности инактивированных клеток.

В таблице представлен перечень полос, наблюдавшихся во всех ГКР-спектрах нативных препаратов *E. coli*, включая эксперименты по фильтрованию клеток. Проанализировав различные варианты отнесения полос, описанные в литературе, мы пришли к выводу, что при ДВВ 785 нм практически все полосы можно приписать суперпозиции спектров 4 пуриновых производных (аденина, гуанина, гипоксантина и ксантина) в полном соответствии с выводами, сделанными в более ранней работе [16]. Кроме того, каждый отдельный ГКР-спектр соответствует суперпозиции сигналов этих соединений как по положению полос, так и по их интенсивности (рис. 4А). С учетом возможных небольших различий в относительных интенсивностях полос, связанных с различием ГКР-субстратов (в настоящей работе спектры получены с использованием золей НЧС, в референсной работе [16] — на агрегированных золотых наночастицах), а также сложения интенсивности при наложении полос отдельных соединений, качество описания является высоким. Не отнесенными остаются лишь три полосы низкой интенсивности: 838–842, 1002–1008 и 1508 см$^{-1}$. С одной стороны, можно предположить, что низкоинтенсивные полосы были потеряны при оцифровке спектров из литературных источников. С другой стороны, если данные полосы действительно не присутствуют в спектрах пуриновых производных, можно выдвинуть два предположения относительно их природы. Во-первых,

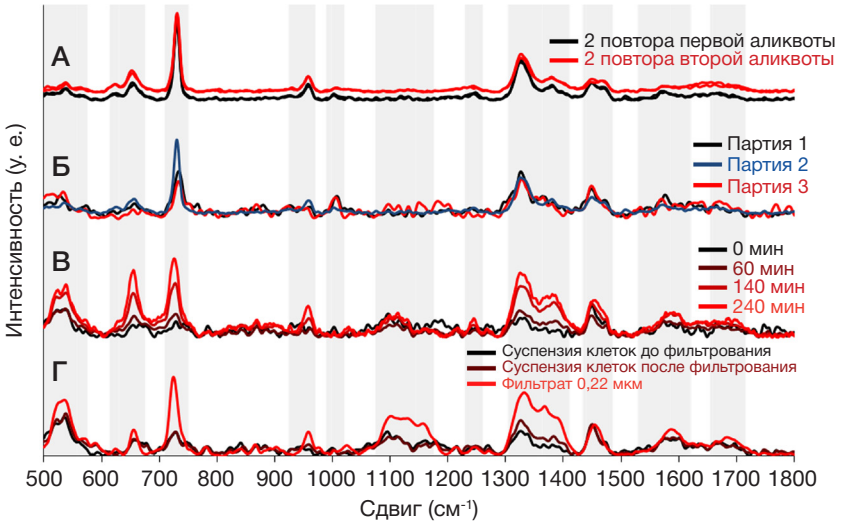


Рис. 1. ГКР-спектры суспензий *E. coli* при длине волны возбуждения 785 нм. **А**. Повторяемость измерений одной аликвоты и одной партии клеток. **Б**. Повторяемость спектров для независимых партий клеточных суспензий. **В**. Изменение спектров при хранении клеток в воде при +4 °С. **Г**. Сравнение спектров клеточной суспензии и фильтрата 0,22 мкм той же клеточной суспензии. Спектры (**А**, **Б**) векторно нормированы между собой, спектры (**В**, **Г**) для демонстрации различий в интенсивности не были нормированы. Серым фоном выделены области различий

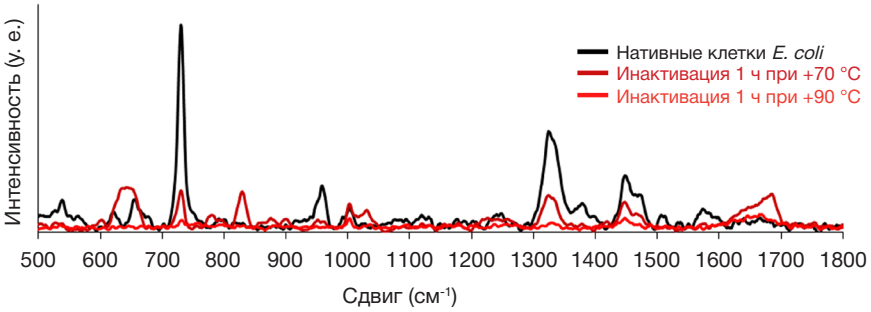


Рис. 2. Изменение ГКР-спектров суспензий *E. coli* (785 нм) при инактивации клеток нагреванием. Для демонстрации различий в интенсивности спектры не были нормированы между собой

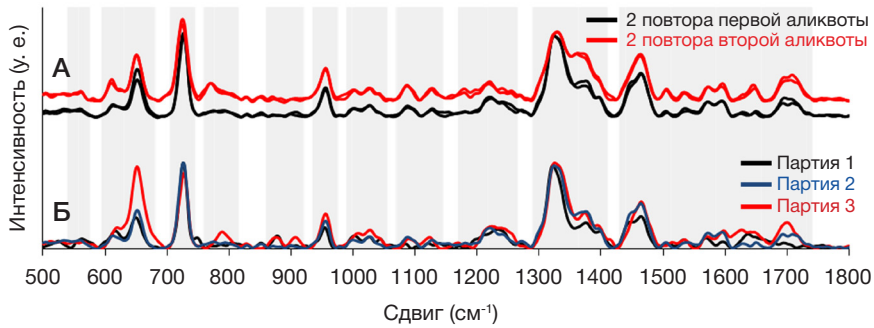


Рис. 3. ГКР-спектры суспензий *E. coli* при длине волны возбуждения 532 нм. **А**. Повторяемость измерений одной аликвоты и одной партии клеток. **Б**. Повторяемость спектров для независимых партий клеточных суспензий. Спектры векторно нормированы между собой. Серым фоном выделены области различий

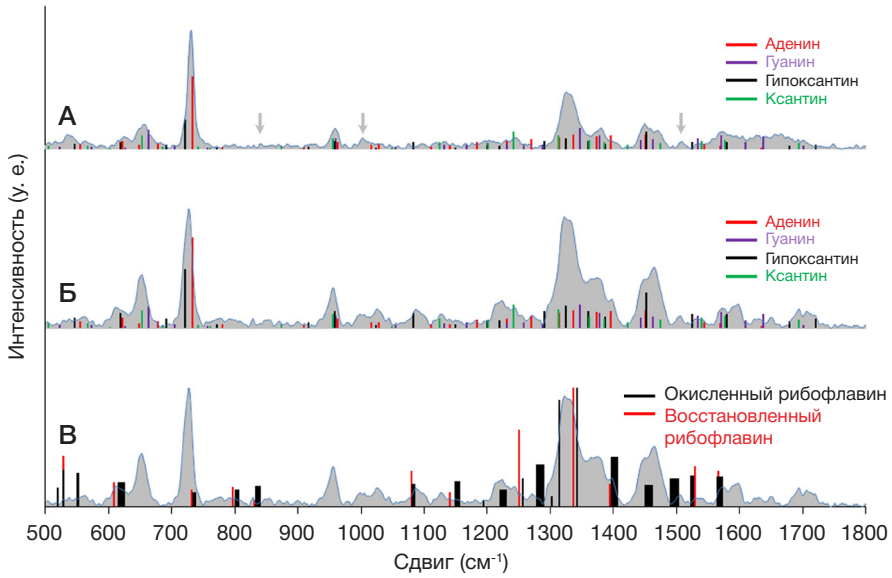


Рис. 4. Наложение полос пуриновых производных [16] и рибофлавина [4, 24, 25] на ГКР-спектры суспензий *E. coli*. **А**. Наложение полос пуриновых производных на спектр *E. coli* при длине волны возбуждения 785 нм. *Стрелками* помечены не отнесенные низкоинтенсивные полосы. **Б**. Наложение полос пуриновых производных на спектр *E. coli* при длине волны возбуждения 532 нм. **В**. Наложение полос рибофлавина на спектр *E. coli* при длине волны возбуждения 532 нм. Ширина полос рибофлавина на графике отражает вариации в их положении между данными литературных источников

полосы могут появляться вследствие взаимодействий между компонентами смеси. Например, известен ГКР-спектр смеси аденина, гипоксантина и ксантина, содержащий полосы при 1000 и 1510 см$^{-1}$, отсутствующие в спектрах индивидуальных соединений [22]. Кроме того, наличие полос при 838–842 и 1002 см$^{-1}$ можно объяснить наличием минорных количеств тирозина (наиболее интенсивные полосы 824, 847, 928, 1046, 1389 и 1583 см$^{-1}$ [23]) и фенилаланина (наиболее интенсивные полосы 930, 1002, 1031, 1394 и 1602 см$^{-1}$ [23]).

Отнесение полос к смеси пуриновых производных объясняет экспериментально наблюдаемую значительную вариацию в положении максимума некоторых полос в спектрах *E. coli*. Вариация положения максимума широкой многокомпонентной полосы при 502–574 см$^{-1}$ может быть объяснена наложением полос 508 см$^{-1}$ ксантина, 526 см$^{-1}$ гуанина, 550 см$^{-1}$ гипоксантина, 558 см$^{-1}$ аденина и 577 см$^{-1}$ гуанина; полосы при 653–667 см$^{-1}$ — наложением полос 652 см$^{-1}$ аденина, 657 см$^{-1}$ ксантина и 667 см$^{-1}$ гуанина; полосы при 724–735 см$^{-1}$ — наложением полос 725 см$^{-1}$ гипоксантина и 734 см$^{-1}$ аденина; широкой двойной полосы с максимумами при 1444–1452 см$^{-1}$ и 1464–1473 см$^{-1}$ — наложением полос 1447 см$^{-1}$ гуанина, 1455 см$^{-1}$ аденина, 1456 см$^{-1}$ гипоксантина, 1466 см$^{-1}$ гуанина и 1478 см$^{-1}$ ксантина.

Спектры *E. coli* при ДВВ 532 нм демонстрируют значительное сходство со спектрами при ДВВ 785 нм (рис. 4А, 4Б). В них наблюдаются вариации положения и интенсивности тех же полос, что и при ДВВ 785 нм (рис. 1Б, 3Б). В связи с этим мы опробовали вариант описания их в виде смеси тех же четырех пуриновых производных (аденина, гуанина, гипоксантина и ксантина). Учитывая, что в данном случае их референсные спектры, описанные ранее [16], отличаются от спектров *E. coli* не только типом ГКР-субстрата, но и ДВВ, что зачастую приводит к небольшим сдвигам положения полос, качество описания экспериментальных спектров *E. coli* можно назвать высоким.

Нами была также изучена возможность отнесения полос в спектрах *E. coli* при ДВВ 532 нм к окисленной или восстановленной формам рибофлавина или ФАД, референсные спектры которых были взяты из более ранних работ [4, 24, 25] (рис. 4В). В спектрах рибофлавина отсутствует ряд полос высокой и средней интенсивности спектров *E. coli*: 650, 725–733, 955, 1365 см$^{-1}$, а в спектрах *E. coli* отсутствует или имеет значительно отличающуюся относительную интенсивность ряд полос рибофлавина: 528–529, 834–839, 1149–1156, 1279–1289, 1491–1502, 1523–1527 см$^{-1}$ для окисленной формы и 528, 1251, 1501 и 1530 см$^{-1}$ для восстановленной формы. Нельзя полностью исключать наличие небольшого вклада спектра рибофлавина в спектры *E. coli* при ДВВ 532 нм, это могло бы дополнительно повысить интенсивность широкой

полосы при 1300–1350 см$^{-1}$ по сравнению со смесью пуриновых производных. Однако рибофлавин однозначно не является доминирующим соединением в спектре. Это в некоторой степени противоречит сделанным ранее выводам о том, что в спектрах бактерий *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* и *Geobacillus stearothermophilus* при ДВВ 532 нм доминируют полосы рибофлавина [25]. Данное несоответствие может быть объяснено различиями в используемых видах бактерий.

Таким образом, и при ДВВ 532 нм ГКР-спектры *E. coli* наилучшим образом можно описать суперпозицией спектров пуриновых производных. Аналогично ДВВ 785 нм, вариативность спектров между бактериальными препаратами разных партий объясняется различными соотношениями концентраций этих соединений, выделяемых клетками в раствор.

ВЫВОДЫ

При использовании в качестве ГКР-субстратов золей наночастиц серебра, полученных гидроксиламиновым методом, источником ГКР-спектров *E. coli* при ДВВ 785 и 532 нм является смесь пуриновых производных, выделяемых клетками в раствор. Наилучшее описание спектра соответствует четырем соединениям (аденин, гуанин, гипоксантин и ксантин), при ДВВ 532 нм мы не исключаем возможность наличия небольшого вклада рибофлавина. Спектры такого типа проявляются только в присутствии живых бактериальных клеток; им присуща значительная вариативность, обусловленная различиями в соотношениях перечисленных компонентов. Такая молекулярная природа ГКР-спектров бактерий в значительной мере сужает перспективы использования ГКР для целей их дискриминации/идентификации.

Литература

1. Efrima S, Bronk BV. Silver Colloids Impregnating or Coating Bacteria. J Phys Chem B. 1998; 102 (31): 5947–50.
2. Zeiri L, Bronk BV, Shabtai Y, Czégé J, Efrima S. Silver metal induced surface enhanced Raman of bacteria. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp. 2002; 208 (1): 357–62.
3. Picorel R, Lu T, Holt RE, Cotton TM, Seibert M. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS) Spectroscopy of Bacterial Membranes: The Flavoproteins. In: Baltscheffsky M, editor. Current Research in Photosynthesis: Proceedings of the VIIIth International Conference on Photosynthesis; 1989 Aug 6–11; Stockholm, Sweden. Dordrecht: Springer Netherlands, 1990; p. 1867–70.
4. Zeiri L, Bronk BV, Shabtai Y, Eichler J, Efrima S. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Probing Specific Biochemical Components in Bacteria. Appl Spectrosc. 2004; 58 (1): 33–40.
5. Guzelian AA, Sylvia JM, Janni JA, Clauson SL, Spencer KM. SERS of whole-cell bacteria and trace levels of biological molecules. Proc. SPIE, Vibrational Spectroscopy-Based Sensor Systems. 2002; (4577): 183–92.
6. Jarvis RM, Goodacre R. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Anal Chem. 2004; 76 (1): 40–7.
7. Premasiri WR, Moir DT, Klempner MS, Krieger N, Jones G, Ziegler LD. Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria. J Phys Chem B. 2005; 109 (1): 312–20.
8. Luo BS, Lin M. A Portable Raman System for the Identification of Foodborne Pathogenic Bacteria. J Rapid Methods Autom Microbiol. 2008; 16 (3): 238–55.
9. Kahraman M, Keseroğlu K, Çulha M. On sample preparation for surface-enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra. Appl Spectrosc. 2011; 65 (5): 500–6.
10. Feng J, de la Fuente-Núñez C, Trimble MJ, Xu J, Hancock REW, Lu X. An in situ Raman spectroscopy-based microfluidic “lab-on-a-chip” platform for non-destructive and continuous characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Chem Commun. 2015; 51 (43): 8966–9.
11. Su L, Zhang P, Zheng D, Wang Y, Zhong R. Rapid detection of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by surface-enhanced Raman scattering. Optoelectron Lett. 2015; 11 (2): 157–160.
12. Mosier-Boss AP. Review on SERS of Bacteria. Biosensors. 2017; 7 (4): 51–76.
13. Witkowska E, Korsak D, Kowalska A, Janeczek A, Kamińska A. Strain-level typing and identification of bacteria — a novel approach for SERS active plasmonic nanostructures. Anal Bioanal Chem. 2018; 410 (20): 5019–31.
14. Patel IS, Premasiri WR, Moir DT, Ziegler LD. Barcoding bacterial cells: a SERS-based methodology for pathogen identification. J Raman Spectrosc. 2008; 39 (11): 1660–72.
15. Sundaram J, Park B, Hinton A, Lawrence KC, Kwon Y. Detection and differentiation of *Salmonella* serotypes using surface enhanced Raman scattering (SERS) technique. J Food Meas Charact. 2013; 7 (1): 1–12.
16. Premasiri WR, Lee JC, Sauer-Budge A, Théberge R, Costello CE, Ziegler LD. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS. Anal Bioanal Chem. 2016; 408 (17): 4631–47.
17. Marotta NE, Bottomley LA. Surface-Enhanced Raman Scattering of Bacterial Cell Culture Growth Media. Appl Spectrosc. 2010; 64 (6): 601–6.
18. Leopold N, Lendl B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. J Phys Chem B. 2003; 107 (24): 5723–7.
19. Cañamares MV, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S, Castillejo M, Oujja M. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties. J Colloid Interface Sci. 2008; 326 (1): 103–9.
20. Knauer M, Ivleva NP, Niessner R, Haisch C. Optimized Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) Colloids for the Characterization of Microorganisms. Anal Sci. 2010; 26 (7): 761–6.
21. Félix-Rivera H, González R, Rodríguez GDM, Primera-Pedrozo OM, Ríos-Velázquez C, Hernández-Rivera SP. Improving SERS Detection of Bacillus thuringiensis Using Silver Nanoparticles Reduced with Hydroxylamine and with Citrate Capped Borohydride. Int J Spectrosc. 2011; Article ID 989504.
22. Ranc V, Hruzikova J, Maitner K, Prucek R, Milde D, Kvítek L. Quantification of purine basis in their mixtures at femto-molar concentration levels using FT-SERS. J Raman Spectrosc. 2011; 43 (8): 971–6.
23. Kim SK, Kim MS, Suh SW. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of aromatic amino acids and their glycyl dipeptides in silver sol. J Raman Spectrosc. 1987; 18 (3): 171–5.
24. Kazanci M, Schulte JP, Douglas C, Fratzl P, Pink D, Smith-Palmer T. Tuning the Surface-Enhanced Raman Scattering Effect to Different Molecular Groups by Switching the Silver Colloid Solution pH. Appl Spectrosc. 2009; 63 (2): 214–3.
25. Smith-Palmer T, Douglas C, Fredericks P. Rationalizing the SER spectra of bacteria. Vib Spectrosc. 2010; 53 (1): 103–6.

References

1. Efrima S, Bronk BV. Silver Colloids Impregnating or Coating Bacteria. J Phys Chem B. 1998; 102 (31): 5947–50.
2. Zeiri L, Bronk BV, Shabtai Y, Czégé J, Efrima S. Silver metal induced surface enhanced Raman of bacteria. Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp. 2002; 208 (1): 357–62.
3. Picorel R, Lu T, Holt RE, Cotton TM, Seibert M. Surface-Enhanced Resonance Raman Scattering (SERRS) Spectroscopy of Bacterial Membranes: The Flavoproteins. In: Baltscheffsky M, editor. Current Research in Photosynthesis: Proceedings of the VIIIth International Conference on Photosynthesis; 1989 Aug 6–11; Stockholm, Sweden. Dordrecht: Springer Netherlands, 1990; p. 1867–70.
4. Zeiri L, Bronk BV, Shabtai Y, Eichler J, Efrima S. Surface-Enhanced Raman Spectroscopy as a Tool for Probing Specific Biochemical Components in Bacteria. Appl Spectrosc. 2004; 58 (1): 33–40.
5. Guzelian AA, Sylvia JM, Janni JA, Clauson SL, Spencer KM. SERS of whole-cell bacteria and trace levels of biological molecules. Proc. SPIE, Vibrational Spectroscopy-Based Sensor Systems. 2002; (4577): 183–92.
6. Jarvis RM, Goodacre R. Discrimination of Bacteria Using Surface-Enhanced Raman Spectroscopy. Anal Chem. 2004; 76 (1): 40–7.
7. Premasiri WR, Moir DT, Klempner MS, Krieger N, Jones G, Ziegler LD. Characterization of the Surface Enhanced Raman Scattering (SERS) of Bacteria. J Phys Chem B. 2005; 109 (1): 312–20.
8. Luo BS, Lin M. A Portable Raman System for the Identification of Foodborne Pathogenic Bacteria. J Rapid Methods Autom Microbiol. 2008; 16 (3): 238–55.
9. Kahraman M, Keseroğlu K, Çulha M. On sample preparation for surface-enhanced Raman scattering (SERS) of bacteria and the source of spectral features of the spectra. Appl Spectrosc. 2011; 65 (5): 500–6.
10. Feng J, de la Fuente-Núñez C, Trimble MJ, Xu J, Hancock REW, Lu X. An in situ Raman spectroscopy-based microfluidic "lab-on-a-chip" platform for non-destructive and continuous characterization of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. Chem Commun. 2015; 51 (43): 8966–9.
11. Su L, Zhang P, Zheng D, Wang Y, Zhong R. Rapid detection of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by surface-enhanced Raman scattering. Optoelectron Lett. 2015; 11 (2): 157–160.
12. Mosier-Boss AP. Review on SERS of Bacteria. Biosensors. 2017; 7 (4): 51–76.
13. Witkowska E, Korsak D, Kowalska A, Janeczek A, Kamińska A. Strain-level typing and identification of bacteria — a novel approach for SERS active plasmonic nanostructures. Anal Bioanal Chem. 2018; 410 (20): 5019–31.
14. Patel IS, Premasiri WR, Moir DT, Ziegler LD. Barcoding bacterial cells: a SERS-based methodology for pathogen identification. J Raman Spectrosc. 2008; 39 (11): 1660–72.
15. Sundaram J, Park B, Hinton A, Lawrence KC, Kwon Y. Detection and differentiation of *Salmonella* serotypes using surface enhanced Raman scattering (SERS) technique. J Food Meas Charact. 2013; 7 (1): 1–12.
16. Premasiri WR, Lee JC, Sauer-Budge A, Théberge R, Costello CE, Ziegler LD. The biochemical origins of the surface-enhanced Raman spectra of bacteria: a metabolomics profiling by SERS. Anal Bioanal Chem. 2016; 408 (17): 4631–47.
17. Marotta NE, Bottomley LA. Surface-Enhanced Raman Scattering of Bacterial Cell Culture Growth Media. Appl Spectrosc. 2010; 64 (6): 601–6.
18. Leopold N, Lendl B. A New Method for Fast Preparation of Highly Surface-Enhanced Raman Scattering (SERS) Active Silver Colloids at Room Temperature by Reduction of Silver Nitrate with Hydroxylamine Hydrochloride. J Phys Chem B. 2003; 107 (24): 5723–7.
19. Cañamares MV, Garcia-Ramos JV, Sanchez-Cortes S, Castillejo M, Oujja M. Comparative SERS effectiveness of silver nanoparticles prepared by different methods: A study of the enhancement factor and the interfacial properties. J Colloid Interface Sci. 2008; 326 (1): 103–9.
20. Knauer M, Ivleva NP, Niessner R, Haisch C. Optimized Surface-enhanced Raman Scattering (SERS) Colloids for the Characterization of Microorganisms. Anal Sci. 2010; 26 (7): 761–6.
21. Félix-Rivera H, González R, Rodríguez GDM, Primera-Pedrozo OM, Ríos-Velázquez C, Hernández-Rivera SP. Improving SERS Detection of Bacillus thuringiensis Using Silver Nanoparticles Reduced with Hydroxylamine and with Citrate Capped Borohydride. Int J Spectrosc. 2011; Article ID 989504.
22. Ranc V, Hruzikova J, Maitner K, Prucek R, Milde D, Kvítek L. Quantification of purine basis in their mixtures at femto-molar concentration levels using FT-SERS. J Raman Spectrosc. 2011; 43 (8): 971–6.
23. Kim SK, Kim MS, Suh SW. Surface-enhanced Raman scattering (SERS) of aromatic amino acids and their glycyl dipeptides in silver sol. J Raman Spectrosc. 1987; 18 (3): 171–5.
24. Kazanci M, Schulte JP, Douglas C, Fratzl P, Pink D, Smith-Palmer T. Tuning the Surface-Enhanced Raman Scattering Effect to Different Molecular Groups by Switching the Silver Colloid Solution pH. Appl Spectrosc. 2009; 63 (2): 214–3.
25. Smith-Palmer T, Douglas C, Fredericks P. Rationalizing the SER spectra of bacteria. Vib Spectrosc. 2010; 53 (1): 103–6.

РАЗРАБОТКА ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ФОРМ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ: МЕТОДЫ ОЦЕНКИ И ПОКАЗАТЕЛИ КАЧЕСТВА

Е. В. Мельникова, Д. В. Горячев, А. А. Чапленко ✉, М. А. Водякова, А. Р. Сайфутдинова, В. А. Меркулов

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Научный центр экспертизы средств медицинского применения» Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва

Одним из трендов фармации на сегодняшний день является применение наноструктурных компонентов для производства лекарств, в частности для направленной доставки лекарственных средств в заданную область организма, органа или клетки. К нанопрепаратам авторы относят средства, содержащие дендримеры, нанокристаллы, мицеллы, липосомы, а также полимерные наночастицы. В настоящее время липосомы — одни из наиболее исследованных наночастиц, которые рассматривают как современные и эффективные средства доставки различных препаратов. Однако увеличение сложности структуры препарата неизбежно приводит к увеличению числа критических точек производства, а также к расширению списка показателей качества. Наряду с классическими показателями качества авторы считают необходимым оценивать также физико-химические свойства липосомной фракции: форму, размер и заряд частиц; эффективность конъюгации маркеров; равномерность распределения действующего вещества. Мы полагаем, что для контроля ключевых параметров липосом целесообразно использовать динамическое и лазерное светорассеяние в сочетании с электрофорезом, дифференциальную сканирующую калориметрию, криорасщепляющую электронную микроскопию, ядерный магнитный резонанс, лазерную дифракцию и гель-фильтрацию.

Ключевые слова: липосомы, нанопрепараты, контроль качества, нормативные документы

✉ **Для корреспонденции:** Александр Андреевич Чапленко
ул. Щукинская, д. 6, корп. 1, г. Москва, 127051; chaplenko@Expmed.ru

Статья получена: 29.06.2018 **Статья принята к печати:** 02.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.092

DEVELOPMENT OF LIPOSOMAL DRUG FORMULATIONS: QUALITY ATTRIBUTES AND METHODS FOR QUALITY CONTROL

Melnikova EV, Goryachev DV, Chaplenko AA ✉, Vodyakova MA, Sayfutdinova AR, Merkulov VA

Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow

The use of nanostructured components in drug manufacturing and, more specifically, targeted drug delivery has recently become a major trend in the pharmaceutical industry. Nanodrugs encompass a wide range of pharmaceutical agents containing dendrimers, nanocrystals, micelles, liposomes, and polymer nanoparticles. Liposomes are the most well-studied nanoparticles and effective drug carriers. However, the more complex their structure is, the more process controls are needed and the more quality attributes have to be monitored, including the chemical properties of the liposomal fraction such as the shape, size and charge of the nanoparticle, conjugation efficacy, and distribution of the active ingredient. We believe that quality control of key liposome characteristics should rely on dynamic and laser light scattering coupled with electrophoresis, differential scanning calorimetry, cryo-electron microscopy, nuclear magnetic resonance, laser diffraction analysis, and gel filtration chromatography.

Keywords: liposomes, nanodrugs, quality control, guidance documents

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander A. Chaplenko
Schukinskaya 6, bl. 1, Moscow, 127051; chaplenko@Expmed.ru

Received: 29.06.2018 **Accepted:** 02.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.092

Регулирование всех фармакокинетических параметров лекарственного средства (всасывания, распределения, выведения и биотрансформации), обеспечение селективного действия на целевые органы и мишени наряду с безопасностью и минимизацией нежелательных реакций и побочных эффектов являются главными задачами фармацевтической отрасли. Одним из трендов на сегодняшний день является применение наноструктурных компонентов, в частности, для направленной доставки лекарственных средств (ЛС) в заданную область организма, органа или клетки. В законодательстве Российской Федерации отсутствуют понятия «нанопрепаратов» или «нанолекарств», фактически к ним относят лекарственные препараты (ЛП), представляющие собой или содержащие в своем составе наночастицы. Преимущественно данное определение используют в отношении форм ЛС на основе липосом и мицелл, в этих случаях наноструктуры выполняют функции транспорта активного вещества внутри организма, пролонгации всасывания, повышения стабильности и т. д., или для ЛС, обладающих наноструктурой в связи с физико-химическими особенностями действующих веществ (например, препараты железа для лечения анемии могут содержать атомы железа (III), стабилизированного углеводным комплексом, что определяет их наноколлоидную структуру). В настоящее время мы разрабатываем руководство по оценке качества и исследованию

лекарственных средств на основе липосом, мицелл и содержащих наночастицы.

Особенности состава нанопрепаратов обусловливают индивидуальные подходы к оценке их качества. Например, отдельные специфические показатели липосомных препаратов (размер наночастиц, морфология поверхности, поверхностный заряд) определяют их качество, поскольку могут оказывать большое влияние на следующие фармакокинетические и фармакодинамические свойства *in vivo*:

• скорость высвобождения действующего вещества из липосом, что может влиять на фармакокинетику (ФК) и фармакодинамику (ФД) и, таким образом, на профиль безопасности и эффективности ЛП;

• биологическую доступность активного вещества, заключенного в липосому, его биотрансформацию и выведение.

ФК инкапсулированного вещества зависит от ФК носителя, которая обусловлена физико-химическими свойствами материала наночастицы, также следует учитывать взаимодействия между компонентами наночастицы, действующим веществом и биологической средой организма.

К нанопрепаратам авторы относят препараты, содержащие дендримеры, нанокристаллы, мицеллы, липосомы, а также полимерные наночастицы. В настоящее время липосомы — одни из наиболее изученных наночастиц, которые можно рассматривать как эффективные средства доставки различных ЛП. За последние годы мировая фармацевтическая промышленность выпустила более 20 липосомных препаратов, которые применяют преимущественно в онкологии (Dauno Xome (Gilead, NeXstar), Doxil (Alza, Sequus), Caelyx (Schering-Plough), Myocet (Elan, TLC)) или в лечении грибковых инфекций (AmBisome, ABELSET (Gilead, NeXstar)) [1]. Учитывая особенности транспорта, транслокацию через гистогематические барьеры, клеточные мембраны и метаболические трансформации, липосомные фармакологические препараты обладают уникальными свойствами, связанными, прежде всего, с особенностями их ФК.

В статье обобщены и проанализированы данные по применению различных типов липосом для доставки ЛП, а также определены особенности оценки качества липосомных нанопрепаратов.

Разновидности липосом и их применение в фармации

Липосомы — везикулярные структуры, содержимое которых ограничено липидной мембраной, образуемой амфифильными молекулами. В последнее время липосомы превратились из простой модели, имитирующей клеточные мембраны, в объект активных научных исследований и практического применения [2]. Главная цель использования липосом в качестве носителей ЛП заключается в селективном накоплении действующих веществ в патологических очагах (опухолях, воспаленных тканях), что связано с такой способностью липосом, как пассивное нацеливание: размер пор между капиллярами в очагах воспаления или в опухолях (210–1000 нм) значительно превышает размер пор в нормальных тканях и органах (около 40 нм). Таким образом, липосомы размером менее 200 нм не могут выйти из кровотока нигде, кроме как в зонах воспаления (исключение составляет мозг, в котором, как правило, опухоль имеет меньшие поры, равные 7–100 нм [3, 4]), а у активного вещества, заключенного в липосомы, меньше возможности достичь органов, где оно может оказать токсическое действие. Так, например, липосомный доксорубицин проявляет в 2–3 раза меньшую токсичность по сравнению с раствором препарата [5].

В случае направленного липосомного транспорта применение антител к эндотелиальным белкам-мишеням, селективным для сосудов различных органов, позволяет многократно повысить адресность наноконтейнерной доставки биологически активных веществ и ДНК [6–9].

К настоящему времени описаны липосомные препараты самых разнообразных фармакологических средств, рентгенологических и сцинтиграфических трейсеров, токсинов, пептидов, белков и нуклеиновых кислот. Подавляющее большинство работ подобного рода проводили с противоопухолевыми препаратами (чаще всего, с антрациклиновыми) [8]. Наиболее часто в исследованиях по доставке лекарств использовали следующие пять типов липосом, отличающихся составом и действием *in vivo*: простые липосомы; стерически стабилизированные липосомы; направленные липосомы (иммунолипосомы); катионные липосомы; липосомы, чувствительные к физическим и химическим стимулам, таким как температура, свет и изменения значения pH [2, 10] (табл. 1).

Особую роль липосомы стали играть в связи с появлением нового поколения препаратов, получаемых методами биотехнологии и генной инженерии, таких как рекомбинантные белки, пептиды (биотехнологические ЛП), а также препараты на основе нуклеиновых кислот (генотерапевтические ЛП) в связи с чувствительностью указанных препаратов к химическому и ферментативному гидролизу [8, 39–41]. В случае генотерапии *in vivo* липосомные наноконтейнеры могут содержать плазмиду с последовательностью терапевтического гена, антисенс олигонуклеотиды или малые интерферирующие РНК [42–44]. Объем липосом позволяет включать в них гены различного размера [45]. Как и в случае с цитостатическими препаратами и парамагнитными контрастами, адресность доставки может быть достигнута с помощью векторных молекул, ковалентно пришитых к наружной поверхности липосом.

При использовании липосом в качестве ДНК-вакцин они удерживают антиген в своей капсуле и выполняют двойную функцию, выступая в качестве носителя антигена вакцины и иммуномодулятора [46, 47]. В одной из работ в качестве ДНК-вакцины использовали последовательность S-антигена вируса гепатита B (pRc/CMV HBS), заключенного в катионные липосомы [47]. Мыши Balb/c были вакцинированы внутримышечно дважды на 0 и 21-й дни 10 мкг плазмидной ДНК на мышь. Уровни определяемых цитокинов в селезенке иммунизированных липосомным препаратом мышей после введения нативного HBsAg был в 4 раза выше уровня цитокинов у интактных мышей и животных, вакцинированных ДНК, что свидетельствует о возможности использования данной липосомной конструкции для вакцинации против гепатита B.

Для загрузки ДНК можно применять липосомы как с нейтрально заряженной наружной поверхностью, так и катионные или анионные липосомы. Преимуществом нейтральных липосом является то, что они гораздо дольше циркулируют в кровотоке, чем заряженные, обладают меньшей токсичностью и неспецифической сорбцией в органах и тканях. Однако их гораздо сложнее загрузить ДНК. При пассивной загрузке (т. е. при простом

Таблица 1. Применение различных типов липосом для доставки лекарственных препаратов

Типы липосом	Простые	Стерически стабилизированные	Иммунолипосомы	Катионные (lipoplexes)	Термочувствительные и фоточувствительные
Особенности состава	Фосфолипиды (нейтральные и/или отрицательно заряженные) и/или холестерин	Фосфолипиды + полиэтиленгликоль (ПЭГ)	Модифицированные ПЭГ-везикулы, конъюгированные с моноклональными антителами или их фрагментами, пептидами, факторами роста, гликопротеинами и др.	Положительно заряженные липиды	Фосфолипиды с температурой фазового перехода, превышающей температуру тела (термочувствительные). В состав везикул фотоизомеризуемой липидной молекулы входит 1,2-бис(4-(*н*-бутил) фенилазо-4'-фенилбутироил)фосфатидилхолин (Bis-Azo PC) в низких концентрациях. Могут быть конъюгированы с ПЭГ или с антителами (АТ)
Пути введения	Пероральный, инъекционный, ингаляционный, наружный, эндовитреальный	Инъекционный, пероральный	Инъекционный	Инъекционный, интраназальный	Инъекционный
Время полувыведения	От нескольких минут до 2–3 ч	От 6–8 ч до нескольких суток		От нескольких минут до 4–6 ч	Несколько суток
Основные места скопления	Печень, селезенка, легкие		Определяется присоединенными лигандами, печень, легкие	Печень, легкие	Опухолевые клетки
Механизм действия	Пассивное нацеливание	Пассивное нацеливание	Направленный транспорт	Пассивное нацеливание	Направленный транспорт
Примеры использования	– в составе вакцин против вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций [11]; – доставка в макрофаги иммуномодуляторов, цитотоксических и противомикробных соединений; – лечение метастазов после хирургического удаления первичных опухолей [12, 13]; – доставка ЛП против внутриклеточных патогенных микроорганизмов [14], системной грибковой инфекции, ВИЧ, микобактериальной инфекции [13]; – диагностика в качестве носителей радиоизотопов и контрастных веществ для визуализации [12, 13]; – носители антигенов [12, 15]	– накопление ЛП в солидных опухолях [16–18]; – лечение мелкоклеточного рака легкого и меланомы кожи [19], лейкозов и карциномы легкого [20, 21]	– доставка ЛП в опухоль [10, 22–26]; – лечение хронического В-лимфоцитарного лейкоза и острого Т-клеточного лейкоза [23], различных лимфом [27]; – терапия рака молочной и щитовидной желез, яичников, матки, легкого, пищевода, желудка, толстой и прямой кишки, почки [23, 26, 28]	– доставка генетического материала в печень, клеточная терапия эндотелиальных опухолей легких [2, 29, 30]; – антиангиогенная терапия; – лечение опухолей шеи, головы, меланом [30]	– доставка ЛП в опухоль [2, 31]
Основные преимущества	Проникают в относительно малодоступные очаги воспаления (например, в мозг), так как имеют отрицательный заряд [32, 33]	Содержат ПЭГ, препятствующий опсонизации липосом, уменьшению их распознавания клетками ретикулоэндотелиальной системы и увеличению времени циркуляции в кровотоке [34, 35]	Антитела позволяют модулировать распределение липосом в органах и тканях. Оптимизация терапевтических свойств ЛС. Коррекция действующей дозы	В отличие от отрицательно заряженных или нейтральных липосом проникают в сосуды опухоли [36]	Обладают большей избирательностью действия по сравнению со свободным препаратом [31, 37, 38]

эмульгировании липидных компонентов в присутствии ДНК) в липосомы попадает лишь 10% от общего количества ДНК, при использовании специальных приемов степень загрузки возможно увеличить до 40% и выше, однако при использовании этих приемов, как правило, получаются липосомы крупного размера [45]. Высокая степень загрузки ДНК является основным преимуществом заряженных липосом. Недостатками катионных и анионных липосом является более высокая, чем у неполярных липосом, токсичность и неспецифическое проникновение в органы и ткани.

Особенности контроля качества производства и готовых липосомных форм ЛП

Основные этапы технологического процесса получения липосомных форм ЛП и контролируемые параметры следующие [48]:

1) получение липидной пленки и ее диспергирование/деградация. Контролируемые параметры: количество остаточных органических растворителей в липидной пленке, процент включения активного вещества и размер липосом после диспергирования липидной пленки, стабильность, значение pH;

2) получение липосом заданного размера, отделение невключенного активного вещества, стерилизация методом фильтрации. Контролируемые параметры: количество включенного активного вещества и размер липосом, концентрация липидных компонентов, стабильность, значение pH;

3) лиофилизация. Контролируемые параметры: остаточная влажность, стабильность и процент включения ЛП в липосомы после регидратации лиофилизата.

Из перечисленных этапов технологического процесса можно заключить, что критические точки контроля качества липосомного препарата связаны с определением его значимых физико-химических свойств, поэтому при подаче досье для государственной регистрации липосомных форм ЛП необходимо изучить следующие общие параметры (рис. 1).

Одним из основных параметров, оказывающих влияние на ФК и ФД липосомных форм ЛП, является поведение активного вещества в физиологическом окружении, поэтому необходимо разработать надежные валидированные методы оценки высвобождения активного вещества *in vitro* для следующих целей:

– мониторинг имитации высвобождения действующего вещества из липосом в организме. При наличии оснований допустимо испытание на «вытекание» *in vitro* в релевантной среде при различных условиях (например, в диапазоне температур и значений pH);

– мониторинг стабильности при хранении для обеспечения постоянства серий;

– исследование стабильности и процесса приготовления в предполагаемых условиях применения.

В табл. 2 в качестве примера представлены основные показатели качества и параметры для паспортизации липосом [49, 50], используемых для доставки ДНК терапевтических генов.

Авторы полагают, что в зависимости от конкретной функции липосом (например, модификации распределения действующего вещества путем инкапсуляции в целях улучшения профиля безопасности) при разработке препарата следует также оценивать следующие дополнительные параметры:

– поддержание целостности липосомной готовой формы в плазме;

– характеристика процесса фазового перехода липидного бислоя (температура и энтальпия переходов);

– определение поверхностного заряда липосом;

– pH внутренней камеры липосом, наполняемых по градиенту pH;

– если значимо, установление характеристик физического состояния активного вещества внутри липосомы (например, в случае доксорубицина — образование осадка);

– распределение активного вещества (например, на поверхности липосом, в бислое, внутренней среде и т. д.);

– в отношении конъюгированных (например, пегилированных) липосомных препаратов: качество и чистота пегилированного исходного материала, молекулярная

Рис. 1. Сведения о качественных характеристиках липосомных форм ЛП

Таблица 2. Характеристики липосомных препаратов

Параметры		Аналитические/инструментальные методы
Физические характеристики		
1	Размер везикул и морфология поверхности	Электронная микроскопия
2	Распределение везикул по размерам (субмикронный и микронный диапазоны)	Динамическое и лазерное светорассеяние, эксклюзионная хроматография (гель-фильтрация)
3	Поверхностный заряд	Динамическое рассеяние света
4	Поверхностный pH	pH-чувствительные пробы
5	Процент включения ДНК/процент свободного препарата	Метанол-хлороформная экстракция и центрифугирование на разделительных колонках, ионообменная хроматография, спектрофотометрия, метод радиоактивных меток
Химические характеристики		
1	Концентрация фосфолипидов	Экстракция и центрифугирование на разделительных колонках
2	Концентрация холестерина	Экстракция и центрифугирование на разделительных колонках
3	Осмотичность	Осмометрия
Биологические характеристики		
1	Стерильность	Фармакопейный тест стерильности
2	Пирогенность	ЛАЛ-тест (Limulus amebocyte lysate test)
3	Токсичность	Мониторинг *in vitro* и *in vivo*, гистология

Таблица 3. Характеристики липосомных препаратов

Страна	Документ	Некоторые аспекты
Страны Европейского союза	Reflection paper on the data requirements for intravenous liposomal products developed with reference to an innovator liposomal product/21 February 2013 EMA/CHMP/806058/2009/Rev. 02, Committee for Human Medicinal Products (CHMP)	Особенности контроля качества: – состав и подлинность компонентов (липидные компоненты и вспомогательные вещества); – соотношение активное вещество/липиды; – морфология липосом, средний размер и распределение по размерам, агрегация; – фракция инкапсулированного активного вещества (количество свободного/включенного); – стабильность активного вещества, липидов, вспомогательных веществ, критических продуктов разложения; – *in vitro* скорость высвобождения вещества препарата из липосом в физиологически/клинически значимых средах; – стабильность; – восстановление; – поддержание целостности липосомной рецептуры в плазме
	Recommendations. Commission recommendation of 18 October 2011 on the definition of nanomaterial (Text with EEA relevance) (2011/696/EU)	Определение наноматериалов
	Reflection paper on surface coatings: general issues for consideration regarding parenteral administration of coated nanomedicine products/22 May 2013, EMA/325027/2013, Committee for Medicinal Products for Human Use (CHMP)	Приведены основные критические показатели качества, а также требования к клиническим и доклиническим исследованиям. Особое внимание уделяется следующим аспектам: – наличие покрытия может повлиять на критические свойства нанопрепаратов с точки зрения безопасности и эффективности. Физико-химическая природа покрытия, равномерность покрытия поверхности и его стабильность (как с точки зрения прикрепления, так и с точки зрения деградации) будут определять ФК и биораспределение продукта; – в некоторых случаях материал покрытия может вызвать новые биологические реакции, не наблюдаемые ни для материала покрытия, ни для активного вещества по отдельности
США	Guidance for Industry. Liposome Drug Products Chemistry, Manufacturing, and Controls; Human Pharmacokinetics and Bioavailability; and Labeling Documentation. — U.S. Department of Health and Human Services Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research, 2002	Краткое описание липосом, критические этапы их производства и контроля качества, приведены рекомендации по проведению исследований по ФК и биодоступности липосомных ЛП и требования к маркировке. Руководство содержит общие принципы и рекомендации для регистрации препаратов данного класса
	USP41-NF36 <1> Injections and implanted drug products (parenterals)-product quality tests	Содержит определение липосом и липосомного ЛП, указывается, что при контроле качества для липосом требуются как общие испытания, так и специальные тесты
Китай	Pharmacopoeia of the Peoples Republic of China. Beijing: People's Medical Publishing Hous. 2010; (2). p. A244–245	Приведены определения различных наночастиц, требования, критерии и методики контроля качества нанопрепаратов. Указаны показатели, которые следует контролировать при производстве и хранении продуктов (например, остаточные количества органических растворителей, форма, размер частиц и их распределение, скорость инкапсулирования и количество лекарственных средств в липосомах, степень окисления липосом и др.)

масса конъюгированного липида и распределение по размеру (дисперсность), расположение ПЭГ на поверхности, стабильность конъюгата.

Необходимо определить перечень испытаний, которым планируется подвергать каждую серию липосомного препарата рутинно. Данный перечень должен основываться на параметрах, использованных для характеристики препарата в соответствии с вышеописанными требованиями.

Нормативно-правовое регулирование липосомных препаратов в мире

Примеры требований мировых регуляторных органов к производству, контролю качества, проведению доклинических и клинических исследований липосомных форм ЛП приведены в документах, представленных в табл. 3.

ВЫВОДЫ

Липосомные системы доставки позволяют разработчику изменять и контролировать параметры всасывания и высвобождения действующего вещества. Лекарственные формы на основе липосом, как правило, отличаются меньшей токсичностью, возможностью адресной доставки лекарственного средства и меньшим риском развития нежелательных реакций. Использование инновационных препаратов, содержащих липосомы, конъюгированные с антителами, позволяет максимально точно определить локус высвобождения активного компонента. Однако увеличение сложности структуры препарата неизбежно приводит к увеличению числа критических точек производства, а также к расширению списка параметров, подлежащих контролю, которые являются показателями качества. Наряду с использованием классических методов контроля качества, оценивают также физико-химические свойства липосомной фракции: форму, размер и заряд частиц; эффективность конъюгации маркеров; равномерность распределения действующего вещества. Ключевые методы оценки параметров липосом основаны на оптических эффектах: динамическое и лазерное светорассеяние, электронная микроскопия.

Литература

1. Краснопольский Ю. М., Степанов А. Е., Швец В. И. Технологические аспекты получения липосомальных препаратов в условиях GMP. Биофарм журнал. 2009; (3): 18–29.
2. Барышников А. Ю. Наноструктурированные липосомальные системы как средство доставки противоопухолевых препаратов. Вестник РАМН. 2012; (3): 23–31.
3. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; (95): 4607–12.
4. Швец В. И., Каплун А. П., Краснопольский Ю. М., Степанов А. Е., Чехонин В. П. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века. Российские нанотехнологии. 2008; 3 (11–12): 6–20.
5. Love WG, Amos N, Kellaway IW, Williams BD. Specific accumulation of cholesterol-rich liposomes in the inflammatory tissue of rats with adjuvant arthritis. Ann Rheum Dis. 1990; 49 (8): 611–14.
6. Чехонин В. П., Баклаушев В. П., Юсубалиева Г. М. Моделирование и иммуногистохимический анализ глиомы С6 in vivo. Клеточные технологии в биологии и медицине. 2007; (2): 65–73.
7. Чехонин В. П., Жирков Ю. А., Гурина О. И. ПЭГилированные иммуннолипосомы, специфичные к астроцитам. Доклады Академии наук. 2003; 391 (6): 1–7.
8. Чехонин В. П., Гурина О. И., Дмитриева Т. В. Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам. М.: Медицина, 2007; 344 с.
9. Errede M, Benagiano V, Girolamo F et al. Differential expression of connexin43 in foetal, adult and tumour-associated human brain endothelial cells. Histochem J. 2002; (34): 265–71.
10. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale and clinical applications, existing and potential. Int J Nanomedicine. 2006; 1 (3): 297–315.
11. Felnerova D, Viret J-F, Gluck R, Moser C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. Curr Opin Biotechnol. 2004; (15): 518–29.
12. Barenholz Y. Liposome application: problems and prospects. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2001; (6): 66–77.
13. Vasir JK, Reddy MK, Labhasetwar VD. Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. Curr Nanoscience. 2005; 1 (1): 47–64.
14. Basu MK. Liposomal delivery of antileishmanial agents. J Applied Research. 2005; 5 (1): 221–36.
15. Zurbriggen R, Amacker M, Krammer AR. Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes. In: G. Gregoriadis, editor. Liposome technology. 3rd edn. Vol. I. Liposome preparation and related techniques. New York: Informa Healthcare USA, 2007; 85–96.
16. Fang J, Sawa T, Maeda H. Factors and mechanism of «epr» effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including smancs. Adv Exp Med Biol. 2003; (519): 29–49.
17. Greish K, Fang J, Inutsuka T et al. Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. Clin Pharmacokinet. 2003; (42): 1089–105.
18. Maeda H. The enhanced permeability and retention (epr) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. Adv Enzyme Regul. 2001; (41): 189–207.
19. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. 2008; (26): 57–64.
20. Ланцова А. В. Создание и биотерапевтическое изучение липосомальных лекарственных форм противоопухолевых препаратов производных нитрозомочевины [диссертация]. М., 2006; 173 с.
21. Ланцова А. В., Оборотова Н. А. Перетолчина Н. М. Сравнительное изучение противоопухолевой активности липосомальных лекарственных форм препаратов производных нитрозоалкилмочевины. Сибирский онкологический журнал. 2005; 2 (14): 25–9.
22. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Nat Rev Cancer. 2002; 2 (10): 750–63.
23. Толчева Е. В. Создание конструкции иммунолипосомы и изучение иммунолипосомальной формы противоопухолевого препарата доксорубицин [диссертация]. М., 2007; 109 с.
24. Соколова Д. В., Тазина Е. В., Кортава М. А. Анти-CD40 и анти-HLA-DR иммунолипосомальные формы доксорубицина: технология получения и антигенспецифичность in vivo. Российский биотерапевтический журнал. 2010; 9 (2): 90.
25. Соколова Д. В., Тазина Е. В., Кортава М. А. и др. Анти-MUC1 иммунолипосомальная форма доксорубицина: технология получения и антигенспецифичность in vitro. Российский биотерапевтический журнал. 2010; 9 (3): 21.
26. Хугаева О. В., Кортава М. А., Соколова Д. В. и др. Получение липосомального митоксантрона. Материалы IX Всеросс. науч.-практ. конф. «Отечественные противоопухолевые

препараты». Российский биотерапевтический журнал. 2010; 9 (2): 91.
27. Насонов Е. Л. Перспективы применения ритуксимаба при аутоиммунных заболеваниях человека. Российский медицинский журнал. 2007; 15 (26): 1–6.
28. Соколова Д. В. Иммунолипосомальные конструкции доксорубицина и модели для их доклинического исследования [диссертация]. М., 2011; 122 с.
29. Kawakami S, Fumoto S, Nishikawa M et al. In vivo gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes. Pharmaceuttic Research. 2000; 17 (3): 306–13.
30. Dass CR, Choong PFM. Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumor and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. Cancer Cell Int. 2006; 6 (17): 1–9.
31. Ponce AM, Wright A, Dewhirst MW, Needham D. Targeted bioavailability of drugs by triggered release from liposomes. Future Lipidol. 2006; 1 (1): 25–34.
32. Jain S, Mishra V, Singh P et al. RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes/neutrophils-mediated brain targeting. Int J Pharm. 2003; 261 (1–2): 43–55.
33. Qin J, Chen D, Hu H et al. Surface modification of RGD-liposomes for selective drug delivery to monocytes/Neutrophils in brain. Chem Pharm Bull. 2007; 55 (8): 1192–7.
34. Campbell RB, Fukumura D, Brown EB et al. Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. Cancer Res. 2002; (62): 6831–6.
35. Ambegia E, Ansell S, Cullis P et al. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. Biochim Biophys Acta. 2005; 1669 (2): 155–63.
36. Dass CR. Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumor vasculature. Int J Pharm. 2003; 267 (1–2): 1–12.
37. Тазина Е. В., Мещерикова В. В., Игнатьева Е. В. и др. Биофармацевтические исследования термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубицина. Российский биотерапевтический журнал. 2009; 1 (8): 40–7.
38. Huang Z, Szoka FC. Bioresponsive liposomes and their use for macromolecular delivery. In: G. Gregoriadis, editor. Liposome technology. 3rd edn. Vol. I. Liposome preparation and related techniques. New York: Informa Healthcare USA, 2007; p. 165–96.
39. Березов Т. Т., Яглова Н. В., Дмитриева Т. Б. и др. Направленный транспорт лекарственных средств с помощью липосом. Вестник РАМН. 2004; 5: 42–7.
40. Wu D, Pardridge WM. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; (96): 254–9.
41. Shi N, Pardridge WM. Noninvasive gene targeting to the brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97 (13): 7567–72.
42. Pal A, Ahmad A, Khan S et al. Systemic delivery of RafsiRNA using cationic liposomes silences Raf in xenograft model of human prostate cancer. Int J Oncol. 2005; 26 (4): 1087–91.
43. Omidi Y, Barar J, Akhtar S. Toxicogenomics of cationic lipid-based vectors for gene therapy: impact of microarray. Curr Drug Del. 2005; 2 (4): 429–41.
44. Oliveira S, Storm G, Schiffelers. Targeted delivery of siRNA. J Biomed Biotechnol. 2006; (2006): 1–7.
45. Miyazaki M, Obata Y, Abe K et al. Gene transfer using nonviral delivery systems. Perit Dial Int. 2006; (26): 633–40.
46. Aguilar JC. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine. 2007; (25): 3752–62.
47. Perrie Y, Frederik PM, Gregoriadis G. Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. Vaccine. 2001; (19): 3301–10.
48. Фармацевтическая разработка: концепция и практические рекомендации. В книге: Быковский С. Н., Василенко И. А., Демина Н. Б., Шохин И. Е., Новожилов О. В., Мешковский А. П., Спицкий О. Р., редакторы. Научно-практическое руководство для фармацевтической отрасли. М.: Перо, 2015; 472 с.
49. Lu D, Hickey AJ. Liposomal dry powders as aerosols for pulmonary delivery of proteins. AAPS Pharm Sci Tech. 2005; 6 (4): 641–8.
50. De Lima MCP, Simoes S, Pires P et al. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. Adv Drug Del Rev. 2001; (47): 277–94.

References

1. Krasnopolsky YuM, Stepanov AE, Shvets VI. Technological aspects of production of liposomal preparations under GMP conditions. Biofarm J. 2009; 3: 18–29.
2. Baryshnikov AYu. Nanostructured liposomal systems as a means of delivery of anticancer drugs. Vestnik RAMS. 2012; 3: 23–31.
3. Hobbs SK, Monsky WL, Yuan F. et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. Proc Natl Acad Sci USA. 1998; 95: 4607–4612.
4. Shvets IV, Kaplun AP, Krasnopolsky YuM. et al. From liposome seventies to nanobiotechnology XXI century. Ross nanotechnologies. 2008; 3 (11–12): 6–20.
5. Love WG, Amos N, Kellaway IW, Williams BD. Specific accumulation of cholesterol-rich liposomes in the inflammatory tissue of rats with adjuvant arthritis. Ann Rheum Dis. 1990; 49 (8): 611–614.
6. Chekhonin VP, Baklaushev VP, Yusubalieva GM. et al. Modeling and immunohistochemical analysis of glioma C6. Cell technol in biol and med. 2007; 2: 65–73.
7. Chekhonin VP, Zhirkov YuA, Gurina OI. et al. The Pegylated immunoliposome specific to astrocytes. Dokl. RAN. 2003; 391 (6): 1–7.
8. Chekhonin VP, Gurina OI, Dmitrieva TB. Monoclonal antibodies to neurospecific proteins. M.: Medicine, 2007; 344.
9. Errede M, Benagiano V, Girolamo F et al. Differential expression of connexin43 in foetal, adult and tumour-associated human brain endothelial cells. Histochem J. 2002; 34: 265–271.
10. Immordino ML, Dosio F, Cattel L. Stealth liposomes: review of the basic science, rationale and clinical applications, existing and potential. Int J Nanomedicine. 2006; 1 (3): 297–315.
11. Felnerova D, Viret J-F, Gluck R, Moser C. Liposomes and virosomes as delivery systems for antigens, nucleic acids and drugs. Curr Opin Biotechnol. 2004; 15: 518–529.
12. Barenholz Y. Liposome application: problems and prospects. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2001; 6: 66–77.
13. Vasir JK, Reddy MK, Labhasetwar VD. Nanosystems in drug targeting: opportunities and challenges. Curr Nanoscience. 2005; 1 (1): 47–64.
14. Basu MK. Liposomal delivery of antileishmanial agents. J Applied Research. 2005; 5 (1): 221–236.
15. Zurbriggen R, Amacker M, Krammer AR. Immunopotentiating reconstituted influenza virosomes. In: G. Gregoriadis eds. Liposome technology. 3rd edn. Vol. I. Liposome preparation and related techniques. New York: Informa Healthcare USA, 2007; 85–96.
16. Fang J, Sawa T, Maeda H. Factors and mechanism of «epr» effect and the enhanced antitumor effects of macromolecular drugs including smancs. Adv Exp Med Biol. 2003; 519: 29–49.
17. Greish K, Fang J, Inutsuka T. et al. Macromolecular therapeutics: advantages and prospects with special emphasis on solid tumour targeting. Clin Pharmacokinet. 2003; 42: 1089–1105.
18. Maeda H. The enhanced permeability and retention (epr) effect in tumor vasculature: the key role of tumor-selective macromolecular drug targeting. Adv Enzyme Regul. 2001; 41: 189–207.
19. Haley B, Frenkel E. Nanoparticles for drug delivery in cancer treatment. Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations. 2008; 26: 57–64.
20. Lantsova AV. Creation and biopharmaceutical study of liposomal dosage forms of anticancer drugs derived from nitrosourea. Abstract dis kand farm. sciences. Moscow, 2006; 173.
21. Lantsova AV, Oborotova NA, Peretolchina NM et al. Comparative

study of the antitumor activity of the liposomal dosage forms of drugs, derivatives of nitrozomocevina. Sibirs oncologist J. 2005; 2 (14): 25–29.
22. Allen TM. Ligand-targeted therapeutics in anticancer therapy. Nat Rev Cancer. 2002; 2 (10): 750–763.
23. Tolcheva EV. Design of immunoliposomes and study of immunoliposomal form of anticancer drug doxorubicin. Abstract dis kand Biol sciences. M., 2007; 109 p.
24. Sokolova DV, Tazina EV, Kortava MA. et al. Anti-CD40 and anti-HLA-DR immunoliposomal form doxorubicin: technology of production and antigen specificity in vivo. Ross biotherapeutic J. 2010; 9 (2): 90.
25. Sokolova DV, Tazina EV, Kortava MA et al. Anti-MUC1 immunoliposomal form of doxorubicin: technology of production and antigen specificity in vitro. Ross biotherapeutic J. 2010; 9 (3): 21.
26. Khugaeva OV, Kortava MA, Sokolova DV et al. Receiving liposomal mitoxantrone/materials of the IX all-Russian. scientific.-prakt. Conf. "Domestic anticancer drugs". Ross biotherapeutic J. 2010; 9 (2): 91.
27. Nasonov EL. Prospects of rituximab use in autoimmune diseases of a person. Rus Med J. 2007; 15 (26): 1–6.
28. Sokolova DV. Immunoliposomal constructions of doxorubicin and models for their preclinical study. Abstract dis kand Biol sciences. M., 2011; 122.
29. Kawakami S, Fumoto S, Nishikawa M et al. In vivo gene delivery to the liver using novel galactosylated cationic liposomes. Pharmaceuttic Research. 2000; 17 (3): 306–313.
30. Dass CR, Choong PFM. Targeting of small molecule anticancer drugs to the tumor and its vasculature using cationic liposomes: lessons from gene therapy. Cancer Cell Int. 2006; 6 (17): 1–9.
31. Ponce AM, Wright A, Dewhirst MW, Needham D. Targeted bioavailability of drugs by triggered release from liposomes. Future Lipidol. 2006; 1 (1): 25–34.
32. Jain S, Mishra V, Singh P et al. RGD-anchored magnetic liposomes for monocytes/neutrophils-mediated brain targeting. Int J Pharm. 2003; 261 (1–2): 43–55.
33. Qin J, Chen D, Hu H et al. Surface modification of RGD-liposomes for selective drug delivery to monocytes/Neutrophils in brain. Chem Pharm Bull. 2007; 55 (8): 1192–1197.
34. Campbell RB, Fukumura D, Brown EB et al. Cationic charge determines the distribution of liposomes between the vascular and extravascular compartments of tumors. Cancer Res. 2002; 62: 6831–6836.
35. Ambegia E, Ansell S, Cullis P et al. Stabilized plasmid-lipid particles containing PEG-diacylglycerols exhibit extended circulation lifetimes and tumor selective gene expression. Biochim Biophys Acta. 2005; 1669 (2): 155–163.
36. Dass CR. Improving anti-angiogenic therapy via selective delivery of cationic liposomes to tumor vasculature. Int J Pharm. 2003; 267 (1–2): 1–12.
37. Tazina EV, Mescheryakova VV, Ignatieva EV et al. Biopharmaceutical studies of temperature-sensitive liposomal formulations of doxorubicin. Ross biotherapeutic J. 2009; 1 (8): 40–47.
38. Huang Z, Szoka FC. Bioresponsive liposomes and their use for macromolecular delivery. In: G. Gregoriadis eds. Liposome technology. 3rd edn. Vol. I. Liposome preparation and related techniques. New York: Informa Healthcare USA, 2007; 165–196.
39. Chekhonin VP, Zhirkov YuA, Aglow NV et al. Directed transport of drugs using liposomes. Vestn RAMS. 2004; 5: 42–47.
40. Wu D, Pardridge WM. Neuroprotection with noninvasive neurotrophin delivery to the brain. Proc Natl Acad Sci USA. 1999; 96: 254–259.
41. Shi N, Pardridge WM. Noninvasive gene targeting to the brain. Proc Natl Acad Sci USA. 2000; 97 (13): 7567–7572.
42. Pal A, Ahmad A, Khan S et al. Systemic delivery of RafsiRNA using cationic liposomes silences Raf in xenograft model of human prostate cancer. Int J Oncol. 2005; 26 (4): 1087–1091.
43. Omidi Y, Barar J, Akhtar S. Toxicogenomics of cationic lipid-based vectors for gene therapy: impact of microarray. Curr Drug Del. 2005; 2 (4): 429–441.
44. Oliveira S, Storm G, Schiffelers. Targeted delivery of siRNA. J Biomed Biotechnol. 2006; 2006: 1–7.
45. Miyazaki M, Obata Y, Abe K et al. Gene transfer using nonviral delivery systems. Perit Dial Int. 2006; 26: 633–640.
46. Aguilar JC. Vaccine adjuvants revisited. Vaccine. 2007; 25: 3752–3762.
47. Perrie Y, Frederik PM, Gregoriadis G. Liposome-mediated DNA vaccination: the effect of vesicle composition. Vaccine. 2001; 19: 3301–3310.
48. Pharmaceutical development: concept and practical recommendations. Scientific-practical guide for the pharmaceutical industry / ed. by Bykov SN, Vasilenko IA, Demina NB, Shokhin IE, Novojilov OV, Meshkovsky AP, Spitskov ORM. Pero, 2015; 472 p.
49. Lu D, Hickey AJ. Liposomal dry powders as aerosols for pulmonary delivery of proteins. AAPS Pharm Sci Tech. 2005; 6 (4): 641–648.
50. De Lima MCP, Simoes S, Pires P et al. Cationic lipid-DNA complexes in gene delivery: from biophysics to biological applications. Adv Drug Del Rev. 2001; 47: 277–294.

ЛИПИДОПОДОБНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА КАК ПЛАТФОРМА ДЛЯ ДОСТАВКИ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ В ПЕЧЕНЬ

В. И. Уварова[1,3] ✉, Т. Р. Низамов[1], М. А. Абакумов[1], С. С. Водопьянов[1], Т. О. Абакумова[2], И. В. Салтыкова[3], П. С. Могильников[4], И. В. Щетинин[4], А. Г. Мажуга[1,5]

[1] Лаборатория биомедицинских наноматериалов, Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

[2] Центр наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий, Москва

[3] Лаборатория тканеспецифических лигандов, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[4] Кафедра физического материаловедения, Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

[5] Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва

Адресная доставка антисмысловых препаратов является перспективной технологией, на основе которой возможна разработка высокоэффективных лекарственных средств для терапии широкого спектра заболеваний. Однако недостаточная стабильность РНК в биологических средах и гидрофильность, ограничивающая проникновение через клеточные мембраны, существенно сужают их использование в клинической практике. Целью исследования была разработка средств доставки антисмысловых препаратов в гепатоциты печени с помощью липидоподобных магнитных наночастиц (ЛНЧ). Кубические магнитные наночастицы (НЧ) со средними размерами 16 и 27 нм синтезировали методом высокотемпературного разложения прекурсора — олеата железа (III) и химически модифицировали формуляцией, включающей катионный липидоид C12-200. Магнитные НЧ обладают хорошими МРТ-контрастными свойствами, биораспределение ЛНЧ исследовали *in vivo* на линейных мышах BALB/c с помощью МР-томографа. С этой же целью провели последующее гистологическое исследование срезов печени. Наночастицы меньшего размера не продемонстрировали цитотоксического действия по отношению к клеточным линиям HepG2 и Huh7, а для НЧ кубической формы большего размера IC_{50} составила 21,5 мкг/мл для HepG2 и 126 мкг/мл для Huh7. Выявлено, что НЧ меньшего размера аккумулируются преимущественно в гепатоцитах печени, а НЧ большего размера — в селезенке, в печени же они накапливаются главным образом в макрофагах. Такая разница может быть вызвана большим гидродинамическим размером НЧ, которые имеют больший размер магнитного ядра. Образец с ядром меньшего размера является наиболее эффективной платформой для доставки антисмысловых препаратов в гепатоциты.

Ключевые слова: магнитные наночастицы, МРТ, липиды, адресная доставка

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение № 14.578.21.0201 (уникальный идентификатор RFMEFI57816X0201).

✉ **Для корреспонденции:** Виктория Игоревна Уварова
ул. Ленинский проспект, д. 4, г. Москва, 119049; uvarova_viktoriya@bk.ru

Статья получена: 26.06.2018 **Статья принята к печати:** 25.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.080

LIPIDOID IRON OXIDE NANOPARTICLES ARE A PLATFORM FOR NUCLEIC ACID DELIVERY TO THE LIVER

Uvarova VI[1,3] ✉, Nizamov TR[1], Abakumov MA[1], Vodopyanov SS[1], Abakumova TO[2], Saltykova IV[3], Mogilnikov PS[4], Shchetinin IV[4], Majouga AG[1,5]

[1] Laboratory of Biomedical Nanomaterials, National University of Science and Technology MISiS, Moscow

[2] Center of Life Science, Skolkovo Institute of Science and Technology, Moscow

[3] Laboratory of Tissue Specific Ligands Investigation, Lomonosov Moscow State University, Moscow

[4] Department of Physical Materials Science, National University of Science and Technology MISiS, Moscow

[5] Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

Targeted delivery of antisense drugs is a promising technology which can provide a platform for the development of highly effective therapeuticals against a broad range of diseases. Insufficient stability of RNA in biological media coupled with hydrophilicity that prevents the molecule from penetrating cell membranes considerably limit RNA application in clinical practice. The aim of this work was to design a system for antisense drug delivery to liver hepatocytes using lipidoid magnetic nanoparticles (LNP). Nanocubes (NC) with average sizes of 16 and 27 nm were synthesized through decomposition of iron (III) oleate under high temperature conditions and functionalized with a cationic lipidoid C12-200. Magnetic NC demonstrated good MR-contrasting properties. Biodistribution of LNP was studied *in vivo* in BALB/c mice using the MR scanner. Additionally, liver sections obtained from the mice were subjected to histological examination. Nanoparticles of smaller size did not have a cytotoxic effect on HepG2 and Huh7 cell lines, whereas for larger NC, IC_{50} was 21.5 μg/ml and 126 μg/ml for HepG2 and Huh7 cells, respectively. Smaller particles tended to accumulate in hepatocytes. Bigger NC mainly accumulated in the spleen but also ended up in liver macrophages. This fact can be explained by a bigger hydrodynamic size of nanoparticles with a bigger magnetic core. Particles with smaller cores are a more effective platform for the delivery of antisense drugs to hepatocytes.

Keywords: magnetic nanoparticles, MRI, lipids, targeted delivery

Funding: the study was funded by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation. Project 14.578.21.0201 (ID RFMEFI57816X0201).

✉ **Correspondence should be addressed:** Victoria I. Uvarova
Leninsky 4, Moscow, 119049; uvarova_viktoriya@bk.ru

Received: 26.06.2018 **Accepted:** 25.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.080

Известно, что повышение уровня липопротеинов низкой плотности и их метаболитов в сыворотке крови (гиперлипидемия) напрямую связано с образованием атеросклеротических бляшек и риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [1], которые на сегодняшний день занимают первое место по смертности в мире [2]. Одним из подходов к снижению уровня липидов в крови являются методы, основанные на подавлении экспрессии целевых генов, вызывающих повышение уровня липопротеинов в плазме [3, 4]. В частности, уровни липопротеинов могут быть уменьшены с помощью ингибирования синтеза белков, играющих важную роль в их метаболизме, например ангиопоэтин-подобного белка 3, аполипопротеинов B и C3, продуцируемых клетками печени [5]. Однако основными препятствиями на пути к безопасной и эффективной липидснижающей генной терапии являются проблемы, связанные с адресной доставкой антисмысловых препаратов в гепатоциты и с максимизацией выхода терапевтического агента из эндоцитарных везикул [6, 7].

Системы доставки антисмысловых препаратов традиционно разделяются на вирусные и невирусные [8, 9]. Вирусы способны с высокой эффективностью доставлять в клетки чужеродный генетический материал, однако вероятность возникновения сильного иммунного ответа (в случае аденовирусов) и риск мутагенеза (для ретровирусных векторов) вызывают активные дискуссии относительно безопасности применения подобных систем [10]. К невирусным системам переноса относятся векторы на основе неорганических НЧ [11], липосом [12, 13], комплексов с катионными липидами или полимерами [14, 15].

Среди средств доставки нуклеиновых кислот особо стоит отметить такой перспективный тип объектов, как липидоиды или липидоподобные материалы. Они показывают высокую эффективность и в роли контейнеров для доставки лекарств, и в качестве химических модификаторов поверхности НЧ для последующей загрузки нуклеиновых кислот. По результатам исследований, системы доставки РНК на основе, к примеру, липидоида C12-200 показали высокую эффективность в экспериментах на целом ряде животных, таких как грызуны и нечеловекообразные обезьяны [16]. При формировании ЛНЧ необходимы вспомогательные липиды: фузогенный фосфолипид (DSPC), увеличивающий трансфекционную активность путем дестабилизации липидного бислоя клеточных мембран, ПЭГ-липид (mPEG2000-DMG), уменьшающий иммунный ответ путем увеличения стабилизации и защиты ЛНЧ от макрофагов, и холестерин, заполняющий пространство между липидами и усиливающий активность катионных липидов [17].

Стоит отметить, что методы трансфекции сильно различаются по эффективности, которая зависит от точности адресной доставки в орган-мишень, взаимодействия носителя с клеточной мембраной и его высвобождения из эндосом. Проблемой при использовании невирусных систем для трансфекции является то, что после эндоцитоза [18] они могут остаться изолированными в эндосомальном компартменте клеток и впоследствии привести к деградации терапевтического гена. Именно с этим связан активный поиск стратегий, позволяющих повысить вероятность выхода невирусных векторов из эндосом и, соответственно, эффективность трансфекции.

Одним из возможных способов обойти проблему низкой эффективности трансфекции для невирусных систем является использование структур на основе магнитных НЧ оксида железа. Наночастицы магнитных оксидов железа (магнетита, маггемита) обладают рядом привлекательных для биомедицинского применения свойств, среди которых адресная доставка лекарств, магнитная гипертермия, а также возможность использования этих НЧ в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии (МРТ) [19]. Также следует отметить, что при приложении низкочастотного магнитного поля к изучаемой системе, включающей магнитные НЧ и биологический объект (клетки, лабораторные животные) — благодаря эффекту броуновской релаксации, который выражается в интенсивных колебательных движениях магнитных НЧ, — становится возможным контролируемое высвобождение терапевтических молекул, адсорбированных на поверхности магнитных средств доставки. Упомянутый подход способен существенно увеличить терапевтическую эффективность препаратов, так как имеются данные о более успешном — в сравнении с обычными липосомами — применении магнитолипосом (т. е. липосом, содержащих магнитные НЧ) в адресной доставке лекарств (доксорубицин, паклитаксел) [20, 21].

Функциональные свойства средств доставки препаратов на основе магнитных НЧ в значительной степени определены их магнитными свойствами, например, на контрастные свойства влияет не только размер магнитных НЧ, но и их геометрия [22].

Целью исследования была разработка средств доставки нуклеиновых кислот на основе НЧ оксида железа кубической формы, функционализированных липидной формуляцией, и использование этих средств в качестве платформы для эффективной доставки антисмысловых препаратов в гепатоциты *in vivo*.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали следующие материалы: 1-октадецен, триоктиламин, дибензиловый эфир, олеиновая кислота, олеат натрия, олеат железа (III), ацетат натрия безводный, холестерин, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолин (DSPC), 1,2-димиристоил-sn-глицеролполиэтиленгликоль монометиловый эфир (DMG-mPEG), N-метил-2-пирролидон (Sigma-Aldrich; США), соляная кислота, азотная кислота, этанол, бутанол-1, хлороформ (ООО «СигмаТек»; Россия), 1,1'-(2-(4-(2-((2-(бис(2-гидроксидодецил)амино)этил)(2-гидроксидецил)амино)этил) пиперазин-1-ил)этилазанедиил)дидодекан-2-ол (C12-200), DMEM и DMEM/F12, деионизированная вода.

Клеточные культуры

Исходный сток клеток линии Huh7 был получен из Отдела структуры и функций РНК НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского МГУ. Исходный сток клеток культуры HepG2 был приобретен коммерческим способом через банк клеток (ATCC, HB-8065). Работу с клетками проводили в стерильном ламинарном шкафу II класса защиты SafeFAST Elite 212 S (Faster; Италия). Клетки культивировали в CO_2-инкубаторе MCO-18AIC CO_2 Incubator (Sanyo; Япония) при 37 °C и 5% углекислого газа. Для культивирования клеточной линии Huh7 использовали среду DMEM (Corning, № 10-013-CV), содержащую 4,5 г/л глюкозы, 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 4 мМ L-глутамина, а для клеточной линии HepG2 — среду DMEM/F12 (Gibco™, № 21331020), содержащую 10% эмбриональной бычьей сыворотки и 4 мМ L-глутамина.

Животная модель

Эксперименты выполняли на половозрелых самках мышей породы BALB/c возрастом 6–7 недель, весом 19–20 г, которые были приобретены в Центральном питомнике лабораторных животных Академии медицинских наук (Андреевка; Россия) и содержались в индивидуально вентилируемых клетках. Исследование одобрено этическим комитетом Российского национального исследовательскго медицинского университета им. Н. И. Пирогова (протокол № 1/2016 от 3 февраля 2016 г.)

Синтез липидоподобных наночастиц кубической формы

Синтез прекурсора — олеата железа (III) проводили согласно стандартному протоколу [23]. НЧ магнетита кубической формы со средним размером 16 нм (CbS) получали методом термического разложения этого прекурсора в высококипящем органическом растворителе, описанным ранее [24].

Получение НЧ кубической формы со средним размером 27 нм (CbB) проводили в две стадии. На первой стадии вышеописанным методом подготавливали магнитные зародыши, на второй — путем дополнительного введения прекурсора в реакционную среду — получали НЧ большего размера. 37,5 мг зародышей, 0,35 г олеата натрия и 0,32 г олеиновой кислоты помещали в трехгорлую колбу, добавляли смесь растворителей, состоящую из 2,85 г триоктиламина и 3,13 г дибензилового эфира. Колбу, оснащенную ртутным термометром, нагревали до температуры 110 °C при интенсивном перемешивании под током аргона, выдерживали в этих условиях 1 ч и далее нагревали смесь до температуры кипения со скоростью 5 °C/мин. Затем в реакционную среду по каплям вносили 20 мл 0,2 М раствора олеата железа (III) в дибензиловом эфире со скоростью 3 мл/ч, а далее выдерживали реакционную смесь при кипении в течение 20 мин, после чего охлаждали до комнатной температуры. Полученные НЧ отделяли с помощью магнитной декантации путем смешивания смеси с бутанолом-1. Затем осадок редиспергировали в органическом растворителе — хлороформе и обрабатывали ультразвуком в течение 5–10 мин.

Для получения ЛНЧ использовали процедуру фазового переноса [25]. Формуляция покрытия состояла из липидоида C12-200 [26], холестерина, 1,2-дистеароил-sn-глицеро-3-фосфохолина (DSPC) и 1,2-димиристоил-sn-глицерополиэтиленгликоля монометилового эфира (DMG-mPEG) в массовом соотношении 75 : 15 : 7 : 3. Масса формуляции липидов для покрытия — 0,9 и 1% от массы НЧ (по магнетиту) для CbB и CbS соответственно.

Определение физико-химических характеристик

Просвечивающая электронная микроскопия (*ПЭМ*)

Микрофотографии НЧ были получены на просвечивающем электронном микроскопе JEOL 1200-EX II TEM (JEOL; Япония) с рабочим ускоряющим напряжением 100 кВ. Образцы готовили нанесением 1–2 мкл раствора НЧ на покрытую формваром медную сетку (d = 3,05 мм), которую затем сушили на воздухе. Дальнейшую обработку фотографий (расчет распределения по размерам, определение морфологии) осуществляли в версии 1.50d программы ImageJ (Wayne Rasband (NIH); США).

Рентгенофазовый анализ (*РФА*)

Рентгенофазовый анализ исследуемых образцов для определения параметров кристаллической структуры проводили на дифрактометре ДРОН-4 (ЛНПО «Буревестник»; Россия) (CoKα излучение с λ = 0,179 нм, напряжение трубки 40 кВ, ток 30 мА) в диапазоне дифракционных углов 2θ от 20° до 120° с шагом 0,1°; время экспозиции на точку съемки 3 с. Качественный фазовый анализ осуществляли путем сопоставления спектров с использованием базы данных по рентгеновским спектрам фаз (программа PHAN, около 200 000 фаз).

Термогравиметрический анализ и дифференциальная сканирующая калориметрия (*ТГА/ДСК*)

ТГА и ДСК проводили на синхронном термоанализаторе Netzsch STA 449 F3 (NETZSCH; Германия). Нагревали образцы в алундовых тиглях в атмосфере аргона в температурном интервале от 50 до 800 °C со скоростью 10 °C/мин. Для проведения этих анализов растворы НЧ упаривали до состояния порошка на роторном испарителе.

Вибромагнетометрия

Измерение статических магнитных свойств в интервале магнитных полей от –20 до 20 кЭ при 300 K проводили с помощью установки Quantum Design Physical Property Measurement System (PPMS; Германия), оборудованной вибромагнетометрической вставкой (VSM), амплитуда колебаний составляла 2 мм, частота — 40 Гц. Чувствительность прибора — 10^{-6} э.м.е.

Фотонная корреляционная спектроскопия (*ФКС*)

Для определения гидродинамического размера и ζ-потенциала (заряда) ЛНЧ методом ФКС готовили раствор магнитных НЧ (концентрация ~ 0,5 мг/мл) в фосфатно-солевом буфере 1×PBS либо в дистиллированной воде. Измерение проводили с помощью прибора Zetasizer Nano ZS (Malvern; Германия) в пластиковых (или стеклянных) кюветах при 25 °C. Для измерения ζ-потенциала использовали капиллярные пластиковые кюветы с электродами, измерение осуществляли в дистиллированной воде.

Оценка цитотоксичности липидоподобных наночастиц *in vitro*

Цитотоксичность ЛНЧ оценивали с помощью MTS-теста (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-5-(3-карбоксиметоксифенил)-2-(4-ульфофенил)-H-тетразолиум) [27]. Для этого клетки гепатоцеллюлярной карциномы человека Huh7 и HepG2 высаживали в 96-луночные планшеты (5000 кл./лунка) и культивировали до достижения 70% конфлуентности монослоя (48 ч, 37 °C, 5% CO_2). Исследуемые препараты (CbS и CbB) вносили в лунки в концентрации по магнетиту 370; 187; 94; 47; 23; 12; 6 мкг/мл и 420; 210; 105; 52; 26; 13; 6 мкг/мл соответственно, после чего инкубировали в течение 24 ч (37 °C, 5% CO_2), отмывали и вносили в лунки MTS-реагент. В качестве контроля клетки инкубировали в среде с добавлением эквивалентных образцам объемов фосфатно-солевого буфера (1×PBS). Оптическую

плотность измеряли на планшетном анализаторе VictorX3 (PerkinElmer; США) при длине волны λ = 490 нм. Долю выживших клеток подсчитывали как отношение оптической плотности экспериментальных образцов после внесения частиц к оптической плотности контрольных образцов. Построение графиков и расчет значения IC_{50} (концентрации полуингибирования, т. е. концентрации, при которой 50% клеток погибает) проводили с использованием программы GraphPad Prism 8.0.0 (GraphPad Software; США).

Исследование биораспределения

Оценку локализации ЛНЧ проводили на линейных мышах BALB/c (по три животных в группе), которым вводили внутривенно 120 мкл раствора ЛНЧ (концентрация по железу 720 мкг/мл); животные в контрольной группе не получали инъекции.

Определение динамики накопления ЛНЧ методом МРТ

МРТ проводили с использованием 7Т МР-томографа ClinScan (Bruker Biospin; США). Для получения трансверсальных Т2-взвешенных изображений применялся режим с частотным подавлением жира со следующими параметрами последовательности Turbo Spin Echo (TSE): TR/TE = 2000/42 мс, толщина среза 1 мм, матрица 380 • 640, FOV = 34 • 60 мм. Для оценки накопления НЧ в динамике МРТ-исследования проводили до введения частиц, через 1 ч, 12 ч, 24 ч и 48 ч после инъекции.

Гистологические исследования

Через 48 ч после внутривенной инъекции ЛНЧ животным вводили интраперитонеально летальную дозу золетила. После исчезновения рефлексов срединным надрезом вскрывали брюшную полость, грудину рассекали с двух сторон поперек ребер. После этого полость правого предсердия вскрывали, а иглу, введенную в левый желудочек, через канюлю присоединяли к шприцу Жане. Перфузию проводили 40 мл фосфатно-солевого буфера. Затем производили дислокацию шейных позвонков и извлекали органы: печень, селезенку, почки, сердце, легкие. Извлеченные органы фиксировали 4%-м раствором параформальдегида и хранили при 4 °С до проведения дальнейших исследований. На вибратоме Thermo Scientific Microm HM 650 V Vibration (Thermo Fisher Scientific; США) получали срезы толщиной 60 мкм. Затем их окрашивали по Перлсу набором красителей Iron Stain Kit (Sigma-Aldrich; США). При реакции Перлса гистологические срезы обрабатывали смесью растворов соляной кислоты и гексацианоферрата (II) калия; депозиты соединений железа в тканях под действием этих растворов образуют берлинскую лазурь, гранулы которой (цвета разных оттенков синего) обнаруживаются при световой микроскопии. После двукратной отмывки дистиллированной водой срезы заключали в 70%-й глицерин. Микрофотографии готовых гистологических срезов делали при помощи светового микроскопа Carl Zeiss (Германия), оснащенного камерой Axioplan 2 Imaging.

Определение биораспределения железа во внутренних органах методом атомно-эмиссионной спектрометрии с индуктивно-связанной плазмой (АЭС)

Фрагменты (примерно треть печени и селезенки, одна почка, одно легкое, половина сердца) фиксированных органов растворяли в 2 мл свежеприготовленного раствора смеси 1500 мкл концентрированной соляной (HCl) и 500 мкл азотной (HNO_3) кислот. Инкубировали фрагменты в растворе кислот в течение 24 ч, после чего доводили водой до конечного объема в 20 мл для печени и селезенки и 10 мл для сердца, почки и легкого; разбавленные растворы использовали для анализа концентрации железа. После построения калибровочной кривой выполняли измерение концентрации железа на атомно-эмиссионном спектрометре 4200 MP–AES (Agilent Technologies, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Микрофотография монодисперсных кубических НЧ со средним размером 16 нм (CbS), полученная с помощью ПЭМ, и гистограммы распределения по размеру представлены на рис. 1А. Более крупные кубические НЧ (CbB) размером 20–30 нм на ПЭМ-изображении имеют четко определенную морфологию, ограненную кубическую форму (рис. 1Б).

Результаты рентгенофазового анализа обоих образцов очень похожи: положения пиков на дифракционной картине соответствуют структуре обращенной шпинели для магнетита с параметрами решетки, равными 0,838 нм и 0,839 нм для образцов CbS и CbB соответственно (рис. 2А). Петли магнитного гистерезиса (рис. 2Б) свидетельствуют о том, что образцы CbS и CbB являются ферримагнетиками с коэрцитивной силой 20–30 кА/м; для образца CbS намагниченность насыщения (Ms) составляет 61 А • $м^2$/кг.

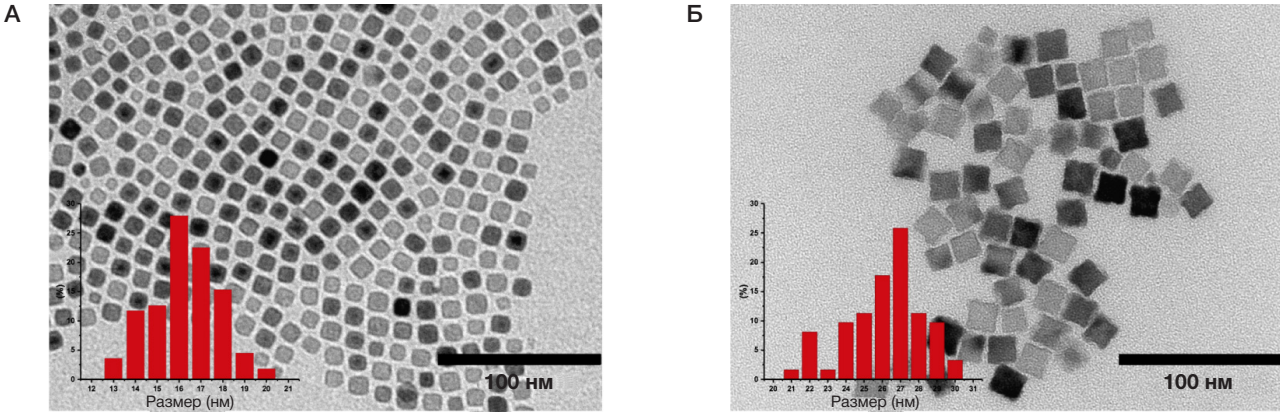


Рис. 1. ПЭМ-изображение и гистограмма распределения по размерам образцов наночастиц магнетита: с размером в диапазоне от 10 до 20 нм (**А**); с размером в диапазоне от 20 до 30 нм (**Б**)

Крупные НЧ кубической формы (CbB) имеют Ms, равную 89 А • м²/кг. Намагниченность насыщения была нормирована на количество фазы оксида железа за вычетом массы органических стабилизаторов, определенной с помощью ТГ/ДСК-анализа (рис. 2В).

На ТГ-кривой для образца CbS отмечаются три участка с резкой потерей массы: первый — в области 150–300 °С, которая соответствует десорбции органических соединений, нековалентно связанных с поверхностью НЧ; второй находится в области 300–450 °С, где десорбируются стабилизаторы, связанные ковалентно, а в области 600–700 °С (это третий участок) происходит фазовое превращение магнетита. Для ТГ-кривой образца CbB участок десорбции ковалентно и нековалентно связанных органических молекул с поверхности более гладкий; при температуре выше 500 °С также наблюдается фазовый переход.

НЧ кубической формы, имеющие на поверхности гидрофобные остатки олеиновой кислоты, могут быть диспергированы в неполярных органических растворителях (хлороформ, гексан); они представляют собой седиментационно-устойчивую коллоидную систему. Средний гидродинамический размер образцов CbS и CbB в хлороформе представлен на рис. 3 А. Коэффициент полидисперсности (PdI) составляет 0,113 и 0,151 для НЧ со средним фактическим размером 16 нм и 27 нм соответственно. Для перевода в водную фазу НЧ магнетита были покрыты формуляцией липидов, состоящей из липидоида C12-200, холестерина, DSPC и 1,2- DMG-mPEG в массовом соотношении 75 : 15 : 7 : 3. После покрытия образцов формуляцией липидов и перевода в водную фазу средний гидродинамический размер образца CbS стал равен 50,9 нм (PdI = 0,119) (рис. 3Б), поэтому, основываясь на характере распределения, можно предположить, что большая часть ЛНЧ находится в растворе в виде одиночных частиц, а меньшая — собирается в нанокластеры по несколько частиц. У образца CbB — противоположный характер распределения: средний гидродинамический размер, равный 118,6 нм (PdI = 0,201) (рис. 3Б) более чем в 4 раза превосходит фактический, что говорит о большей кластеризации НЧ кубической формы после покрытия липидами. Значение ζ-потенциала ЛНЧ на основе кубических НЧ магнетита в воде является положительным и составляет +20,5 мВ и +34,3 мВ для образцов CbB и CbS соответственно.

Выживаемость клеток после инкубации с образцами CbS и CbB для клеточных линий HepG2 и Huh7 представлена на рис. 4. На основе MTS-теста была определена IC_{50} образца CbB, которая составила 21,5 мкг/мл по магнетиту для культуры клеток HepG2 и 126 мкг/мл (в 6 раз выше) по магнетиту для Huh7. Образец CbS не продемонстрировал цитотоксичность в исследуемых концентрациях ни для одной из протестированных культур клеток.

На рис. 5 А представлены репрезентативные T2-взвешенные коронарные срезы, на которых хорошо заметно накопление НЧ в печени и селезенке лабораторных мышей через 0–48 ч после внутривенного введения. Уже спустя 1 ч после инъекции в этих органах наблюдали выраженное накопление CbS и CbB, которое сохранялось неизменным в последующие 48 ч. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при внутривенном введении НЧ эффективно накапливаются в указанных органах. Следует отметить, что МРТ является полуколичественным методом и не позволяет сделать однозначных выводов о

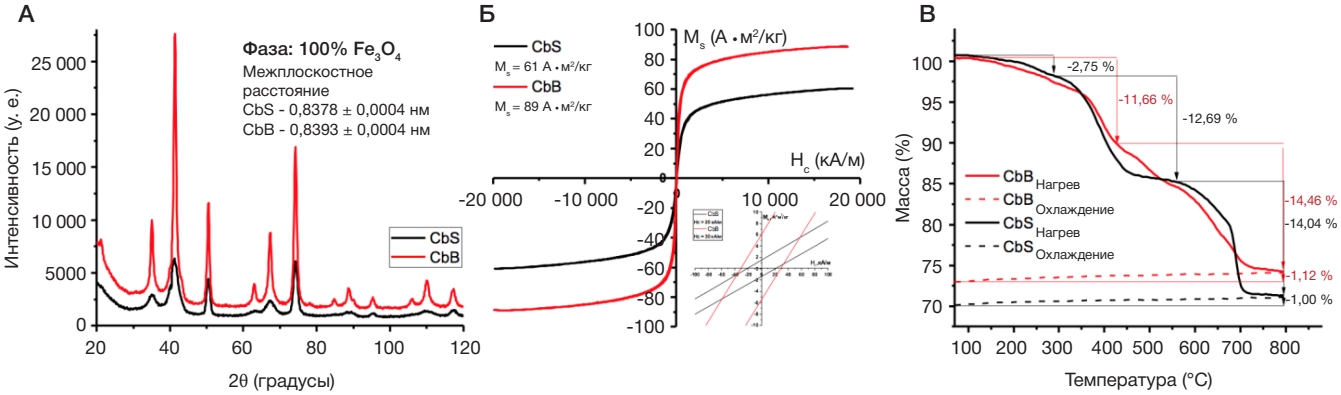


Рис. 2. Физико-химические свойства НЧ кубической формы: по результатам рентгенофазового анализа (**А**); петли магнитного гистерезиса (**Б**); по результатам ТГ/ДСК-анализа (**В**)

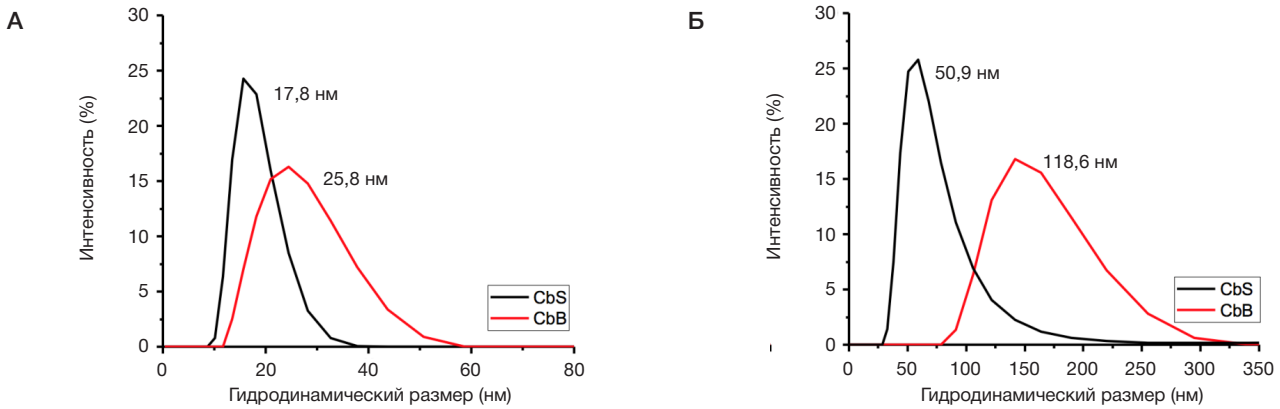


Рис. 3. А. Гидродинамический размер НЧ кубической формы в хлороформе до покрытия липидами. **Б**. Гидродинамический размер нанокластеров в воде после покрытия липидами

различиях в накоплении препарата между разными типами НЧ, а также между различными органами. В связи с этим проводили дополнительное исследование накопления железа во внутренних органах методом АЭС (рис. 5Б). Больше всего ЛНЧ секвестрируется в печени и селезенке, что соответствует результатам МРТ-исследования (рис. 5А). Накопление исследуемых ЛНЧ в других внутренних органах пренебрежимо мало. Кроме того, можно заключить, что образец CbS наиболее эффективно накапливается в печени (84% от введенных ЛНЧ), тогда как образец CbB, напротив, характеризуется относительно низким в ней накоплением (43% от введенной дозы).

На снимках срезов печени, окрашенных по методу Перлса, в каждой из исследуемых групп хорошо видно повышенное накопление железа в печени для обоих типов НЧ по сравнению с контрольным образцом (рис. 6). Кроме того, обращает на себя внимание различие в характере накопления железа между исследуемыми образцами. Образец CbS демонстрирует диффузное накопление в паренхиме органа — предположительно, в гепатоцитах. Для образца CbB наблюдается смешанный паттерн окраски: частично накопление происходит в клетках неправильной формы, расположенных на границе синусоидов и паренхимы — предположительно, в макрофагах, а частично отмечается диффузное окрашивание, характерное для накопления в гепатоцитах.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В классическом механизме роста НЧ можно выделить три этапа: на первом этапе прекурсор — олеат железа (III) разлагается с образованием нестабильных железо-органических интермедиатов вплоть до достижения критической концентрации пересыщения, необходимой для зародышеобразования. На втором этапе концентрация интермедиатов в среде уменьшается — вследствие присоединения их молекул к поверхности зародышей, которые начинают таким образом постепенно расти. На последнем этапе концентрация интермедиата падает до термодинамически стабильных значений, а образованные НЧ претерпевают изменения путем созревания по Оствальду. Достижение роста НЧ с постоянной скоростью за счет непрерывного контролируемого добавления прекурсора на втором этапе приводит к равномерному увеличению размера с сохранением монодисперсности. Такой подход позволяет получить НЧ с точно заданным, теоретически сколь угодно большим размером и низкой полидисперсностью, что особенно актуально для частиц размером больше 20 нм. Дополнительное введение в реакционную среду стабилизатора — олеата натрия, который специфически адсорбируется на плоскости (111), приводит к образованию НЧ кубической формы (рис. 1Б). Скорость, концентрация и длительность введения прекурсора на второй стадии синтеза образца CbB подбирались экспериментально. При низкой скорости подачи раствора олеата железа (III) НЧ претерпевали изменение размера путем оствальдовского созревания — происходил перенос вещества от мелких частиц к крупным, следствием чего явилось увеличение полидисперсности. Введение прекурсора на большей скорости резко повышало концентрацию интермедиатов в среде, что приводило к реализации механизма первичного зародышеобразования и, соответственно, росту полидисперсности НЧ.

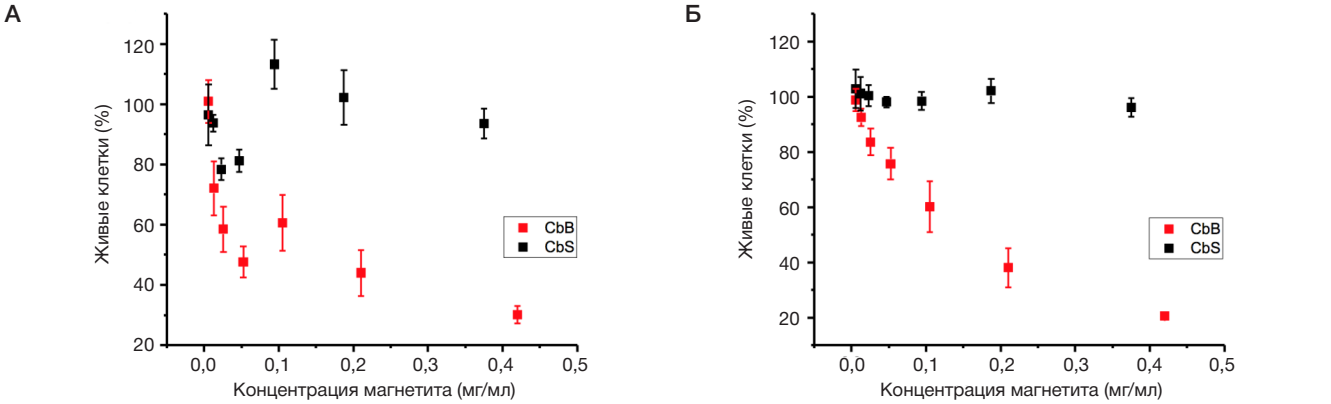


Рис. 4. Оценка цитотоксичности различных концентраций липидоподобных нанокластеров с магнитным ядром CbS и CbB на клеточных линиях HepG2 (**А**); Huh7 (**Б**)

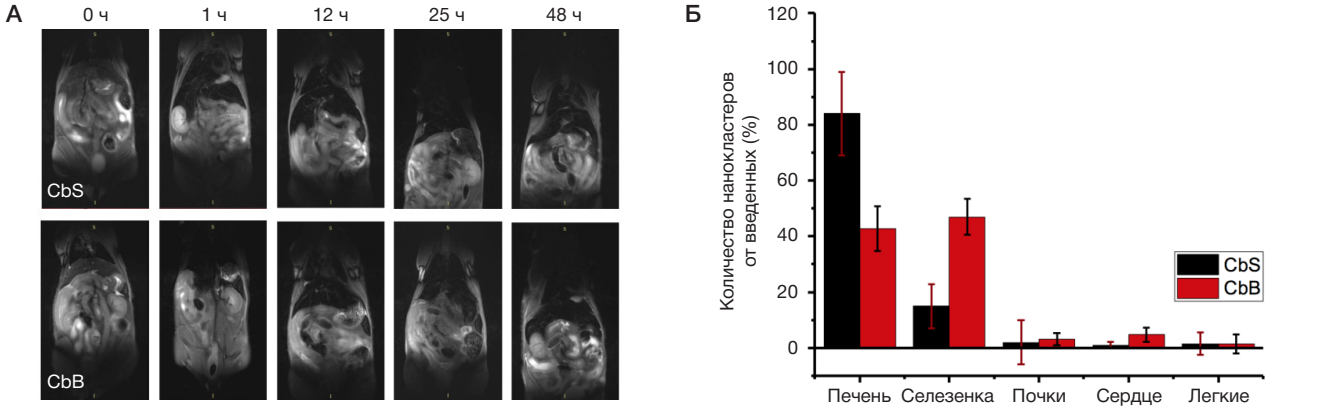


Рис. 5. Исследование локализации нанокластеров с магнитным ядром CbS и CbB в печени и селезенке методом МРТ (**А**); во всех исследованных органах методом АЭС (**Б**)

Рис. 6. Исследование локализации нанокластеров с магнитным ядром CbS и CbB в печени на клеточном уровне (окраска по Перлсу)

Результаты рентгенофазового анализа обоих образцов хорошо согласуются с литературными данными [28].

Намагниченность насыщения (Ms) для образца CbS согласуется с указанным в литературе значением для НЧ магнетита со средним размером, сопоставимым с размером образца CbS [23, 29]. Значение Ms крупных НЧ кубической формы (CbB) очень высокое, оно соизмеримо с намагниченностью насыщения массивного образца [30] или очень крупных НЧ [31].

Согласно данным ТГ/ДСК-анализа (рис. 2В), количество органической фазы, адсорбированной на поверхности НЧ оксида железа, составляет 15,5% от общей массы для образца CbS и 11,7% для образца CbB. При одинаковой массе образцов с уменьшением среднего размера НЧ увеличивается отношение площади поверхности к объему и, соответственно, растет число молекул стабилизаторов, которые могут там адсорбироваться. Эта закономерность существенно влияет на стабильность коллоидной системы, которая в большой степени обусловливается двумя факторами: стерической стабилизацией за счет наличия длинных гидрофобных остатков у олеиновой кислоты, адсорбированной на поверхности НЧ, и их агрегацией вследствие взаимного магнитного взаимодействия. С увеличением размера магнитного ядра образец CbB демонстрирует более высокий показатель PdI (ФКС), наблюдается расширение пика гидродинамического размера по сравнению с образцом CbS, что подтверждает бо̀льшую кластеризацию образца за счет увеличения размера магнитного ядра, обусловленную вкладом более выраженного магнитного взаимодействия.

Гидродинамический размер НЧ и физико-химические свойства их поверхности в значительной мере определяют характер клеточных взаимодействий, эндоцитарную маршрутизацию и эффективность поглощения [32, 33]. Для НЧ внутриклеточная локализация связана с дезорганизацией цитоскелета [34, 35]. Наночастицы при значительном уровне накопления индуцировали деформации сети актина и тубулина в нейронных клетках-предшественницах мыши и первичных эндотелиальных клетках кровеносных сосудов человека [36]. Нами было высказано предположение, что простое физическое присутствие большого количества НЧ, заключенных в громоздкие лизосомальные структуры, обычно расположенные в околоядерной области, стерически затрудняет функцию цитоскелета и тем самым вызывает ремоделирование сети актина. Результаты исследования на определение цитотоксичности ЛНЧ хорошо коррелируют с теорией о токсичности НЧ вследствие дезорганизации цитоскелета, поскольку образец CbB, фактический размер которого в 1,7 раза превышает размер образца CbS, оказался токсичным для клеточных культур в исследуемых концентрациях — в отличие от образца CbS, исследуемого при аналогичном фазовом составе, составе покрытия и морфологии.

Исходные характеристики магнитных НЧ, такие как однородность по размеру и форме, высокая агрегационная устойчивость и стабильность покрытия, являются ключевыми факторами в понимании процессов фармакокинетики и биораспределения. Хорошо известно, что НЧ с гидродинамическим размером менее 20–30 нм фильтруются почечными клубочками, а с размером более 200 нм в большей степени накапливаются в селезенке [37]. НЧ в диапазоне размеров от 30 до 200 нм обычно секвестрируются в печени — они легко поглощаются эндоцитозными везикулами (со средним диаметром 40–60 нм), впрочем, частицы крупнее 150 нм фагоцитируются макрофагами (верхний предел для прохождения через кавеолу). Поэтому идеальный гидродинамический размер ЛНЧ для доставки в печень составляет от 30 до 150 нм. Согласно результатам проведенных нами гистологического исследования и изучения биораспределения НЧ в органах, образец CbB в основном захватывается клетками моноцитарно-макрофагальной системы организма, что объясняет равномерное распределение НЧ между печенью и селезенкой. Это согласуется с предыдущими исследованиями [38]. И, напротив, образец CbS не секвестрируется в макрофагах, а доставляется в гепатоциты, что определяет его преимущественное накопление в печени и согласуется с литературными данными для НЧ с магнитным ядром сопоставимого размера [39]. Вероятно, НЧ кубической формы более крупного размера (CbB) при введении в кровоток мыши увеличиваются в размере из-за адсорбции на их поверхности сывороточных белков, которые образуют «корону» биологических макромолекул [40], ввиду чего увеличивается гидродинамический размер этих НЧ и накопление происходит в большей степени в селезенке.

ВЫВОДЫ

Исследованная система адресной доставки антисмысловых препаратов в клетки печени показала свою перспективность как *in vivo*, так и *in vitro*. У полученных ЛНЧ CbS выявлена низкая токсичность по отношению к клеточным линиям Huh7 и HepG2. Изучение биологического распределения ЛНЧ с магнитными ядрами различных размеров *in vivo* показало значительный уровень накопления в печени, который наблюдался уже через 1 ч после инъекции и поддерживался в течение 48 ч (МРТ). Кубические НЧ с магнитным ядром оксида железа в диапазоне размеров от 10 до 20 нм и гидродинамическим размером менее 100 нм достигли более высоких уровней накопления в гепатоцитах (свыше 80% от введенной дозы), тогда как более крупные НЧ аккумулировались в клетках Купфера и других компонентах ретикулоэндотелиальной системы.

Литература

1. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, van Bilsen M, Hofker MH. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. Clin Chem Lab Med [Internet]. 2005 [cited 2017 Oct 28]; 43 (5): 470–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899668.
2. Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating Deaths From Cardiovascular Disease: A Review of Global Methodologies of Mortality Measurement. Circulation. 2013; 127 (6): 749–56.
3. Sullenger BA, Nair S. From the RNA world to the clinic. Science 17. 2016; 352 (6292): 1417–20.
4. McClorey G, Wood MJ. An overview of the clinical application of antisense oligonucleotides for RNA-targeting therapies. Curr Opin Pharmacol. 2015; (24): 52–8.
5. Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. Nucleic Acid Ther. 2018; 28 (3): 146–57.
6. Mahajan UM, Teller S, Sendler M, Palankar R, van den Brandt C, Schwaiger T et al. Tumour-specific delivery of siRNA-coupled superparamagnetic iron oxide nanoparticles, targeted against PLK1, stops progression of pancreatic cancer. Gut. 2016; 65 (11): 1838–49.
7. Kim M-C, Lin MM, Sohn Y, Kim J-J, Kang BS, Kim DK. Polyethyleneimine-associated polycaprolactone-Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a gene delivery vector. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater. 2017; 105 (1): 145–54.
8. Nayerossadat N, Ali P, Maedeh T. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Adv Biomed Res. 2012; 1 (1): 27.
9. Yang N. An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. Int J Pharm Investig. 2015; 5 (4): 179.
10. Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. Gene Ther. 2010; 17 (3): 295–304.
11. Qiu J, Kong L, Cao X, Li A, Wei P, Wang L et al. Enhanced Delivery of Therapeutic siRNA into Glioblastoma Cells Using Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles Conjugated with β-Cyclodextrin. Nanomaterials. 2018; 8 (3): 131.
12. Singh Y, Tomar S, Khan S, Meher JG, Pawar VK, Raval K et al. Bridging small interfering RNA with giant therapeutic outcomes using nanometric liposomes. J Control Release. 2015; (220): 368–87.
13. Leung AK, Tam YY, Cullis PR. Lipid Nanoparticles for Short Interfering RNA Delivery. Adv Genet. 2014; (88): 71–110.
14. Nakamura T, Yamada K, Fujiwara Y, Sato Y, Harashima H. Reducing the Cytotoxicity of Lipid Nanoparticles Associated with a Fusogenic Cationic Lipid in a Natural Killer Cell Line by Introducing a Polycation-Based siRNA Core. Mol Pharm. 2018; 15 (6): 2142–50.
15. Jin M, Jin G, Kang L, Chen L, Gao Z, Huang W. Smart polymeric nanoparticles with pH-responsive and PEG-detachable properties for co-delivering paclitaxel and survivin siRNA to enhance antitumor outcomes. Int J Nanomedicine. 2018; (13): 2405.
16. Novobrantseva TI, Borodovsky A, Wong J, Klebanov B, Zafari M, Yucius K et al. Systemic RNAi-mediated Gene Silencing in Nonhuman Primate and Rodent Myeloid Cells. Mol Ther Nucleic Acids. 2012; (1): e4.
17. Kumar V, Qin J, Jiang Y, Duncan RG, Brigham B, Fishman S et al. Shielding of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Impact on Physicochemical Properties, Cytokine Induction, and Efficacy. Mol Ther Nucleic Acids. 2014; (3): e210.
18. Alshehri A, Grabowska A, Stolnik S. Pathways of cellular internalisation of liposomes delivered siRNA and effects on siRNA engagement with target mRNA and silencing in cancer cells. Sci Rep. 2018; 8 (1): 3748.
19. Soenen SJ, Hodenius M, De Cuyper M. Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. Nanomedicine. 2009; 4 (2): 177–91.
20. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. Drug Dev Res [Internet]. 2006 [cited 2017 Sep 18]; 67(1): 55–60. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ddr.20067/abstract.
21. Zhang JQ, Zhang ZR, Yang H, Tan QY, Qin SR, Qiu XL. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: in vitro and in vivo studies. Pharm Res [Internet]. 2005 [cited 2017 Sep 18]; 22 (4): 573–83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846465.
22. Yang L, Wang Z, Ma L, Li A, Xin J, Wei R et al. The Roles of Morphology on the Relaxation Rates of Magnetic Nanoparticles. ACS Nano. 2018; 12 (5): 4605–14.
23. Bronstein LM, Huang X, Retrum J, Schmucker A, Pink M, Stein BD et al. Influence of Iron Oleate Complex Structure on Iron Oxide Nanoparticle Formation. 2007 [cited 2017 Dec 16]; 19 (15): 3624–32. Available from: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm062948j.
24. Hai HT, Yang HT, Kura H, Hasegawa D, Ogata Y, Takahashi M et al. Size control and characterization of wustite (core)/spinel (shell) nanocubes obtained by decomposition of iron oleate complex. J Colloid Interface Sci [Internet]. 2010; 346 (1): 37–42. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.02.025.
25. Jiang S, Eltoukhy A, Love K, Langer R, Anderson D. Lipidoid-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Efficient DNA and siRNA delivery. Nano Lett [Internet]. 2013; 1–6. Available from: citeulike-article-id:12014954%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1021/nl304287a.
26. Love KT, Mahon KP, Levins CG, Whitehead KA, Querbes W, Dorkin JR et al. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. Proc Natl Acad Sci. 2010; 107 (5): 1864–9.
27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65 (1–2): 55–63.
28. Mamani JB, Costa-Filho AJ, Cornejo DR, Vieira ED, Gamarra LF. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles coated with lauric acid. Mater Charact. 2013; (81): 28–36.
29. Nemati Z, Das R, Alonso J, Clements E, Phan MH, Srikanth H. Iron Oxide Nanospheres and Nanocubes for Magnetic Hyperthermia Therapy: A Comparative Study. J Electron Mater [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 16]; 46 (6): 3764–9. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11664-017-5347-6.
30. Cullity BD, Graham CD. Introduction to magnetic materials. 2nd ed. Hoboken, NJ: IEEE/Wiley, 2009; 544 p.
31. Marciello M, Connord V, Veintemillas-Verdaguer S, Vergés MA, Carrey J, Respaud M, et al. Large scale production of biocompatible magnetite nanocrystals with high saturation magnetization values through green aqueous synthesis. J Mater Chem B. 2013; 1 (43): 5995–6004.
32. Verma A, Stellacci F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. Small. 2010; 6 (1): 12–21.
33. Adler AF, Leong KW. Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: Impact on nonviral gene delivery. Nano Today. 2010; 5 (6): 553–69.
34. Gupta AK, Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. Biomaterials [Internet]. 2005 [cited 2017 Jun 9]; 26 (13): 1565–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522758.
35. Gupta AK, Curtis AS. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. Biomaterials. 2004; 25 (15): 3029–40.
36. Soenen SJH, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. High Intracellular Iron Oxide Nanoparticle Concentrations Affect Cellular Cytoskeleton and Focal Adhesion Kinase-Mediated Signaling. Small. 2010; 6 (7): 832–42.
37. Berry CC. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. J Phys D Appl Phys. 2009; 42 (22): 224003.
38. Zhang J, Ring HL, Hurley KR, Shao Q, Carlson CS, Idiyatullin D et al. Quantification and biodistribution of iron oxide nanoparticles in the primary clearance organs of mice using T1 contrast for heating. Magn Reson Med [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 22]; 78 (2): 702–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27667655.
39. Bargheer D, Giemsa A, Freund B, Heine M, Waurisch C, Stachowski GM et al. The distribution and degradation of radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles and quantum dots in mice. Beilstein J Nanotechnol. 2015; (6): 111–23.

40. Ruiz A, Hernández Y, Cabal C, González E, Veintemillas-Verdaguer S, Martínez E, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol. Nanoscale. 2013; 5 (23): 11400–8.

References

1. Wouters K, Shiri-Sverdlov R, van Gorp PJ, van Bilsen M, Hofker MH. Understanding hyperlipidemia and atherosclerosis: lessons from genetically modified apoe and ldlr mice. Clin Chem Lab Med [Internet]. 2005 [cited 2017 Oct 28]; 43 (5): 470–9. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15899668.
2. Pagidipati NJ, Gaziano TA. Estimating Deaths From Cardiovascular Disease: A Review of Global Methodologies of Mortality Measurement. Circulation. 2013; 127 (6): 749–56.
3. Sullenger BA, Nair S. From the RNA world to the clinic. Science 17. 2016; 352 (6292): 1417–20.
4. McClorey G, Wood MJ. An overview of the clinical application of antisense oligonucleotides for RNA-targeting therapies. Curr Opin Pharmacol. 2015; (24): 52–8.
5. Kulkarni JA, Cullis PR, van der Meel R. Lipid Nanoparticles Enabling Gene Therapies: From Concepts to Clinical Utility. Nucleic Acid Ther. 2018; 28 (3): 146–57.
6. Mahajan UM, Teller S, Sendler M, Palankar R, van den Brandt C, Schwaiger T et al. Tumour-specific delivery of siRNA-coupled superparamagnetic iron oxide nanoparticles, targeted against PLK1, stops progression of pancreatic cancer. Gut. 2016; 65 (11): 1838–49.
7. Kim M-C, Lin MM, Sohn Y, Kim J-J, Kang BS, Kim DK. Polyethyleneimine-associated polycaprolactone-Superparamagnetic iron oxide nanoparticles as a gene delivery vector. J Biomed Mater Res Part B Appl Biomater. 2017; 105 (1): 145–54.
8. Nayerossadat N, Ali P, Maedeh T. Viral and nonviral delivery systems for gene delivery. Adv Biomed Res. 2012; 1 (1): 27.
9. Yang N. An overview of viral and nonviral delivery systems for microRNA. Int J Pharm Investig. 2015; 5 (4): 179.
10. Nayak S, Herzog RW. Progress and prospects: immune responses to viral vectors. Gene Ther. 2010; 17 (3): 295–304.
11. Qiu J, Kong L, Cao X, Li A, Wei P, Wang L et al. Enhanced Delivery of Therapeutic siRNA into Glioblastoma Cells Using Dendrimer-Entrapped Gold Nanoparticles Conjugated with β-Cyclodextrin. Nanomaterials. 2018; 8 (3): 131.
12. Singh Y, Tomar S, Khan S, Meher JG, Pawar VK, Raval K et al. Bridging small interfering RNA with giant therapeutic outcomes using nanometric liposomes. J Control Release. 2015; (220): 368–87.
13. Leung AK, Tam YY, Cullis PR. Lipid Nanoparticles for Short Interfering RNA Delivery. Adv Genet. 2014; (88): 71–110.
14. Nakamura T, Yamada K, Fujiwara Y, Sato Y, Harashima H. Reducing the Cytotoxicity of Lipid Nanoparticles Associated with a Fusogenic Cationic Lipid in a Natural Killer Cell Line by Introducing a Polycation-Based siRNA Core. Mol Pharm. 2018; 15 (6): 2142–50.
15. Jin M, Jin G, Kang L, Chen L, Gao Z, Huang W. Smart polymeric nanoparticles with pH-responsive and PEG-detachable properties for co-delivering paclitaxel and survivin siRNA to enhance antitumor outcomes. Int J Nanomedicine. 2018; (13): 2405.
16. Novobrantseva TI, Borodovsky A, Wong J, Klebanov B, Zafari M, Yucius K et al. Systemic RNAi-mediated Gene Silencing in Nonhuman Primate and Rodent Myeloid Cells. Mol Ther Nucleic Acids. 2012; (1): e4.
17. Kumar V, Qin J, Jiang Y, Duncan RG, Brigham B, Fishman S et al. Shielding of Lipid Nanoparticles for siRNA Delivery: Impact on Physicochemical Properties, Cytokine Induction, and Efficacy. Mol Ther Nucleic Acids. 2014; (3): e210.
18. Alshehri A, Grabowska A, Stolnik S. Pathways of cellular internalisation of liposomes delivered siRNA and effects on siRNA engagement with target mRNA and silencing in cancer cells. Sci Rep. 2018; 8 (1): 3748.
19. Soenen SJ, Hodenius M, De Cuyper M. Magnetoliposomes: versatile innovative nanocolloids for use in biotechnology and biomedicine. Nanomedicine. 2009; 4 (2): 177–91.
20. Dobson J. Magnetic nanoparticles for drug delivery. Drug Dev Res [Internet]. 2006 [cited 2017 Sep 18]; 67(1): 55–60. Available from: http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ddr.20067/abstract.
21. Zhang JQ, Zhang ZR, Yang H, Tan QY, Qin SR, Qiu XL. Lyophilized paclitaxel magnetoliposomes as a potential drug delivery system for breast carcinoma via parenteral administration: in vitro and in vivo studies. Pharm Res [Internet]. 2005 [cited 2017 Sep 18]; 22 (4): 573–83. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15846465.
22. Yang L, Wang Z, Ma L, Li A, Xin J, Wei R et al. The Roles of Morphology on the Relaxation Rates of Magnetic Nanoparticles. ACS Nano. 2018; 12 (5): 4605–14.
23. Bronstein LM, Huang X, Retrum J, Schmucker A, Pink M, Stein BD et al. Influence of Iron Oleate Complex Structure on Iron Oxide Nanoparticle Formation. 2007 [cited 2017 Dec 16]; 19 (15): 3624–32. Available from: http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/cm062948j.
24. Hai HT, Yang HT, Kura H, Hasegawa D, Ogata Y, Takahashi M et al. Size control and characterization of wustite (core)/spinel (shell) nanocubes obtained by decomposition of iron oleate complex. J Colloid Interface Sci [Internet]. 2010; 346 (1): 37–42. Available from: http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2010.02.025.
25. Jiang S, Eltoukhy A, Love K, Langer R, Anderson D. Lipidoid-Coated Iron Oxide Nanoparticles for Efficient DNA and siRNA delivery. Nano Lett [Internet]. 2013; 1–6. Available from: citeulike-article-id:12014954%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1021/nl304287a.
26. Love KT, Mahon KP, Levins CG, Whitehead KA, Querbes W, Dorkin JR et al. Lipid-like materials for low-dose, in vivo gene silencing. Proc Natl Acad Sci. 2010; 107 (5): 1864–9.
27. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65 (1–2): 55–63.
28. Mamani JB, Costa-Filho AJ, Cornejo DR, Vieira ED, Gamarra LF. Synthesis and characterization of magnetite nanoparticles coated with lauric acid. Mater Charact. 2013; (81): 28–36.
29. Nemati Z, Das R, Alonso J, Clements E, Phan MH, Srikanth H. Iron Oxide Nanospheres and Nanocubes for Magnetic Hyperthermia Therapy: A Comparative Study. J Electron Mater [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 16]; 46 (6): 3764–9. Available from: http://link.springer.com/10.1007/s11664-017-5347-6.
30. Cullity BD, Graham CD. Introduction to magnetic materials. 2nd ed. Hoboken, NJ: IEEE/Wiley, 2009; 544 p.
31. Marciello M, Connord V, Veintemillas-Verdaguer S, Vergés MA, Carrey J, Respaud M, et al. Large scale production of biocompatible magnetite nanocrystals with high saturation magnetization values through green aqueous synthesis. J Mater Chem B. 2013; 1 (43): 5995–6004.
32. Verma A, Stellacci F. Effect of Surface Properties on Nanoparticle–Cell Interactions. Small. 2010; 6 (1): 12–21.
33. Adler AF, Leong KW. Emerging links between surface nanotechnology and endocytosis: Impact on nonviral gene delivery. Nano Today. 2010; 5 (6): 553–69.
34. Gupta AK, Gupta M. Cytotoxicity suppression and cellular uptake enhancement of surface modified magnetic nanoparticles. Biomaterials [Internet]. 2005 [cited 2017 Jun 9]; 26 (13): 1565–73. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15522758.
35. Gupta AK, Curtis AS. Lactoferrin and ceruloplasmin derivatized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for targeting cell surface receptors. Biomaterials. 2004; 25 (15): 3029–40.
36. Soenen SJH, Nuytten N, De Meyer SF, De Smedt SC, De Cuyper M. High Intracellular Iron Oxide Nanoparticle Concentrations Affect Cellular Cytoskeleton and Focal Adhesion Kinase-Mediated Signaling. Small. 2010; 6 (7): 832–42.
37. Berry CC. Progress in functionalization of magnetic nanoparticles for applications in biomedicine. J Phys D Appl Phys. 2009; 42 (22): 224003.

38. Zhang J, Ring HL, Hurley KR, Shao Q, Carlson CS, Idiyatullin D et al. Quantification and biodistribution of iron oxide nanoparticles in the primary clearance organs of mice using T1 contrast for heating. Magn Reson Med [Internet]. 2017 [cited 2017 Dec 22]; 78 (2): 702–12. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27667655.
39. Bargheer D, Giemsa A, Freund B, Heine M, Waurisch C, Stachowski GM et al. The distribution and degradation of radiolabeled superparamagnetic iron oxide nanoparticles and quantum dots in mice. Beilstein J Nanotechnol. 2015; (6): 111–23.
40. Ruiz A, Hernández Y, Cabal C, González E, Veintemillas-Verdaguer S, Martínez E, et al. Biodistribution and pharmacokinetics of uniform magnetite nanoparticles chemically modified with polyethylene glycol. Nanoscale. 2013; 5 (23): 11400–8.

НАНОЧАСТИЦЫ СПОСОБНЫ НАПРАВЛЯТЬ ТРАНСПЛАНТИРОВАННЫЕ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫЕ СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ПОСТТРАВМАТИЧЕСКИЙ СВИЩ У КРЫС С ПОВРЕЖДЕНИЯМИ СПИННОГО МОЗГА

Чао Чжан[1,2,3,4] ✉, А. Ю. Морозова[4], В. П. Баклаушев[3], И. Л. Губский[2], П. А. Мельников[4], А. Н. Габашвили[6], Гуовен Ванг[1], Лили Ли[1], Хайсяо У[1], Ксин Ванг[5], В. П. Чехонин[2,4]

[1] Кафедра опухолей костей и мягких тканей, Онкологический институт и госпиталь Тяньцзиньского медицинского университета, Национальный клинический исследовательский центр рака, Главная лаборатория профилактики и лечения рака, Тяньцзиньский клинический исследовательский центр рака, Тяньцзинь, Китай

[2] Кафедра медицинской нанобиотехнологии, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

[3] Федеральное медико-биологическое агентство, Москва

[4] Национальный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии имени В. П. Сербского, Москва

[5] Кафедра эпидемиологии и биостатистики, Первая больница медицинского университета Сухопутных войск, Чунцин, Китай

[6] Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва

Травма спинного мозга (ТСМ) — это травматическое повреждение, не являющееся следствием заболевания. Мезенхимальные стволовые клетки (МСК) становятся одним из наиболее используемых типов стволовых клеток как в научных исследованиях, так и в клинических испытаниях. С учетом предыдущих работ, в которых использовали от $4 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$ кл., целью данного исследования было определить количество МСК, оптимальное для трансплантации при хронической ТСМ. Магнитные наночастицы (НЧ) использовали для доказательства точности проведенной трансплантации. С помощью магнитно-резонансной томографии (МРТ), диффузионно-тензорной визуализации (DTI), диффузионно-тензорной трактографии (DTT) и поведенческих тестов мы проверили влияние различного количества МСК на уменьшение пораженной полости и посттравматического свища, подавление формирования глиального рубца, усиление ремоделирования нейронных волокон, содействие регенерации и прорастанию аксонов, улучшение васкуляризации, повышение уровня экспрессии нейронных факторов и улучшение функционирования системы. Магнитные НЧ были точно трансплантированы в посттравматический свищ (ПТС). МСК могут восстанавливать функцию после хронической ТСМ посредством стимуляции регенерации и прорастания аксонов, уменьшая образование ПТС. Таким образом, влияние МСК на ПТС и функциональное улучшение после хронической ТСМ зависит от количества клеток, и в диапазоне от $4 \cdot 10^5$ до $1 \cdot 10^6$ наилучшей дозой является $1 \cdot 10^6$.

Ключевые слова: мезенхимальные стволовые клетки; травма спинного мозга; трансплантация клеток; наночастицы

Финансирование: исследование поддержано Китайским стипендиальным советом (№ 201406940004) и Российским научным фондом (№ 16-15-10432).

✉ **Для корреспонденции:** Чао Чжан
ул. Хуанху Си, Район Хэси, Тяньцзинь, Китай, 300060; drzhangchao@tmu.edu.cn

Статья получена: 26.08.2018 **Статья принята к печати:** 25.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.084

NANOPARTICLES GUIDED PRECISE TRANSPLANTATION OF VARYING NUMBERS OF MESENCHYMAL STEM CELLS INTO POST–TRAUMATIC SYRINX IN SPINAL CORD INJURY RAT

Chao Zhang[1,2,3,4] ✉, Morozova AY[4], Baklaushev VP[3], Gubsky IL[2], Melnikov PA[4], Gabashvily AN[6], Guowen Wang[1], Lili Li[1], Haixiao Wu[1], Xin Wang[5], Chekhonin VP[2,4]

[1] Department of Bone and Soft Tissue Tumors, Tianjin Medical University Cancer Institute and Hospital, National Clinical Research Center for Cancer, Key Laboratory of Cancer Prevention and Therapy, Tianjin's Clinical Research Center for Cancer, Tianjin, China

[2] Department of Medicinal Nanobiotechnology, Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

[3] Federal Research and Clinical Center, Moscow

[4] Federal Medical Research Center for Psychiatry and Narcology, Moscow

[5] Department of Epidemiology and Biostatistics, First Affiliated Hospital, Army Medical University, Chongqing, China

[6] Vavilov Institute of General Genetics Russian Academy of Sciences, Moscow

Spinal cord injury (SCI) is a traumatic injury to the spinal cord which is not a consequence of the disease. Mesenchymal stem cells (MSCs) have gradually become one of the most used stem cells in research and clinic trial. Based on the previous reports employed the cells ranged from $4 \cdot 10^5$ to $1 \cdot 10^6$, the present study was performed to figure out the best number of MSCs for transplantation of the chronic SCI. Magnetic nanoparticles were used for proving the precise transplantation strategy. Using magnetic resonance imaging (MRI), diffusion tensor imaging (DTI), diffusion tensor tractography (DTT), and behavior testing evaluations, we focused the effect of varying numbers of MSCs on reducing lesion cavity and post–traumatic syrinx formation, suppressing glial scar formation, enhancing neuronal fibers remodeling, promoting axonal regeneration and sprouting, improving vascularization, ameliorating the neuronal factors expressional level, and function improvement. Magnetic nanoparticles were precisely transplanted into the post–traumatic syrinx (PTS). MSCs can restore function after chronic SCI through stimulating the regeneration and sprouting of the axons, reducing the formation of PTS. The effect of MSCs on PTS management and functional improvement post chronic SCI was cell number–dependent, and within the range of $4 \cdot 10^5$ to $1 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ cells were proved to be the best dose.

Keywords: mesenchymal stem cells; spinal cord injury; cell transplantation; nanoparticles

Funding: the present study was sponsored by China Scholarship Council (201406940004), and Russian Scientific Foundation (16–15–10432).

✉ **Correspondence should be addressed:** Chao Zhang
Huanhu Xi Road, Hexi Area, Tianjin, China, 300060; drzhangchao@tmu.edu.cn

Received: 26.08.2018 **Accepted:** 25.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.084

По результатам эпидемиологических исследований, в Китае растет число травм спинного мозга, достигая 23,7 случаев на миллион человек в год [1]. По последним данным, это значение колеблется от 9,2 до 246 случаев на миллион [2]. Почти половина случаев приводит к полной потере проведения нервного импульса в области ниже уровня травмы. Расходы на медицинское обслуживание в течение первого года для пациентов с тетраплегией и параплегией оставляют более чем 800 000 и 300 000 долларов США соответственно [3]. В последнее время уровень смертности в первый год после травмы неуклонно снижается. Тем не менее ТСМ по-прежнему относится к неизлечимым состояниям [4].

Патофизиологию ТСМ можно определить как двухфазный процесс: 1) первичная фаза включает начальное механическое повреждение; 2) отсроченная вторичная фаза характеризуется активацией воспаления, разрушением сосудов, ишемией, окислительным стрессом и экситотоксичностью [5–6]. Вторичная фаза подразделяется на немедленную, острую, промежуточную и хроническую стадии ТСМ [5]. Основными признаками хронической ТСМ служат глиальный рубец и формирование полости после потери функции [7–8].

Трансплантация стволовых клеток на сегодняшний день является распространенным методом лечения ТСМ. Первое описание применения мезенхимальных стволовых клеток (МСК) было опубликовано в 1991 г. [9] и постепенно MSC стали одним из наиболее используемых методов клеточной терапии в хирургии. Был проведен ряд исследований по трансплантации МСК при ТСМ [11–16]. Растущее число клинических испытаний использования МСК для лечения ТСМ указывает на быстрое внедрение данной технологии в клиническую практику, несмотря на ряд нерешенных вопросов, требующих прояснения как на фундаментальном, так и на доклиническом уровнях исследований [10].

Для успешного внедрения МСК в клиническую практику необходимо ответить на следующие вопросы: каковы оптимальные сроки трансплантации, какой метод трансплантации наиболее эффективен и какое количество стволовых клеток оптимально. Наше предыдущее исследование было сосредоточено на выяснении преимуществ использования МСК в острой и подострой фазах травмы на модели контузионных крыс [17]. Существующие данные указывают на то, что даже хроническую фазу можно рассматривать как адекватный период для применения клеточной терапии [11–16]. Авторы приводят две основные причины для скорейшего внедрения клеточной терапии: 1) на данный момент не найдено сколько-нибудь эффективного метода лечения хронической ТСМ; 2) микросреда постоянно меняется во время острой/подострой фазы заболевания, в то время как при хронической стадии она относительно стабильна, что позволяет адекватно оценить выживание или дифференцировку трансплантированных клеток. Принимая во внимание выживаемость, миграцию и безопасность трансплантированных клеток, более предпочтительным подходом можно считать интралесальную трансплантацию (в сравнении с интратекальной и внутривенной видами трансплантации) [18–19]. Результаты текущих исследований и клинических испытаний показывают значительный разброс количества используемых МСК: от 4 • 10^5 до 1 • 10^6 в исследованиях на животных [19–22] и от 7 • 10^5 до 2 • 10^7 в клинических испытаниях [12, 14, 15, 23].

Целью данного исследования было проверить ранее предложенную стратегию точной трансплантации МСК и определить оптимальный для лечения хронической ТСМ объем МСК в диапазоне от 4 • 10^5 до 1 • 10^6 кл.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Инъекция НЧ

Описанными ранее способами получали НЧ [24] и проводили трансплантацию под контролем МРТ [25]. Как правило, крыс анестезировали в течение всей процедуры с помощью E–Z-системы анестезии EZ-7000 330 (PA; США). Мех над зоной Т10 тщательно выбривали, а открытую кожу стерилизовали йодом. Кожу и поверхностную фасцию вскрывали вдоль начального разреза ламинэктомии. Две серебряные иглы для акупунктуры (ОАО «Казанский завод медицинских инструментов»; Россия) вводили через позвоночник. Иглы располагали параллельно поверхности и под углом 40° к позвоночнику, по одной игле с каждой стороны. Кончики игл проходили через мышцы и пересекались друг с другом, создавая крестообразную форму.

По результатам МРТ рассчитывали объем посттравматического свища (ПТС) и его пространственные (3D) координаты с использованием скрещенных игл в качестве контрольной точки. Как поперечное, так и продольное расстояния между ПТС и скрещенными иглами измеряли с помощью программного обеспечения MultiVox Dicom Viewer (верс. R3.0 SP13; США). Рассчитывали глубину ПТС.

Группы исследования

Чтобы доказать точность внутрисвищевой трансплантации, хроническую стадию ТСМ моделировали на взрослых крысах Sprague-Dawley (n = 3) весом 180–220 г. Для оценки эффекта от трансплантации МСК хроническую стадию ТСМ моделировали на другой группе крыс Sprague-Dawley (n = 24) весом 180–220 г. Этих крыс случайным образом разделили на четыре подгруппы по 6 особей: 1) подгруппа DMEM (по названию среды для культивирования клеток); 2) подгруппа с инъекцией 4 • 10^5 кл.; 3) подгруппа с инъекцией 8 • 10^5 кл.; 4) подгруппа с инъекцией 1 • 10^6 кл.

Эксперимент проводили в соответствии с принципами и требованиями Международной лаборатории по уходу за животными и Директивой совета европейских сообществ (86/609/EEC) от 24 ноября 1986 г. Были использованы все возможности для сведения к минимуму количества задействованных в эксперименте животных и их страданий.

Получение, культивирование и характеристика стромальных клеток костного мозга

МСК собирали из костного мозга 4–6-месячных крыс Sprague-Dawley. Биоптат центрифугировали при режиме 300 об./мин 30 мин в градиенте плотности фиколла 1,077 г/мл (Sigma-Aldrich; США) для выделения фракции мононуклеарных клеток. Клетки культивировали в RPMI 1640 (Gibco; США) с добавлением 2 мМ глютамина, 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина (Gibco; США) и 15% FBS (Biowest; США) при 37 °C, 5% CO_2. Далее использовали МСК второго–четвертого пассажей. Наличие специфичных маркеров МСК (CD105, CD90 и CD44) и гематопоэтических маркеров (CD45, CD34) подтверждали методом проточной цитометрии с помощью

клеточного сортера MoFlo (Beckman Coulter; США) с соответствующими первично-меченными антителами (Miltenyi Biotec GmbH; Германия).

Клетки МСК трипсинизировали с помощью 0,25%-го трипсин-ЭДТА (Invitrogen; Россия) и подсчитывали. Затем готовили 4 аликвоты бессывороточной среды DMEM (Gibco; США), дополненной 2 мМ глутамина, 100 ед./мл пенициллина, 0,1 мг/мл стрептомицина (Gibco; США). Три из них случайным образом отбирали для приготовления клеточной суспензии в различных концентрациях: 1 • 10^5, 2 • 10^5 и 2,5 • 10^5 кл./мкл.

Модель хронической стадии травмы спинного мозга

Операцию по воссозданию хронической стадии ТСМ выполняли как описано ранее [17]. После внутрибрюшинной анестезии кетамином (50 мг/кг) животных помещали на теплую подкладку в положении лежа и брили мех с дорсальной стороны. Хирургический участок стерилизовали. Чтобы обнажить спинной мозг, выполняли ламинэктомию в сегменте Т9–10. Затем производили ударную нагрузку в 200 килодин на спинной мозг с использованием Impactor PSI-IH, оснащенным датчиками для точного измерения силы удара (Precision Systems and Instrumentation LLC, Fairfax, VA; США). После промывания раны холодным физраствором место операции зашивали. Крысам делали подкожную инъекцию Байтрила в дозировке 2,5 мг/кг/сутки (Bayer; США). После операции животных возвращали в их домашние клетки и дважды в день проводили ручное опорожнение мочевого пузыря до восстановления спонтанной функции мочеиспускания.

Стереотактическая трансплантация МСК

Трансплантацию клеток проводили через 4 ч после травмы [11] под общей анестезией через кожу под контролем МРТ. Для определения местоположения поврежденной области до процедуры трансплантации тоже проводили МРТ. С помощью шприца Гамильтона и иглы № 33 с углом наклона 45° (Hamilton, Reno; США) 4 мкл жидкости трансплантировали в область травмы в течение 2 мин с помощью блока микроинъекции и шприцевого насоса Razel NE-1002X (Razel Scientific; США). Затем иглу удерживали в месте инъекции в течение еще 2 мин и медленно извлекали в течение еще 1 мин.

Проведение МРТ и DTI

Всех крыс анестезировали в течение всей процедуры путем ингаляции изофлурана (5DG9621, BAXTER; США) при помощи системы анестезии E-Z (EZ-7000 330, PA; США). В первую и четвертую недели после ТСМ (для оценки зоны повреждения) и на восьмой неделе после ТСМ (для определения эффекта трансплантации МСК) выполняли МРТ и DTI-сканирование с использованием семитесловых МРТ-сканеров для животных (ClinScan, Bruker BioSpin; США). Для корональных изображений Т2-взвешенные изображения в корональной плоскости были получены с помощью Turbo Spin Echo со следующими параметрами: FOV 120 • 59,2 мм, базовое разрешение 320 • 158, TR = 3850 мс, TE = 39 мс, толщина среза 1 мм, количество съемок — 1, длина эхо-последовательности — 9. Для сагиттальных изображений Т2-взвешенные изображения в сагиттальной плоскости были получены с помощью последовательности Turbo Spin Echo со следующими параметрами: FOV 100 • 49,2 мм, базовое разрешение 256 • 126, TR = 3850 мс, TE = 42 мс, толщина среза 1 мм, номер сбора — 3, длина эхосигнала — 9.

Изображения DTI были получены с такой же геометрией, что и анатомические изображения, с использованием одноэтапной последовательности плоских изображений (EPI) (спиновый эхо-сигнал TR/TE — 4000 мс/88 мс, толщина среза — 3 мм, фактор b — 1000 с/мм^2, ширина полосы пропускания — 200 кГц, 25 направлений кодирования градиента, матрица сбора данных — 64 • 64 и поле зрения — 10 • 10 мм). Для расчета индексов DTI собранные изображения анализировали на независимой рабочей станции. DTT спинного мозга генерировали с использованием алгоритма FACT, реализованного в программном обеспечении Volume-One, в качестве параметров использовали порог дробной анизотропии (FA) < 0,2 и угол остановки > 25°.

Макроскопическая оценка зоны поражения

Макроскопическую оценку проводили через 8 ч после трансплантации клеток каждой крысе. Все животные были гуманно умерщвлены как описано выше. Для удаления возможных компонентов крови из образца проводили внутрисердечную перфузию физиологическим раствором, а затем 4% параформальдегидом. В качестве биообразцов собирали спинной мозг в области повреждения. Изображения спинного мозга из каждой группы были получены с помощью цифровой камеры (Leica Co.; Германия). С помощью программного обеспечения Image J (Basics 1.38; США) были выбраны участки макроповреждения на поверхности спинного мозга, после чего участки повреждения были рассчитаны автоматически. В каждой группе оценивали и количественно сопоставляли среднюю площадь поражения.

Окрашивание гематоксилин-эозином

После макроскопической оценки крыс глубоко анестезировали кетамином и ксилазином и перфузировали физиологическим раствором и 4%-м параформальдегидом в 0,1 М фосфатном буфере. Три образца спинного мозга из каждой группы выбирали случайным образом. Образцы постепенно обезвоживали в 70%-м, 80%-м, 90%-м, 100%-м этаноле и помещали в ксилол и парафин. Продольные срезы толщиной 10 мкм делали на микротоме роторного типа (Microm HM 650V; США).

Для окрашивания гематоксилин-эозином срезы гидратировали в 100%-м, 90%-м, 80%-м, 70%-м этаноле (водный раствор), окрашивали в гематоксилине в течение 1 мин, промывали в воде в течение 5 мин с последующим окрашиванием в эозине в течение 1 мин. После покрытия срезов энтеланом оценивали поврежденный участок под световым микроскопом. Среднюю площадь поражения рассчитывали для трех срезов из каждой группы. С помощью программного обеспечения Image J выбирали места повреждения и автоматически рассчитывали зоны поражения. В каждой группе оценивали и количественно сопоставляли среднюю площадь поражения.

Иммуногистохимическое исследование

Из каждой группы выбирали случайным образом по три образца спинного мозга. Образцы помещали в буфер PBS, продольные срезы толщиной 50 мкм делали на микротоме HM 650V (Thermo Scientific; США). Срезы инкубировали

с антителами против белка, ассоциированного с микротрубочками 2 (MAP2; мышь анти-крыса; 1 : 400) (Abcam; Великобритания), анти-β3-тубулином (β3-тубулин; кролик анти-крыса; 1 : 400) (Sigma; США), антителами против глиального фибриллярного кислого белка (GFAP; кролик анти-крыса; 1 : 500) (Abcam; Великобритания), нестином (1 : 400, кролик анти-крыса) (Abcam; Великобритания), нейротрофическим фактором (BDNF; мышь анти-крыса; 1 : 400) (Abcam; Великобритания) и фактором роста эндотелия сосудов (VEGF; мышь анти-крыса; 1 : 200) (Abcam; Великобритания) в течение ночи при 4 °C, после чего добавляли TRITC-конъюгированные козьи анти-мышиные или FITC-конъюгированные анти-кроличьи IgG (1 : 200; ZSGB-BIO) и инкубировали в течение часа при 37 °C. Срезы исследовали с помощью конфокального микроскопа Nikon A1 + MP (Nikon; Япония).

Трехмерный график поверхности использовали для полуколичественной оценки флуоресцентных измерений. Теплоую карту образца каждого среза генерировали на основе интенсивности флуоресценции в разных каналах флуоресценции. Тепловая карта образца представляет собой матрицу из трех столбцов, окрашенных от светло-голубого до ярко-красного, и иллюстрирует различные уровни наработки белков.

Анализ поведения

Локомоторный тест Бассо, Битти и Бреснахана (BBB) проводили двойным слепым методом до моделирования травмы и еженедельно посттравматически для оценки восстановления двигательного поведения задних конечностей. Для оценки координации движений проводли тестирование с вращающимся стержнем до того, как крысы были убиты (через 8 ч после трансплантации). Всех крыс помещали на стандартный Ротарод (Med Associates, Inc.; США) для определения их моторных характеристик. Испытание не проводили в течение всего экспериментального периода, поскольку падение со стержня могло привести к дальнейшим травмам. Каждое животное помещали на стержень диаметром 10 см и длиной 15 см, вращающийся с постоянной скоростью. Нарушение координации движений определяли как неспособность крыс оставаться на вращающемся стержне в течение 60 с испытательного периода. Животные были предварительно обучены на вращающейся дорожке до травмы и повторно обучены за 24 ч до испытания. Протокол испытаний состоял из одного 60-секундного периода испытаний каждые 24 ч в течение 72 ч. В эти непрерывные дни испытывали при 4, 8 и 12 об./мин на 1-й, 2-й и 3-й день соответственно с 10-минутным интервалом между каждым испытанием.

Статистический анализ

Статистический анализ выполняли с помощью программного пакета SPSS 17.0 (SPSS Inc.; США). Результаты считали статистически значимыми с $p < 0,05$. Все данные представляли как среднее значение ± стандартная ошибка среднего (SEM); использовали повторные измерения ANOVA (RANOVA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Точная трансплантация в ПТС

НЧ показали низкое изменение сигнала при T2-взвешенном МРТ-сканировании (рис. 1). Трансплантацию НЧ крысам с ПТС проводили в несколько приемов. Как показано на рисунке, зона ПТС значительно сократилась в размерах (с 5,71 ± 0,21 мм^3 до 3,23 ± 0,364 мм^3) после первой же трансплантации ($p < 0,05$), повторная трансплантация привела к еще большему уменьшению зоны поражения (с 3,23 ± 0,364 мм3 до 1,48 ± 0,722 мм^3) ($p < 0,05$). Таким образом, с помощью НЧ удалось продемонстрировать точность предложенного варианта трансплантации.

Общее состояние животных и восстановление моторики

Ни у одного экспериментального животного не было выявлено признаков осложнений или неожиданной гибели в течение всей процедуры.

До операции показатель BBB для всех крыс составлял 21 балл. Сразу после ТСМ все животные продемонстрировали значительную потерю двигательной функции задних конечностей и показатели BBB были снижены до 0 баллов (рис. 2). Постепенно показатель BBB увеличился во всех группах и через четыре недели

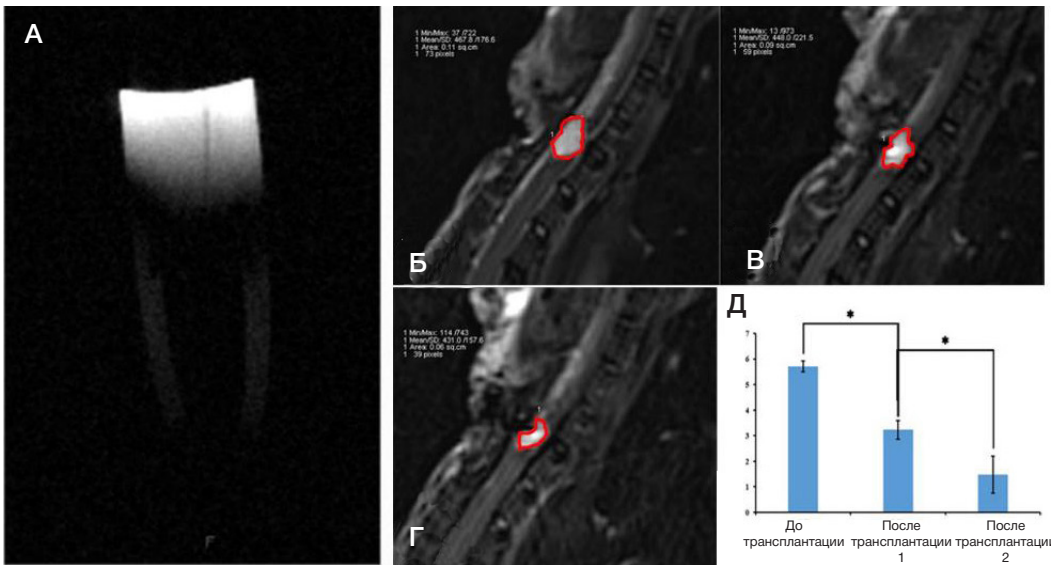


Рис. 1. Трансплантация НЧ и МРТ-анализ. **А**. НЧ показали низкое изменение сигнала при T2-взвешенном сканировании. **Б–Д**. Изменение объема ПТС после трансплантации НЧ. Объем ПТС уменьшился после первой трансплантации и еще сильнее уменьшился после второй трансплантации ($p < 0,05$)

после травмы достиг 4,85 ± 0,83 (группа DMEM), 5,94 ± 0,74 (группа 4 • 10^5 кл.), 6,08 ± 0,75 (группа 8 • 10^5 кл.) и 6,02 ± 0,84 (группа 1 • 10^6 кл.). Различия в показателях BBB между четырьмя группами не были статистически значимыми до трансплантации клеток.

Через неделю после трансплантации по сравнению с группой DMEM различия были статистически значимыми в группах с трансплантированными клетками (рис. 2М). По сравнению с группой DMEM, поведенческая способность также демонстрировала лучший результат в группах с клеточной терапией. Среди всех групп группа с 1 • 10^6 кл. показала наилучший результат (рис. 2 М). Через восемь недель после трансплантации показатель BBB достиг 7,02 ± 1,36 (группа DMEM), 8,14 ± 1,12 (группа 4 • 10^5 кл.), 10,25 ± 1,02 (группа 8 • 10^5 кл) и 11,07 ± 1,44 (группа 1 • 10^6 кл.). Крысы демонстрировали различные поведенческие способности в отношении поддержки веса, размещения подошв и подошвенному шаганию (рис. 2А–М).

Уменьшение объема ПТС

МРТ выполняли на первой и четвертой неделях после травмы, а также на восьмой неделе после трансплантации стволовых клеток костного мозга, при этом оценивали формирование ПТС. В табл. 1 показано число случаев формирования ПТС на разных сроках после травмы.

На основе МРТ были рассчитаны объемы ПТС (рис. 4). Размеры ПТС уменьшились в группах после клеточной терапии при оценке через 8 ч после трансплантации. Среди всех групп группа 1 • 10^6 кл. показала наилучшие результаты (рис. 3У–Щ).

Для оценки влияния МСК на предотвращение образования рубцов после хронической стадии ТСМ была рассчитана видимая область повреждения. По сравнению с группой DMEM, различия были статистически значимы в группах после клеточной терапии (рис. 4Г). Из всех групп группа 1 • 10^6 кл. показала наилучший результат (рис. 4А–Д).

Оценка восстановительного эффекта для нервной системы

Чтобы оценить влияние МСК на стимуляцию регенерации и рост нервной ткани, на восьмой неделе после трансплантации клеток были проведены DTI и DTT. В каждой группе были оценены участки дорсальных стволов места поражения (рис. 4 и табл. 2). По сравнению с группой DMEM непрерывность и плотность нервных волокон продемонстрировали улучшение в группах с трансплантированными клетками (рис. 4Б–Г). В группе 1 • 10^6 кл. выявлены наилучшие нервные волокна с полной непрерывностью и высокой плотностью (рис. 4Г). Как показано в табл. 2, для группы 1 • 10^6 кл. коэффициент диффузии поверхности (*apparent diffusion coefficient*, ADC)

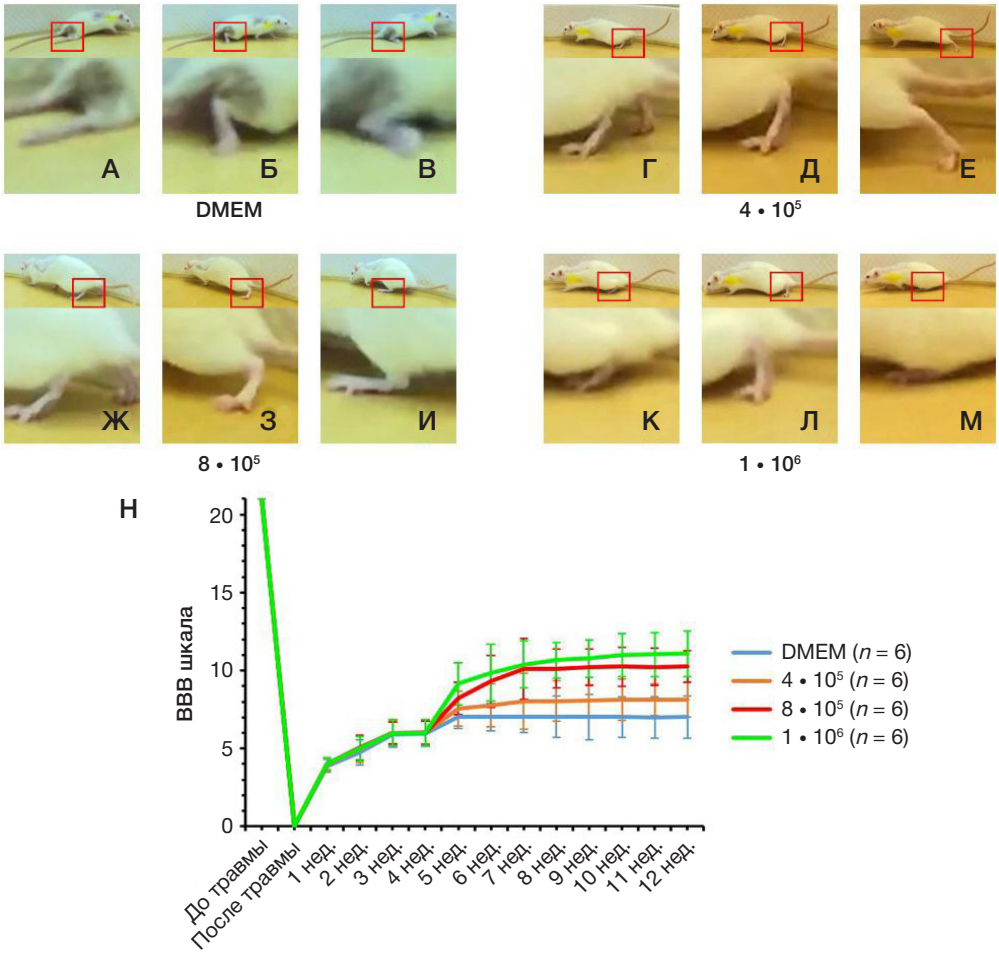


Рис. 2. Восстановление моторной функции с оценкой по шкале BBB. Различия в показателях BBB между четырьмя группами не были статистически значимыми до трансплантации клеток. Через неделю после трансплантации, по сравнению с группой DMEM, различия были статистически значимыми в группах с трансплантированными клетками (**Н**). По сравнению с группой DMEM, поведенческая способность предполагала лучший результат в группах с трансплантированными клетками. Среди всех групп группа с 1 • 10^6 кл. показала лучший результат (**Н**). Через 8 недель после трансплантации крысы проявляли различные способности по поддержанию веса (**А**, **Г**, **Ж**, **К**), расположению подошвы (**Б**, **Д**, **З**, **Л**) и подошвенному шаганию (**Б**, **Е**, **И**, **М**)

показал значительное снижение, а величина дробной анизотропии (*fractional anisotropy*, FA) — значительное увеличение. Таким образом, выявлен эффект зависимости степени регенерации от дозы клеток.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

На основании литературных данных, а также результатов нашего исследования, можно предположить, что положительный эффект от трансплантации МСК зависит от дозы клеток [26]. В данном исследовании была предпринята попытка определить оптимальное для трансплантации количество клеток в диапазоне от 4 • 10^5 до 1 • 10^6 кл. Чтобы избежать дополнительного повреждения спинного мозга, использовали высокие концентрации клеток. В ряде работ использовали 1 • 10^5, 2 • 10^5 и 2,5 • 10^5 кл./мкл [19–22]. Ранее было отмечено, что 2,5 • 10^5 кл./мкл — это максимальная концентрация для приготовления МСК. Более высокие значения оказывали негативное влияние на выживаемость клеток и требовал большего калибра инъекционной иглы, что приводило к дополнительному повреждению тканей. Вследствие небольшого объема спинного мозга крысы и необходимости применения среды клеточной суспензии для выживания клеток, в этих

Таблица 1. Число сформировавшихся ПТС в зависимости от срока

	1 неделя после травмы	4 недели после травмы	8 недель после трансплантации
группа DMEM	0	3	3
группа 4 • 10^5	0	3	3
группа 8 • 10^5	0	4	4
группа 1 • 10^6	0	4	3

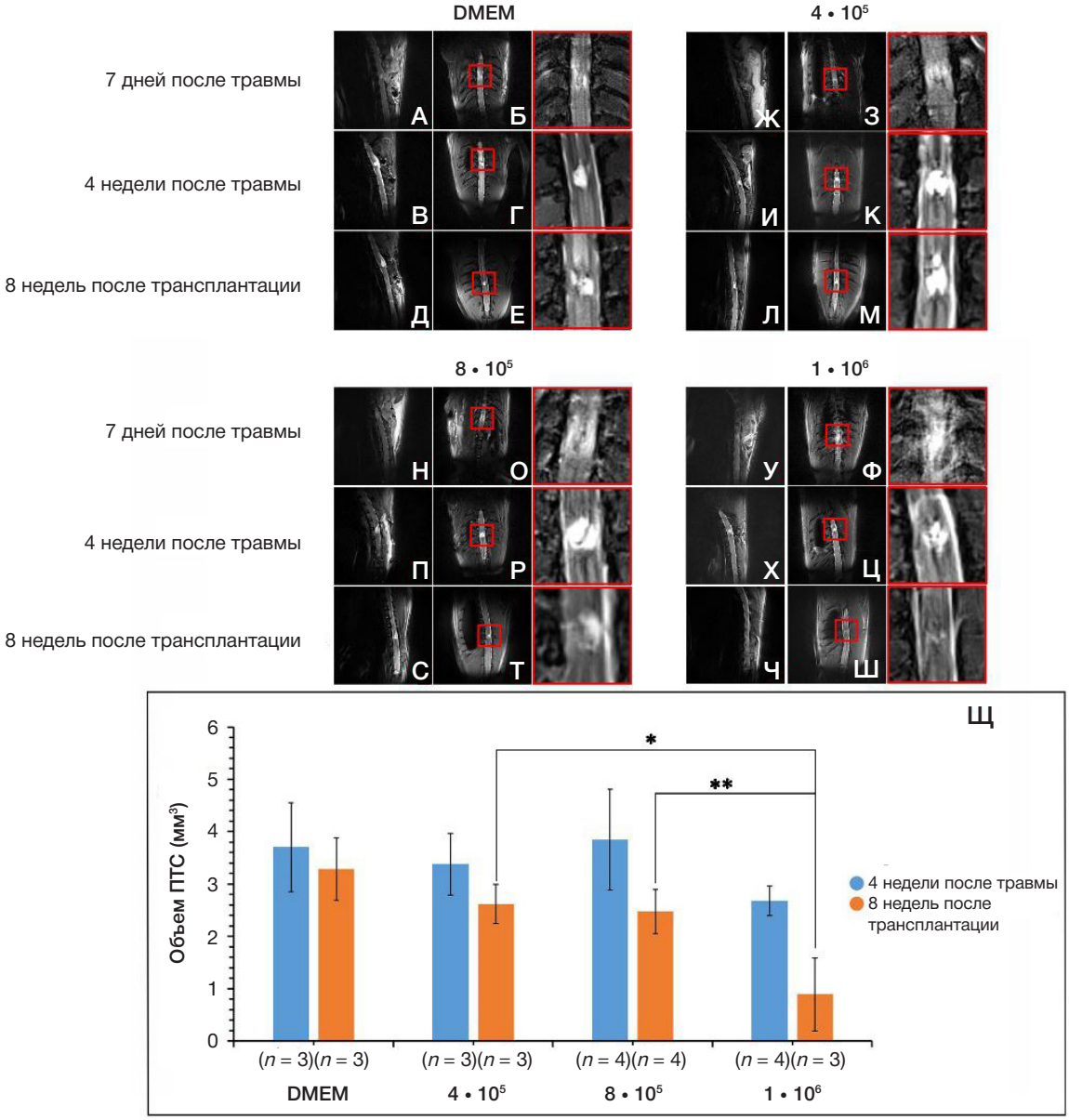


Рис. 3. Сокращение размеров ПТС. Для оценки состояния ПТС до и после трансплантации, во всех группах было выполнено боковое и горизонтальное МРТ-сканирование (**А–Ш**). Объем ПТС снизился во всех группах с трансплантацией клеток при оценке через 8 ч после трансплантации. Из всех групп группа 1 • 10^6 кл. показала наилучшие результаты (**У–Щ**). Выделенные *красной рамкой* области увеличены на рисунках внизу

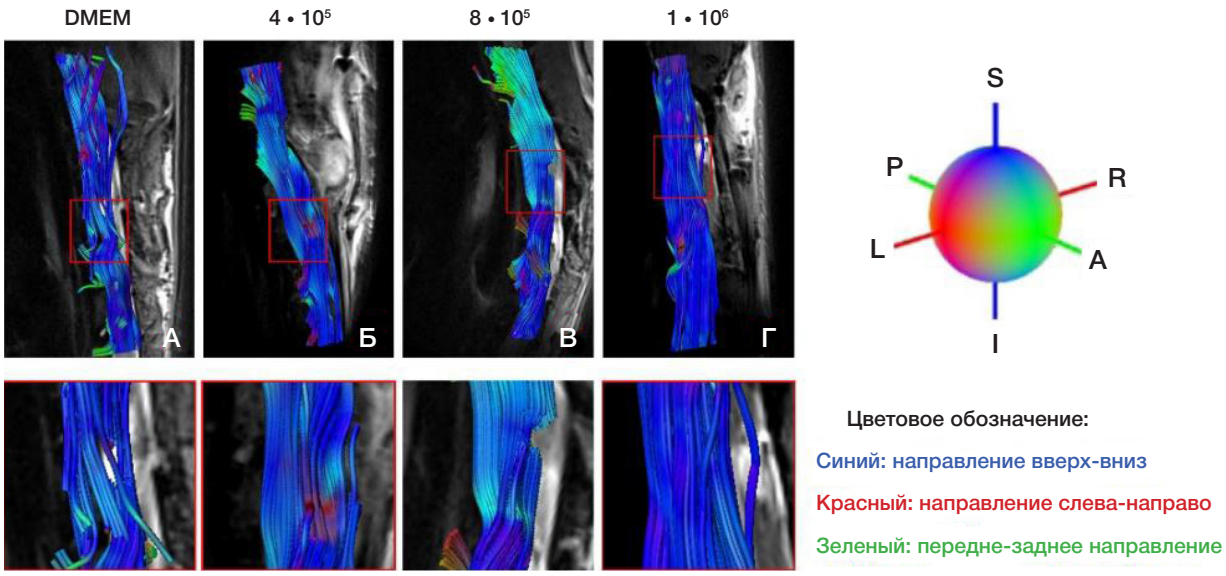


Рис. 4. Трактографические изображения спинного мозга во всех группах спустя 8 ч после клеточной терапии. На изображении спинного мозга в группе DMEM обнаружен перелом нервных волокон (**А**). Все группы с трансплантированными клетками продемонстрировали признаки репарации нервных волокон спинного мозга (**Б**–**Г**). В группе 1 • 10^6 кл. был достигнут наилучший результат (**Г**)

Таблица 2. Положение ADC и FA в зоне травмы

Группа	DMEM		4 • 10^5 МСК		8 • 10^5 МСК		1 • 10^6 МСК	
	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA	ADC	FA
8 недель после трансплантации	(1792,64 ± 719,28) • 10^{-6} мм²/с	0,34 ± 0,08	(1483,52 ± 924,91) • 10^{-6} мм²/с	0,41 ± 0,10	(1351,77 ± 1024,55) • 10^{-6} мм²/с	0,45 ± 0,09	(1276,39 ± 1214,84) • 10^{-6} мм²/с	0,51 ± 0,12

работах использовали наименьший возможный объем клеточной суспензии, равный 4 мкл [19–22].

Были разработаны различные стратегии трансплантации клеток в спинной мозг, включая доставку в очаг поражения, доставку в одну точку с различными интервалами, доставку в несколько мишеней и доставку последовательно в два подхода [26–28]. При планировании пути введения следует учитывать четыре фактора: 1) в область поражения, как правило, можно ввести больший объем клеток, тогда как в нормальные ткани обычно входит меньше клеток; 2) более высокие показатели выживаемости клеток; 3) подход, который можно точно повторить для каждой особи; 4) минимизацию урона. Таким образом, основываясь на наших предыдущих публикациях, в настоящем исследовании мы использовали локальное поражение места доставки клеток [25].

В нескольких исследованиях показано, что трансплантация МСК улучшала результат после ТСМ [19–22]. По нашим результатам, трансплантация МСК может стимулировать регенерацию и прорастание аксонов, улучшать восстановление двигательной функции, уменьшать образование ПТС и глиального рубца, способствовать васкуляризации и экспрессии нейротрофического фактора. Нами установлено, что группа 1 • 10^6 кл. показала наилучший результат среди всех групп. Можно предположить, что чем больше задействованных клеток, тем лучше получаемый эффект. Сообщалось также, что одним из основных механизмов трансплантации МСК при лечении хронической стадии ТСМ является паракринный эффект МСК [11]. Поэтому мы предположили, что чем больше клеточная доза, тем больше привнесено трофических факторов. Как продемонстрировано в настоящем исследовании методами иммуногистохимии, уровни экспрессии BDNF и VEGF в месте поражения среди всех групп были наивысшими после трансплантации 1 • 10^6 кл., тогда как после трансплантации 4 • 10^5 и 8 • 10^5 кл. экспрессия BDNF и VEGF возрастала (относительно группы DMEM) в меньшей степени. До настоящего времени не было проведено количественной оценки изменения трофических факторов после хронической стадии ТСМ или детального количества желаемых трофических факторов для лечения ТСМ. Данное исследование показало, что чем больше задействованных клеток и чем выше трофические факторы экспрессии, тем быстрее и лучше достигается восстановление поведения. Тем не менее при увеличении объема и/или концентрации клеток следует соблюдать осторожность, чтобы избежать дополнительного ущерба.

К недостаткам настоящего исследования можно отнести то, что мы не оценивали показатели выживаемости трансплантированных МСК, в связи с чем запланированы дальнейшие исследования по оценке выживаемости и клеточного апоптоза.

ВЫВОДЫ

Клеточная терапия с помощью МСК при хронической стадии ТСМ является безопасной стратегией в пределах концентраций 1 • 10^5, 2 • 10^5 и 2,5 • 10^5 кл./мкл и с общим числом клеток 4 • 10^5, 8 • 10^5 и 1 • 10^6 на зону поражения. В настоящем исследовании МСК *in vivo* могут восстанавливать функцию после ТСМ в хронической стадии посредством стимуляции регенерации и прорастания аксонов, улучшения восстановления двигательной функции, уменьшения образования ПТС и глиального рубца, стимуляции васкуляризации и экспрессии нейротрофического фактора. Выявленный эффект зависел от количества клеток, причем наилучшей дозой оказалось 1 • 10^6 кл. В то же время комбинированное применение DTI и DTT могло бы стать стратегией для количественной оценки ситуации с ПТС после хронической стадии ТСМ.

Литература

1. Ning GZ, Yu TQ, Feng SQ, Zhou XH, Ban DX, Liu Y et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in Tianjin, China. Spinal Cord. 2011; (49): 386–90.
2. Furlan JC, Sakakibara BM, Miller WC, Krassioukov AV. Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. Can J Neurol Sci. 2014; (40): 456–64.
3. Oliveri RS, Bello S, Biering-Sørensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. Neurobiol Dis. 2014; (62): 338–53.
4. Devivo M. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: Trends and future implications. Spinal Cord. 2012; (50): 365–72.
5. Siddiqui AM, Khazaei M, Fehlings MG. Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. Prog Brain Res. 2015; (218): 15–54.
6. Salewski RP, Mitchell RA, Li L, Shen C, Milekovskaia M, Nagy A et al. Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Mediate Functional Recovery Following Thoracic Spinal Cord Injury Through Remyelination of Axons. Stem Cells Transl Med. 2015; (4): 743–54.
7. Raspa A, Pugliese R, Maleki M, Gelain F. Recent therapeutic approaches for spinal cord injury. Biotechnol Bioeng. 2016; (113): 253–9.
8. Boido M, Garbossa D, Fontanella M, Ducati A, Vercelli A. Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome after spinal cord compression. World Neurosurg. 2014; (81): 183–90.
9. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991; (9): 641–50.
10. U.S. National Institutes of Health. Clinical trials. Available from: https://clinicaltrials.gov/.
11. de Almeida FM, Marques SA, Ramalho Bdos S, Massoto TB, Martinez AM. Chronic spinal cord lesions respond positively to tranplants of mesenchymal stem cells. Restor Neurol Neurosci. 2015; (33): 43–55.
12. Mendonça MV, Larocca TF, de Freitas Souza BS, Villarreal CF, Silva LF, Matos AC et al. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. Stem Cell Res Ther. 2014; (5): 126.
13. Lee SH, Kim Y, Rhew D, Kuk M, Kim M, Kim WH et al. Effect of the combination of mesenchymal stromal cells and chondroitinase ABC on chronic spinal cord injury. Cytotherapy. 2015; (17): 1374–83.
14. Amr SM, Gouda A, Koptan WT, Galal AA, Abdel-Fattah DS, Rashed LA et al. Bridging defects in chronic spinal cord injury using peripheral nerve grafts combined with a chitosan-laminin scaffold and enhancing regeneration through them by co-transplantation with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: case series of 14 patients. J Spinal Cord Med. 2014; (37): 54–71.
15. Dai G, Liu X, Zhang Z, Yang Z, Dai Y, Xu R. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. Brain Res. 2013; (1533): 73–9.
16. Hodgetts SI, Simmons PJ, Plant GW. A comparison of the behavioral and anatomical outcomes in sub-acute and chronic spinal cord injury models following treatment with human mesenchymal precursor cell transplantation and recombinant decorin. Exp Neurol. 2013; (248): 343–9.
17. Ning G, Tang L, Wu Q, Li Y, Li Y, Zhang C et al. Human umbilical cord blood stem cells for spinal cord injury: early transplantation results in better local angiogenesis. Regen Med. 2013; (8): 271–81.
18. Takahashi Y, Tsuji O, Kumagai G, Hara CM, Okano HJ, Miyawaki A et al. Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. Cell Transplant. 2011; (20): 727–39.
19. Kim JW, Ha KY, Molon JN, Kim YH. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intralesional and intravenous transplantation. Spine (Phila Pa 1976). 2013; (38): E1065–74.
20. Amemori T, Jendelová P, Růzicková K, Arboleda D, Syková E. Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat. Cytotherapy. 2010; (12): 212–25.
21. Kang KN, Kim DY, Yoon SM, Lee JY, Lee BN, Kwon JS et al. Tissue engineered regeneration of completely transected spinal cord using human mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2012; (33): 4828–35.
22. Kumagai G, Tsoulfas P, Toh S, McNiece I, Bramlett HM, Dietrich WD. Genetically modified mesenchymal stem cells (MSCs) promote axonal regeneration and prevent hypersensitivity after spinal cord injury. Exp Neurol. 2013; (248): 369–80.
23. Karamouzian S, Nematollahi-Mahani SN, Nakhaee N, Eskandary H. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. Clin Neurol Neurosurg. 2012; (114): 935–9.
24. Abakumov MA, Nukolova NV, Sokolsky-Papkov M, et al. VEGF-targeted magnetic nanoparticles for MRI visualization of brain tumor. Nanomedicine. 2015; 11 (4): 825–33.
25. Zhang C, Morozova AY, Abakumov MA, Gubsky IL, Douglas P, Feng S et al. Precise Delivery Into Chronic Spinal Cord Injury Syringomyelic Cysts with Magnetic Nanoparticles MRI Visualization. Med Sci Monit. 2015; (21): 3179–85.
26. Cigognini D, Satta A, Colleoni B, Silva D, Donegà M, Antonini S et al. Evaluation of early and late effects into the acute spinal cord injury of an injectable functionalized self-assembling scaffold. PLoS One. 2011; (6): e1978.
27. Mannoji C, Koda M, Kamiya K, Dezawa M, Hashimoto M, Furuya T et al. Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived neuroregenrative cells promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2014; (74): 479–88.
28. Rao YJ, Zhu WX, Du ZQ, Jia CX, Du TX, Zhao QA et al. Effectiveness of olfactory ensheathing cell transplantation for treatment of spinal cord injury. Genet Mol Res. 2014; (13): 4124–9.

References

1. Ning GZ, Yu TQ, Feng SQ, Zhou XH, Ban DX, Liu Y et al. Epidemiology of traumatic spinal cord injury in Tianjin, China. Spinal Cord. 2011; (49): 386–90.
2. Furlan JC, Sakakibara BM, Miller WC, Krassioukov AV. Global incidence and prevalence of traumatic spinal cord injury. Can J Neurol Sci. 2014; (40): 456–64.
3. Oliveri RS, Bello S, Biering-Sørensen F. Mesenchymal stem cells improve locomotor recovery in traumatic spinal cord injury: systematic review with meta-analyses of rat models. Neurobiol Dis. 2014; (62): 338–53.
4. Devivo M. Epidemiology of traumatic spinal cord injury: Trends and future implications. Spinal Cord. 2012; (50): 365–72.
5. Siddiqui AM, Khazaei M, Fehlings MG. Translating mechanisms of neuroprotection, regeneration, and repair to treatment of spinal cord injury. Prog Brain Res. 2015; (218): 15–54.
6. Salewski RP, Mitchell RA, Li L, Shen C, Milekovskaia M, Nagy A et al. Transplantation of Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Neural Stem Cells Mediate Functional Recovery Following Thoracic Spinal Cord Injury Through Remyelination of Axons. Stem Cells Transl Med. 2015; (4): 743–54.
7. Raspa A, Pugliese R, Maleki M, Gelain F. Recent therapeutic approaches for spinal cord injury. Biotechnol Bioeng. 2016; (113): 253–9.
8. Boido M, Garbossa D, Fontanella M, Ducati A, Vercelli A. Mesenchymal stem cell transplantation reduces glial cyst and improves functional outcome after spinal cord compression. World Neurosurg. 2014; (81): 183–90.
9. Caplan AI. Mesenchymal stem cells. J Orthop Res. 1991; (9): 641–50.
10. U.S. National Institutes of Health. Clinical trials. Available from: https://clinicaltrials.gov/.
11. de Almeida FM, Marques SA, Ramalho Bdos S, Massoto TB,

Martinez AM. Chronic spinal cord lesions respond positively to tranplants of mesenchymal stem cells. Restor Neurol Neurosci. 2015; (33): 43–55.
12. Mendonça MV, Larocca TF, de Freitas Souza BS, Villarreal CF, Silva LF, Matos AC et al. Safety and neurological assessments after autologous transplantation of bone marrow mesenchymal stem cells in subjects with chronic spinal cord injury. Stem Cell Res Ther. 2014; (5): 126.
13. Lee SH, Kim Y, Rhew D, Kuk M, Kim M, Kim WH et al. Effect of the combination of mesenchymal stromal cells and chondroitinase ABC on chronic spinal cord injury. Cytotherapy. 2015; (17): 1374–83.
14. Amr SM, Gouda A, Koptan WT, Galal AA, Abdel-Fattah DS, Rashed LA et al. Bridging defects in chronic spinal cord injury using peripheral nerve grafts combined with a chitosan-laminin scaffold and enhancing regeneration through them by co-transplantation with bone-marrow-derived mesenchymal stem cells: case series of 14 patients. J Spinal Cord Med. 2014; (37): 54–71.
15. Dai G, Liu X, Zhang Z, Yang Z, Dai Y, Xu R. Transplantation of autologous bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of complete and chronic cervical spinal cord injury. Brain Res. 2013; (1533): 73–9.
16. Hodgetts SI, Simmons PJ, Plant GW. A comparison of the behavioral and anatomical outcomes in sub-acute and chronic spinal cord injury models following treatment with human mesenchymal precursor cell transplantation and recombinant decorin. Exp Neurol. 2013; (248): 343–9.
17. Ning G, Tang L, Wu Q, Li Y, Li Y, Zhang C et al. Human umbilical cord blood stem cells for spinal cord injury: early transplantation results in better local angiogenesis. Regen Med. 2013; (8): 271–81.
18. Takahashi Y, Tsuji O, Kumagai G, Hara CM, Okano HJ, Miyawaki A et al. Comparative study of methods for administering neural stem/progenitor cells to treat spinal cord injury in mice. Cell Transplant. 2011; (20): 727–39.
19. Kim JW, Ha KY, Molon JN, Kim YH. Bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation for chronic spinal cord injury in rats: comparative study between intralesional and intravenous transplantation. Spine (Phila Pa 1976). 2013; (38): E1065–74.
20. Amemori T, Jendelová P, Růzicková K, Arboleda D, Syková E. Co-transplantation of olfactory ensheathing glia and mesenchymal stromal cells does not have synergistic effects after spinal cord injury in the rat. Cytotherapy. 2010; (12): 212–25.
21. Kang KN, Kim DY, Yoon SM, Lee JY, Lee BN, Kwon JS et al. Tissue engineered regeneration of completely transected spinal cord using human mesenchymal stem cells. Biomaterials. 2012; (33): 4828–35.
22. Kumagai G, Tsoulfas P, Toh S, McNiece I, Bramlett HM, Dietrich WD. Genetically modified mesenchymal stem cells (MSCs) promote axonal regeneration and prevent hypersensitivity after spinal cord injury. Exp Neurol. 2013; (248): 369–80.
23. Karamouzian S, Nematollahi-Mahani SN, Nakhaee N, Eskandary H. Clinical safety and primary efficacy of bone marrow mesenchymal cell transplantation in subacute spinal cord injured patients. Clin Neurol Neurosurg. 2012; (114): 935–9.
24. Abakumov MA, Nukolova NV, Sokolsky-Papkov M, et al. VEGF-targeted magnetic nanoparticles for MRI visualization of brain tumor. Nanomedicine. 2015; 11 (4): 825–33.
25. Zhang C, Morozova AY, Abakumov MA, Gubsky IL, Douglas P, Feng S et al. Precise Delivery Into Chronic Spinal Cord Injury Syringomyelic Cysts with Magnetic Nanoparticles MRI Visualization. Med Sci Monit. 2015; (21): 3179–85.
26. Cigognini D, Satta A, Colleoni B, Silva D, Donegà M, Antonini S et al. Evaluation of early and late effects into the acute spinal cord injury of an injectable functionalized self-assembling scaffold. PLoS One. 2011; (6): e1978.
27. Mannoji C, Koda M, Kamiya K, Dezawa M, Hashimoto M, Furuya T et al. Transplantation of human bone marrow stromal cell-derived neuroregenrative cells promotes functional recovery after spinal cord injury in mice. Acta Neurobiol Exp (Wars). 2014; (74): 479–88.
28. Rao YJ, Zhu WX, Du ZQ, Jia CX, Du TX, Zhao QA et al. Effectiveness of olfactory ensheathing cell transplantation for treatment of spinal cord injury. Genet Mol Res. 2014; (13): 4124–9.

ПЕРСПЕКТИВНЫЕ МЕТОДЫ НЕИНВАЗИВНОЙ МЕДИЦИНСКОЙ ДИАГНОСТИКИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОМАТЕРИАЛОВ: СПЕКТРОСКОПИЯ ГИГАНТСКОГО КОМБИНАЦИОННОГО РАССЕЯНИЯ В ИССЛЕДОВАНИИ КЛЕТОК, КЛЕТОЧНЫХ ОРГАНЕЛЛ, МАРКЕРОВ НЕЙРОМЕДИАТОРНОГО ОБМЕНА

Е. А. Гудилин[1,2]✉, А. А. Семенова[2], О. Е. Еремина[1], Н. А. Браже[3], Е. А. Гудилина[4], Т. Ю. Данзанова[4], Г. В. Максимов[3], И. А. Веселова[1]

[1] Химический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва
[2] Факультет наук о материалах, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва
[3] Биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва
[4] Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва

Использование достижений наномедицины и материаловедения в диагностике заболеваний является перспективным направлением научных исследований. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) — инновационный метод анализа, связанный с применением наноматериалов на основе благородных металлов для неинвазивного исследования клеток, клеточных органелл, белковых молекул. В работе обобщены литературные данные по методам ранней клинической диагностики ряда нейродегенеративных и нейроэндокринных заболеваний. Обсуждены особенности, достоинства и ограничения различных методов диагностики по низкомолекулярным и высокомолекулярным маркерам указанных заболеваний. Продемонстрированы перспективы применения оптических методов для экспресс-диагностики нарушений нейромедиаторного обмена. Особое внимание уделено новым подходам при создании универсальных оптических индикаторных систем, расширяющих аналитические возможности спектроскопии ГКР, обладающей уникально высокой чувствительностью, селективностью и воспроизводимостью результатов анализа при определении целевых аналитов в биологических матрицах сложного состава.

Ключевые слова: медицинская диагностика, наноматериалы, наночастицы благородных металлов, гигантское комбинационное рассеяние, митохондрии, эритроциты, маркеры нейромедиаторного обмена, наномедицина

Финансирование: работа поддержана Российским научным фондом (грант 14-13-00871).

Благодарности: авторы благодарны академику В. П. Чехонину за возможность творческого сотрудничества и Э. Никельшпарг за помощь в подготовке иллюстраций к обзору, а также профессору Г. Т. Синюковой за плодотворное обсуждение результатов ультразвуковой диагностики с использованием контрастных агентов.

✉ **Для корреспонденции:** Евгений Алексеевич Гудилин
Ленинские горы, д. 1, стр. 3, г. Москва, 119992; goodilin@yandex.ru

Статья получена: 20.07.2018 **Статья принята к печати:** 19.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.077

PROMISING METHODS FOR NONINVASIVE MEDICAL DIAGNOSIS BASED ON THE USE OF NANOPARTICLES: SURFACE-ENHANCED RAMAN SPECTROSCOPY IN THE STUDY OF CELLS, CELL ORGANELLES AND NEUROTRANSMITTER METABOLISM MARKERS

Goodilin EA[1,2]✉, Semenova AA[2], Eremina OE[1], Brazhe NA[3], Goodilina EA[4], Danzanova TYu[4], Maksimov GV[3], Veselova IA[1]

[1] Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow
[2] Faculty of Materials Science, Lomonosov Moscow State University, Moscow
[3] Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow
[4] Blokhin Russian Cancer Research Center, Moscow

Application of advances in nanomedicine and materials science to medical diagnostics is a promising area of research. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) is an innovative analytical method that exploits noble metal nanoparticles to noninvasively study cells, cell organelles and protein molecules. Below, we summarize the literature on the methods for early clinical diagnosis of some neurodegenerative and neuroendocrine diseases. We discuss the specifics, advantages and limitations of different diagnostic techniques based on the use of low- and high molecular weight biomarkers. We talk about the prospects of optical methods for rapid diagnosis of neurotransmitter metabolism disorders. Special attention is paid to new approaches to devising optical systems that expand the analytical potential of SERS, the tool that demonstrates remarkable sensitivity, selectivity and reproducibility of the results in determining target analytes in complex biological matrices.

Keywords: medical diagnostics, nanomaterials, noble metal nanoparticles, surface-enhanced Raman spectroscopy, mitochondria, erythrocytes, neurotransmitter markers, nanomedicine

Funding: this work was supported by the Russian Science Foundation (Grant 14-13-00871).

Acknowledgments: the authors wish to thank Professor Chekhonin VP, who graciously agreed to collaborate on this project, Nickelsparg E. for her assistance in preparing the figures for the manuscript, and Professor Sinukova GT for the fruitful discussion of contrast-enhanced ultrasound diagnostics.

✉ **Correspondence should be addressed:** Eugene A. Goodilin
Leninskie gory 1, bl. 3, Moscow, 119992; goodilin@yandex.ru

Received: 20.07.2018 **Accepted:** 19.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.077

Развитие наномедицины и материаловедения в интересах медицинской диагностики является перспективным направлением научных исследований на стыке химии, физики, биологии на протяжении последних 10–15 лет [1–3]. Обычно в качестве наиболее значимых перспектив дальнейшего развития данной области рассматривают направленную доставку лекарств, тераностику, терапевтическое воздействие наночастиц, а также исследование «диагностических» наноматериалов, связанных, в частности, с разработкой контрастирующих агентов для сцинтиграфии, КТ, МРТ и УЗИ (рис. 1), уже в ряде случаев вышедших на рынок и ставших стандартом проведения диагностических исследований; важнейшим шагом является создание новых поколений сенсорных систем [1, 2, 4–11].

В то же время среди важнейших интенсивно развивающихся методов неинвазивной биомедицинской диагностики сейчас однозначно выделяют спектроскопию гигантского комбинационного рассеяния (ГКР, или SERS от *англ*. surface-enhanced raman scattering) — рекордный по чувствительности оптический метод анализа объектов природы и уникальный подход для практического экспресс-мониторинга [12–15]. В силу фундаментальных физических принципов, на которых базируется, он напрямую нуждается в разработке новых наноматериалов с контролируемым комплексом свойств на основе наноструктур серебра и золота; последние демонстрируют не только высокий контроль над плазмонным резонансом и распределением локальных электромагнитных полей при внешнем возбуждении, но и достаточно высокую химическую и биологическую инертность (рис. 2). Приоритетными областями применения ГКР являются неразрушающий анализ биологических объектов, клеток и клеточных фрагментов [16–22], включая эритроциты [16, 17, 23–25], бактерии [26–28], вирусы [29, 30], стволовые клетки [31, 32], клетки тканей человека [33], в том числе раковые [34–37]; контроль лекарственных препаратов, пищевых продуктов [38, 39]; обнаружение и определение белков, пептидов, ДНК [9, 15, 19–21], низкомолекулярных биомаркеров заболеваний, отравляющих веществ [9–11, 36, 40–42]. Большинство проводимых в последнее время работ в области ГКР направлено на поиск практического внедрения метода, что свидетельствует о его высоком потенциале в биомедицинской диагностике.

Спектроскопия ГКР активно развивается с 1974 г. [43] и лишь с 2010–2012 гг. наметилась отчетливая тенденция ее использования в неинвазивном анализе живых клеток и клеточных органелл в связи с разработкой новых наноматериалов и инструментальных подходов [9, 13, 16–20]. В частности, спектроскопия ГКР активно сочетается с *in vivo* визуализацией [44], микрожидкостными устройствами [45], позволяющими существенно повысить потенциал ее применения. Использование спектроскопии ГКР обычно связывают с ее чрезвычайно высокой чувствительностью, что действительно важно для обнаружения и определения аналитов на уровне примесей, вплоть до детектирования отдельных молекул, однако в настоящее время от этого метода ожидают также успехов в реализации мультиплексного анализа в многокомпонентных матрицах реальных объектов. Потенциал для подобного развития

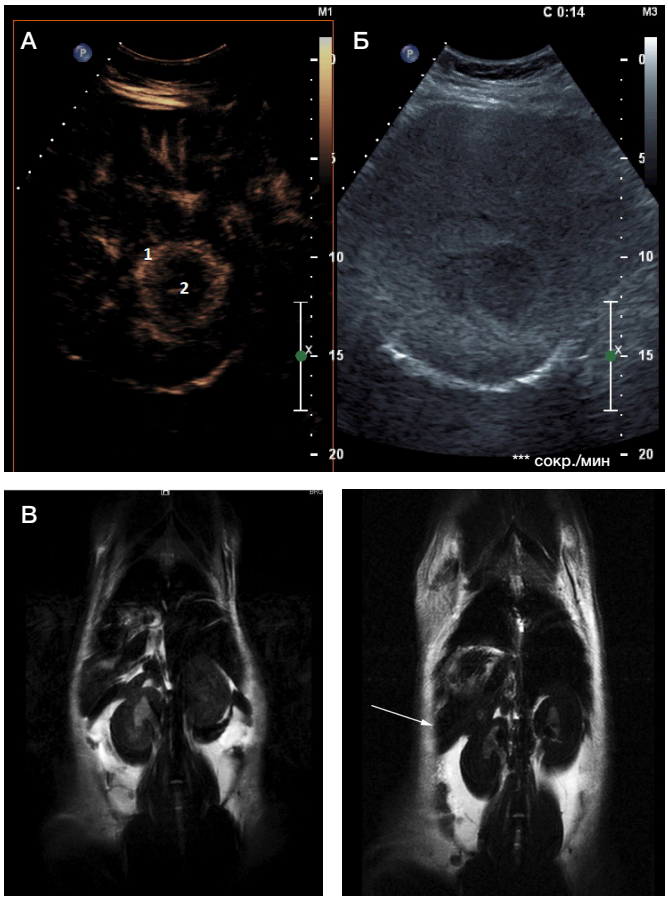


Рис. 1. Использование контрастных препаратов в медицинской диагностике (фотографии авторов). **А**, **Б**. УЗИ печени с контрастным усилением. Визуализируется метастатический очаг: **А** — артериальная фаза контрастирования (14 с после внутривенного введения контрастного препарата SonoVue), 1 — периферическая контрастируемая зона; 2 — неконтрастируемая центральная зона; **Б** — серошкальный В-режим. **В**. Контрастирование селезенки лабораторной крысы на снимке МРТ магнитными наночастицами оксида железа с оболочкой, содержащей полиэтиленгликоль (ПЭГ)

у метода, несомненно, существует, поскольку ГКР-спектр обусловлен молекулярным строением вещества, что позволяет не только идентифицировать аналиты в сложных смесях по молекулярным «отпечаткам пальцев», но и определять конформации молекул.

Высокая чувствительность метода ГКР при решении таких комплексных аналитических задач, как обнаружение и идентификация веществ в матрицах сложного состава на уровне ультранизких (от нМ до фМ) концентраций, далеко не всегда сочетается с возможностью количественного определения аналитов. Спектроскопия ГКР относится к локальным методам анализа, в том числе потому, что усиление сигнала комбинационного рассеяния происходит на расстояниях не более 10–15 нм от наноструктурированной поверхности и существенно зависит от ее структуры и состояния, размера, анизотропии, взаимного расположения наночастиц, особенностей сорбции аналитов на наночастицах, а также формирования агрегатных структур [9]. В силу этого функциональные свойства разрабатываемого материала определяются широким набором его морфологических и микроструктурных характеристик, а также физико-химических свойств.

Для решения проблемы количественного анализа, повышения воспроизводимости, чувствительности и селективности метода спектроскопии ГКР развивают различные его модификации, адаптированные под конкретные задачи. Важным аспектом стало изучение так называемых «горячих точек» (*hot spots*) — областей с высокоинтенсивным локальным электромагнитным полем, возникающим в нанометровых зазорах между наночастицами [9], что играет существенную роль в эффекте усиления ГКР, поскольку предположительно именно в этих областях возможна регистрация спектральных сигналов с коэффициентами усиления (КУ) более 10^7–10^8 раз.

Существующие в настоящее время подходы к химическому синтезу позволяют получать с достаточно высоким выходом наночастицы серебра (НЧС) различных размеров и форм (сферы, тетраэдры, декаэдры, треугольные и гексагональные пластинки, диски, стержни, нити, частицы более сложных форм) [9, 46–51]. К физическим методам получения НЧС относят лазерную абляцию, термическое испарение, синтез в дуговом разряде, электронное испарение, ионное распыление, ионную имплантацию, методы с использованием различных излучений; определенный интерес представляют также методы получения наночастиц (НЧ) с использованием веществ природного происхождения [52–55]. Для создания планарных структур традиционны литографические, электрохимические подходы, осаждение из паровой фазы, химические методы осаждения, формирование пленок по методу Ленгмюра–Блоджетт, с использованием мицелл сополимеров, привитие предварительно полученных наночастиц к модифицированной амино- или тиольными группами поверхности микросфер, аэрозольные и физические методы напыления НЧ на различные подложки, включая целлюлозные носители, поверхности, модифицированные с использованием реплик [9, 11, 13, 16, 17, 25]. Перечисленные тенденции и предпосылки создания надежных ГКР-активных материалов, сенсорных устройств и методик анализа с использованием новых аналитических систем обусловливают прекрасные перспективы практического применения метода в области биомедицинской диагностики.

Неинвазивная диагностика биологических объектов

В настоящее время большой интерес вызывает применение спектроскопии ГКР для обнаружения следовых количеств биологически активных молекул в физиологических жидкостях (крови, слюне, цереброспинальной жидкости) с целью ранней клинической диагностики заболеваний. Для обнаружения некоторых физиологически активных молекул в биологических образцах спектроскопия ГКР нашла применение в сочетании с иммунохимическим методом, основанным на специфическом связывании антигена с комплиментарным антителом [56]; использование меток комбинационного рассеяния (КР-меток) в сочетании с применением композитных материалов на основе микрочастиц (микросфер) и металлических наночастиц открывает возможности проведения «управляемого» иммуноанализа для высокочувствительного обнаружения биомолекул [56–58]. Важную роль играет также разработка биосенсоров с возможностью количественного определения аналитов путем химической модификации поверхности плазмонных частиц, чаще всего — монослоем тиола с необходимыми функциональными группами, что используется для последующей селективной сорбции аналитов и обеспечения предконцентрирования [59]. Такой подход позволяет, например, проводить анализ глюкозы в реальном времени в диапазоне до 25 мМ, что близко к ее типичному содержанию в ряде физиологических жидкостей, в том числе в присутствии модельных белков плазмы (например, бычьего сывороточного альбумина) и при длительном (до трех дней) контакте сенсора с электролитами в «физиологических» концентрациях. При подкожной имплантации лабораторным животным ГКР-сенсоров данного типа устройства демонстрируют достаточно высокую правильность и воспроизводимость показателей в течение как минимум двух недель, что свидетельствует о больших перспективах использования ГКР-сенсоров для мониторинга состояния живых организмов *in situ* [59]. Предпочтительным при исследовании биологических объектов может быть использование наноструктурированных поверхностей, так как они обеспечивают воспроизводимый коэффициент усиления спектрального сигнала, а также позволяют интегрировать ГКР-активные материалы в лаборатории на чипе и микрожидкостные устройства. Независимо от того, какие наноструктуры применяют для исследования биообъектов, они должны удовлетворять следующим требованиям: быть нетоксичными для клеток, не изменяться химически и морфологически в биологических жидкостях и растворах, максимально стабильно усиливать сигнал КР, не влиять на клеточные процессы и конформацию тех клеточных молекул, с которыми они непосредственно контактируют.

Спектроскопия ГКР нашла применение в исследовании раковых клеток [60, 61]. С помощью ГКР-сенсоров можно измерять внутриклеточный редокс-потенциал. Предложена технология исследования окислительного стресса в клетках с помощью золотых наносфер с различными хинонами в качестве редокс-чувствительных молекул [62]. Она позволяет количественно оценивать редокс-потенциал клеток в диапазоне от –400 до +100 мВ — более широком, чем с помощью существующих флуоресцентных зондов. Другим примером использования специфического ГКР-сенсора (высокоселективного гибридного наносенсора из наночастиц серебра, покрытых цитохромом *c*) для изучения окислительного стресса служит обнаружение супероксидного анион-

радикала [63]. Предел обнаружения супероксидного анион-радикала равен 10 нМ. Метод основан на том, что при переносе электрона с супероксидного анион-радикала на цитохром *c* на спектре ГКР полоса, характерная для окисленного цитохрома *c*, смещается в положение, характерное для восстановленного цитохрома *c*.

Интересным подходом является использование наноструктур, модифицированных молекулами, не дающими яркий спектр ГКР, но способными высокоселективно связывать биологический объект, от которого регистрируют спектр ГКР. Примером может служить сенсор для высокочувствительного обнаружения бактерий в крови [64]. Золотые или композитные серебряно-золотые наноструктурированные поверхности покрывали ванкомицином, способным специфически связываться с грамположительными бактериями. Ванкомицин способствует деформации клеточной стенки бактерий, что увеличивает агрегацию, приводя к усилению КР-сигнала. Перспективность таких подложек для создания мультифункциональных биочипов обусловлена возможностью замены слоя ванкомицина на другие гликопептиды с целью обнаружения широкого спектра микроорганизмов и вирусов. Проведен ряд исследований с использованием стеклянных микрокапилляров, покрытых наночастицами золота и вводимых внутрь клеток [65]. В зависимости от внутриклеточной локализации капилляра усиление сигнала шло от компонентов ядра или цитоплазмы, причем вид спектра зависел от функционального состояния клеток. Предложен метод, основанный на спектроскопии ГКР с использованием покрытий, декорированных золотыми наночастицами, для обнаружения вторичного мессенджера — внутриклеточной молекулы, высвобождаемой в ответ на стимуляцию рецепторов и активацию первичных эффекторных белков, в Ca^{2+}-сигнализации НАДФ [66]. Разработаны наноматериалы на основе золота и новый методический подход для высокочувствительного определения изменений конформации нуклеиновых кислот и белков и визуализации клеток в условиях *in vivo* [9, 19, 20]. Предложены функционализированные золотые наночастицы для дискриминации различных типов лимфоцитов и выявления лейкемических клеток [67].

Одно из важных направлений ГКР-спектроскопии — получение избирательного, высокоселективного усиления сигнала КР от конкретных внутриклеточных молекул, конформация и свойства которых отражают как их функционирование, так и работу всей клетки или конкретных органелл. К таким биомакромолекулам, удобным и перспективным в фундаментальных и прикладных исследованиях, относят гемсодержащие белки: гемоглобин (Гб) и цитохромы. Известно, что гемопорфирины и гемсодержащие белки обладают довольно интенсивным и высокоспецифическим комбинационным рассеянием [68], зависящим от редокс-состояния атома железа и конформации гема и его белкового микроокружения. Эта особенность позволяет исследовать цитохромы митохондрий в клетках и органах [9], гемоглобин в цельной крови, изолированных эритроцитах и эритроцитах в сосудах в условиях *in vivo*. При этом существует ряд ограничений традиционной спектроскопии КР в изучении гемопорфиринов: цитохромы в окисленном состоянии обладают низкоинтенсивным и поэтому недетектируемым КР, а КР-исследования эритроцитов позволяют получать КР-спектры только от цитоплазматического Гб ($Гб_{цит}$), составляющего основное количество Гб, но не от мембранносвязанного Гб ($Гб_{мс}$), конформация которого может изменяться специфическим образом при различных системных патологиях кровеносной системы, наследственных и эндокринологических заболеваниях (талассемии, гемоглобинопатии и др.) [69], при интоксикации, при функционировании организма человека в экстремальных условиях [70] — в этих случаях усиление сигнала КР происходит именно от $Гб_{мс}$, расположенного в непосредственной близости к наноструктурам серебра. Таким образом, применение ГКР-активных наноструктур незаменимо в исследованиях гемсодержащих белков и может служить основой для проведения неинвазивной медицинской экспресс-диагностики и скрининга.

Авторами предложен новый методический подход, а также разработаны и синтезированы наноструктурированные материалы с планарной архитектурой и нанокомпозиты $Ag@SiO_2$, позволившие получить высоковоспроизводимое и селективное интенсивное усиление сигнала КР от цитохрома *c* дыхательной цепи (электронтранспортной цепи, ЭТЦ) интактных функционирующих митохондрий (рис. 2Г). В результате были исследованы изменения конформации и редокс-свойств цитохрома *c* в интактных функционирующих митохондриях при модуляции активности дыхательной цепи [9, 18]. Кроме того, были показаны изменения редокс-состояния и конформации гема цитохрома *c* при внесении протонофоров, вызывающих разобщение дыхания и синтеза АТФ, а также при блокировании АТФ-синтазы. Спектроскопия ГКР с планарными серебряными плазмонными структурами позволяет оценивать изменение относительного содержания восстановленного цитохрома *c* в митохондриях и конформационную подвижность гема в цитохроме *c* как в составе митохондрий, так и в изолированном состоянии (рис. 2Г). На интактных митохондриях было показано, что протонофор FCCP, разобщающий синтез АТФ и транспорт электронов, и олигомицин, блокирующий АТФ-синтазу, разнонаправленно влияют на относительное содержание восстановленного цитохрома *c* и подвижность метиновых мостиков в геме [18], а мутантные формы цитохрома *c* с увеличенной жесткостью белкового микроокружения гема обладают меньшей конформационной подвижностью и функциональной активностью гема. Предполагается, что изменение конформации гема цитохрома *c* может быть использовано в митохондриях для варьирования скорости акцептирования электрона от комплекса III ЭТЦ и передачи электрона комплексу IV. Предложенный методический подход перспективен для дальнейшего изучения работы ЭТЦ интактных митохондрий. Для применения ГКР-активных наноструктур в биомедицинских целях необходима разработка методов анализа данных для интегрирования наноструктур в «лаборатории-на-чипе».

Экспресс-диагностика нарушений нейромедиаторного обмена

Нейромедиаторный обмен лежит в основе нервной медиации как периферической, так и центральной нервной системы [71]. Ключевыми маркерами нейромедиаторного обмена служат соединения группы катехоламинов (КА) — дофамин (ДА), адреналин (АД), норадреналин (НА) и такие их метаболиты, как ванилилминдальная (ВМК), гомованилиновая (ГВК) и 5-гидроксииндолуксусная (5-ГИУК) кислоты, метанефрин (МН) и норметанефрин (НМН). Метаболизм КА играет важную роль в регулировании как умственной, так и физической деятельности человека:

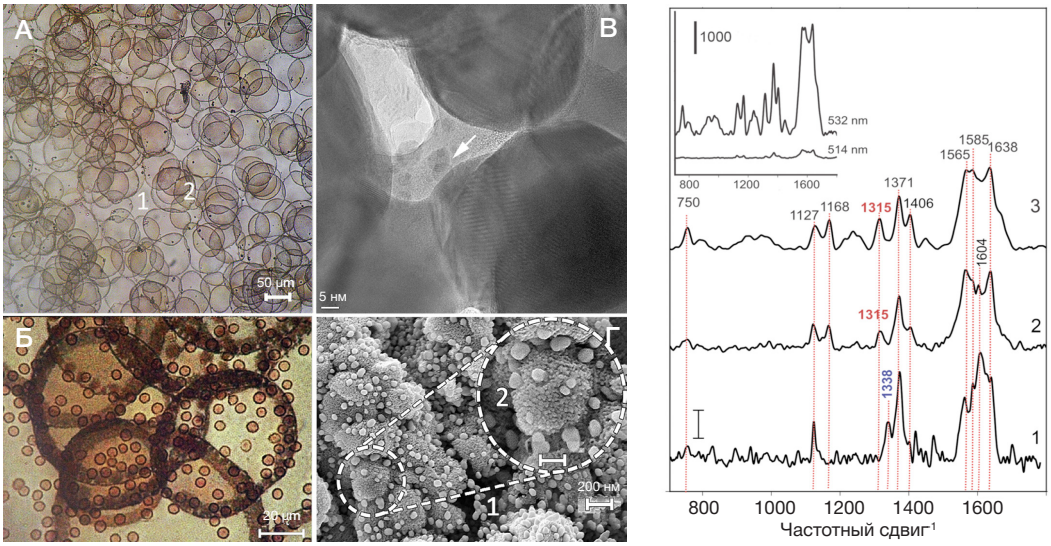


Рис. 2. Структура наноструктурированной серебряной подложки для ГКР-анализа. **А**. Оптическое изображение наноструктурированного покрытия с кольцевой структурой подложки. **Б**. Расположение живых эритроцитов на подложке при ГКР-анализе. **В**. Наноструктурированные элементы подложки (формирование наночастиц серебра в каналах покрытия, ПЭМ). **Г**. «Кунжутные зерна» на поверхности ГКР-покрытия (РЭМ). **Д**. Спектры ГКР эритроцитов (1) и митохондрий (2 и 3) на нанокомпозитных $Ag@SiO_2$ коллоидосомах при лазерном возбуждении 532 нм (1 и 3) и 514 нм (2). Для удобного восприятия спектры нормированы на суммарную интенсивность спектра. Числа над спектрами показывают положения максимумов основных пиков. На вкладке представлены ненормированные спектры ГКР митохондрий на коллоидосомах при лазерном возбуждении 514 и 532 нм

действуя через дофаминергические и адренергические рецепторы, КА участвуют в регуляции реакций организма на стресс, психомоторной активности, эмоциональных реакций, обучения, сна и памяти [72]. Поскольку КА задействованы в патогенезе многих болезней, они являются эффективными и широко применяемыми лекарственными препаратами [73]. Связанные с нарушениями нейромедиаторного обмена заболевания делят на две основные группы: нейродегенеративные, сопровождающиеся прогрессирующей гибелью нервных клеток и уменьшением содержания КА и их метаболитов в организме соответственно, и нейроэндокринные, характеризующиеся избыточным синтезом КА из-за органического поражения или генетической дефектности гипоталамуса. К основным нейродегенеративным заболеваниям относят болезни Альцгеймера (БА) и Паркинсона (БП), к нейроэндокринным катехоламин-продуцирующим опухолям — феохромоцитому, параганглиому, карциноидные опухоли и нейробластому.

Диагностика нейроэндокринных опухолей представляет собой значительную проблему, поскольку злокачественное новообразование часто диагностируют уже в ретроспективе, в период развития метастатической или рецидивирующей стадии. Как правило, более 90% нейродегенеративных заболеваний в России не удается диагностировать, поскольку их симптомы расценивают как признаки возрастных изменений. Многие нейродегенеративные нарушения характеризуются схожими симптомами, что может отрицательно влиять на правильность диагноза по клиническим наблюдениям за больными [74]. К наиболее серьезным нейроэндокринным заболеваниям, в процессе развития которых повышается содержание КА в организме, относят феохромоцитому и параганглиому — доброкачественную и злокачественную катехоламинпродуцирующие опухоли. Они возникают из хромаффинных клеток симпатоадреналовой системы, которые в 90% случаев локализованы в мозговом слое надпочечников [75]. Карциноидные опухоли составляют менее 1% всех злокачественных опухолей и образуются из клеток диффузной нейроэндокринной системы, возникающей из клеток нервного гребешка в период эмбриогенеза и мигрирующих в различные органы [76]. Еще одна злокачественная опухоль, нейробластома, сопровождается образованием многочисленных метастазов. Большинство опухолей обнаруживается в забрюшинном пространстве, чаще всего в надпочечниках; реже встречаются в средостении и шее [77].

Катехоламины ДА и НА и их метаболиты могут выступать в качестве молекулярных маркеров при диагностике БП и БА: по снижению их содержания в биологических жидкостях можно судить о начале заболевания. В частности, показано, что с развитием симптоматики БП в моче понижается соотношение ДА и диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и уменьшается выброс ДА и диоксифенилаланина (ДОФА). Уже на ранней стадии паркинсонизма наблюдается ярко выраженный дефицит биохимических нейромедиаторов катехоламиновой природы (ДА, НА и серотонина) с одновременным развитием катаболизма ДА вследствие усиления процесса его окислительного дезаминирования в сравнении с нормой. Однако при начальных клинических проявлениях БП возрастает кругооборот ДА, что носит компенсаторный характер. По мере прогрессирования дегенеративного процесса выявляются отчетливое снижение уровня ДОФА и уменьшение соотношения ДА/ДОФУК как показателя нарушения нейромедиаторного обмена в результате снижения активности моноаминоксидазных процессов, что свидетельствует об истощении резервов для синтеза КА. Таким образом, КА являются перспективными биомаркерами нейродегенеративных заболеваний вследствие закономерного изменения их концентрации в ходе болезни и относительно простой молекулярной структуры.

Трудность определения КА в биологических жидкостях обусловлена тем, что у здорового человека их концентрации изначально очень низки (на уровне 1 нМ), а при различных патологических нарушениях они снижаются еще на порядок (БА и БП). При этом следует учитывать, что в крови КА быстро окисляются моноаминоксидазами тромбоцитов, в связи с чем определение маркеров

нейромедиаторного обмена в организме должно происходить очень быстро (в течение 15–30 мин). По этой причине актуален поиск доступных селективных и чувствительных экспресс-методик определения КА и их метаболитов в биологических жидкостях.

В настоящее время для диагностики на ранних стадиях нейродегенеративных заболеваний применяют, главным образом, нейровизуализационные методы анализа: МРТ, КТ, позитронно-эмиссионную томографию (ПЭТ), однофотонную эмиссионную КТ (ОФЭКТ), протонную магнитно-резонансную спектроскопию (МРС), электроэнцефалографическое исследование (ЭЭГ) и др. [10, 11]. В последнее время для диагностики БА и БП стали активно применять ПЭТ и ОФЭКТ. Однако доступность этих радионуклидных томографических методов в значительной степени определяется арсеналом доступных меченых соединений — радиофармпрепаратов (РФП), предварительно вводимых в организм человека. Как правило, в качестве радиоактивной метки в случае ПЭТ используют биологически важные короткоживущие (^{18}F) и ультракороткоживущие (^{11}C, ^{13}N, ^{15}O) позитронизлучающие радионуклиды [10]. Другой метод молекулярной визуализации, ОФЭКТ, позволяет оценивать функциональное состояние различных отделов головного мозга, что может иметь значение при диагностике нейродегенеративных заболеваний со схожей клинической картиной, но различающихся вовлечением отдельных участков мозга. Нейровизуализационные методы позволяют достаточно точно диагностировать различные нейродегенеративные и нейроэндокринные заболевания, в том числе на ранних стадиях. Однако прогнозирование заболеваний с использованием перечисленных методов невозможно. Кроме того, исследования такого рода не всегда доступны из-за отсутствия подходящего оборудования, высокой себестоимости исследования, а также медицинских показаний пациентов. При большой распространенности заболеваний инструментальная диагностика нередко доступна только жителям крупных городов. Следовательно, актуальны поиск и разработка новых подходов к мультиплексному чувствительному экспрессному и не требующему дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала определению маркеров биохимических процессов, лежащих в основе патогенеза некоторых психоневрологических заболеваний и опухолевого роста.

Более простой и доступный подход к диагностике БА и БП заключается в иммунохимическом определении биохимических маркеров нейромедиаторного обмена. В качестве таких соединений в случае БА могут выступать некоторые высокомолекулярные соединения, прежде всего белки — β-амилоидный пептид, тау-протеин, фосфорилированный тау-протеин. Для БП характерно накопление белка синуклеина, а у больных БА формируются сенильные бляшки — белковые клубки, содержащие много β-амилоидного пептида, методы определения которого разрабатываются в последние годы. Распределение β-амилоида в организме можно изучать как радиоизотопными инструментальными методами, так и с помощью иммунохимического анализа цереброспинальной жидкости [10, 11]. Однако существенным недостатком метода является сложная и длительная процедура пробоподготовки объекта исследования. Перспективным подходом к диагностике нейродегенеративных заболеваний является разработка иммунохимических тест-методов определения биомаркеров, однако ограничения иммунохимических методик связаны со сложностями как объекта анализа, так и структуры диагностических молекул. Кроме того, содержание белковых маркеров может варьироваться в зависимости от возраста и пола пациента [10], что нередко приводит к получению ложных результатов анализа. Белки могут служить биологическими маркерами и для диагностики нейроэндокринных заболеваний. Так, хромогранин А (CgA), присутствующий в хромаффинных гранулах нейроэндокринных клеток, используют для диагностики феохромоцитомы, параганглиомы, нейробластомы и карциноидных опухолей [10, 11], однако этот метод не позволяет достоверно установить, какое именно нейроэндокринное заболевание прогрессирует у пациента. Поэтому помимо обычно используемых биохимических показателей для диагностики нейробластомы рассматривают такие маркеры, как нейронспецифическая энолаза, ферритин, лактатдегидрогеназа, γ-глутамилтрансфераза [10, 11]. Очевидно, что становятся актуальными поиск и изучение биохимических маркеров небелковой природы, таких как КА и их метаболиты, а также разработка простых селективных и высокочувствительных методов их определения, обеспечивающих точный и достоверный результат на ранних стадиях заболеваний.

В процессе нейромедиаторного обмена происходят инактивация и метаболизм КА. КА метоксилируются в присутствии катехол-*о*-метилтрансферазы (КОМТ) с выделением метанифрина (МН) и норметанефрина (НМН). Кроме того, КА окислительно дезаминируются в присутствии фермента моноаминооксидазы (МАО) с образованием ванилилминдальной (ВМК) и гомованилиновой (ГВК) кислот в качестве конечных продуктов [10, 11]. В связи с тем, что содержание КА и их метаболитов в норме и при патологии различно, их можно использовать в качестве диагностических маркеров как при проведении фундаментальных исследований, так и в клинической практике. Среди методов, применяемых для диагностики нейродегенеративных и нейроэндокринных заболеваний по содержанию КА и их метаболитов в моче и крови, наиболее широко используют хроматографические методы в сочетании с электрохимическим (ЭХ) или масс-спектрометрическим (МС) детектированием [11]. Несмотря на высокую селективность, чувствительность, доступность используемых электрохимических детекторов, они характеризуются плохой воспроизводимостью, чувствительностью к флуктуациям в скорости потока подвижной фазы, загрязнением электрода, повышенными требованиями к природе подвижной фазы. Для метода высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимическим детектированием (ВЭЖХ-ЭХ) характерны высокие значения фонового шума по сравнению с полезным сигналом, не всегда достаточная чувствительность и низкая эффективность разделения компонентов. Метод ВЭЖХ-МС/МС характеризуется значительно большей чувствительностью определения КА и их метаболитов, однако является недостаточно экспрессным и имеет ограничения, связанные с элюированием определяемых соединений в мертвое время, значительными шумовыми помехами и сложностью разрешения пиков [11]. Несмотря на кажущуюся изученность проблемы и наличие большого набора методов, позволяющих определять содержание КА в плазме крови и моче, относительная длительность анализа, низкая воспроизводимость и плохое разрешение обусловливают многочисленные диагностические ошибки,

приводящие к неэффективному лечению. В последнее время ведутся разработки различных *электрохимических сенсоров* для определения КА и их метаболитов [78]. Действие большинства из них основано на модификации индикаторных электродов предварительно синтезированными соединениями с определенной структурой, обеспечивающими селективное определение КА, например молекулярными отпечатками ДНК, полимерами, искусственными рецепторами, различными нанотрубками и наностержнями, модифицированными органическими молекулами — полиэтиленимином, циклодекстрином, комплексами металлов [79–81]. Методики определения КА и их метаболитов электрохимическими методами характеризуются в основном средней чувствительностью на уровне 0,01–1 мкМ. Кроме того, большинство электрохимических методов позволяет селективно определять только единичные биохимические маркеры, т. е. не обеспечивает мультиплексность анализа, что ограничивает возможность их применения в клинической диагностике.

Другой альтернативой рассмотренным выше методам служат спектроскопические методы, выгодно отличающиеся простотой, экспрессностью, невысокой стоимостью анализа, в ряде случаев более высокой чувствительностью, чем у электрохимических и хроматографических методов. Перспективна разработка флуоресцентных методов определения КА и их метаболитов в целях диагностики различных заболеваний. КА в присутствии фермента (например, пероксидазы) [82] окисляются пероксидом водорода, а продукт их окисления служит тушителем фотолюминесценции водорастворимого полимера поли(2,5-бис(3-сульфонато-пропокси)-1,4-фенилэтинилена-1,4-поли(фениленэтинилена)). Чувствительность определения КА по этой методике невысока (около 0,1 мкМ), зато возможно определение нескольких КА с высокой групповой селективностью [83]. Известны методики с использованием наночастиц, например на основе Fe_3O_4. Их применяют как аналог пероксидазы из корней хрена. Подход основан на ингибировании КА реакции окисления реагента *Amplex UltraRed* (субстрата пероксидазы) в присутствии пероксида водорода и наночастиц Fe_3O_4, продукт которой интенсивно флуоресцирует при 587 нм при возбуждении при 567 нм. Как следствие, КА ковалентно связывается с поверхностью наночастиц оксида железа (III) и тушит флуоресценцию продукта окисления *Amplex UltraRed*. Несмотря на весьма высокую чувствительность (предел обнаружения составляет 3 нМ), эта методика тоже обладает лишь высокой групповой селективностью по отношению к КА и их метаболитам, но не позволяет осуществлять мультиплексный анализ [84]. К сожалению, чувствительность большинства подобных методов не позволяет определять наномолярные содержания катехоламинов, что ограничивает применимость разработанных сенсорных систем в анализе биообъектов [10, 11].

Недостатков, присущих существующим методам определения КА и их метаболитов, прежде всего связанных с низкой селективностью и экспрессностью анализа, в той или иной мере лишены методы, использующие спектроскопию КР. Сами по себе эти методики позволяют определять нейромедиаторы лишь на уровне концентраций 0,1–0,5 М [85], что, очевидно, не удовлетворяет требованиям, предъявляемым к анализу биологических жидкостей. Перспективным подходом является создание высокочувствительных и селективных оптических сенсорных систем на основе метода ГКР, основанного на усилении сигнала КР за счет эффекта плазмонного резонанса на наноструктурированной поверхности благородных металлов, как обсуждалось выше. Специфичность анализа достигается за счет регистрации ГКР-сигналов в области 1500–650 $см^{-1}$, обладающих высокой информативностью для обнаружения индивидуальных соединений в смесях сложного состава. Как указывалось, ГКР-спектроскопия очень чувствительна к незначительным изменениям в структуре и ориентации молекул, поэтому, благодаря всем вышеперечисленным характеристикам в сочетании со слабым КР-сигналом воды, ГКР-спектроскопия представляется перспективным методом для анализа сложных биологических образцов с минимальной пробоподготовкой. Важно отметить, что в ГКР-спектроскопии используют широкий диапазон частот возбуждения, что позволяет подобрать источник возбуждения с минимальной фоновой аутофлуоресценцией и фоторазрушением образца. Тем не менее применение ГКР-спектроскопии для определения нейромедиаторов на практике на сегодняшний день находится на начальной стадии [9–11, 86]. Недавно показана возможность применения ГКР-спектроскопии для определения дофамина в диапазоне концентраций 1–10 мМ [87, 88], описаны методики, позволяющие определять ДА в диапазоне 0,01–0,1 фМ. Селективность определения ДА продемонстрирована в присутствии аскорбиновой кислоты, глюкозы, L-цистеина, тирозина, катехола, фенилэтиламина и сывороточного альбумина [89]. Метод ГКР-спектроскопии легко комбинируется с другими методами, например, селективность электрохимического определения нейромедиаторов в биологических жидкостях ограничивается присутствием таких компонентов, как аскорбиновая кислота, окислительно-восстановительный потенциал которой практически совпадает с потенциалом ДА [90]. При использовании коллоидных растворов серебра удалось понизить нижнюю границу определяемых концентраций до 5 нМ [91], при этом описаны примеры образования комплексов с переносом заряда, которое может способствовать формированию стабильного и интенсивного ГКР-сигнала [92, 93]. Несомненно, рассмотренные подходы открывают новые возможности существенного снижения пределов обнаружения актуальных аналитов до пико- и фемтомолярных концентраций, что является важным шагом вперед на пути использования ГКР для биомедицинской диагностики.

ВЫВОДЫ

Метод ГКР имеет значительные перспективы для биомедицинского анализа образцов с матрицей сложного многокомпонентного состава, поскольку сочетает одновременно высокие чувствительность и селективность с минимальной пробоподготовкой, а также открывает возможности для мультиплексного определения аналитов в биологических матрицах без предварительной подготовки проб к анализу, в том числе неинвазивно. Для дальнейшего развития метода необходимо развитие материаловедческих аспектов применения ГКР-активных наноструктур в биомедицинских условиях, а также выполнение новых комплексных исследований, направленных на изучение действия наноструктур на исследуемые биологические объекты; оценку изменения свойств наноструктур в

биологических жидкостях и при контакте с клетками. Весьма перспективна разработка доступных, простых в аппаратурном оснащении и исполнении, экспрессных и в то же время достаточно чувствительных и селективных методик для мультиплексного определения маркеров нейромедиаторного обмена и других биомаркеров для ранней диагностики заболеваний, в том числе на уровне скрининга живых клеток и функциональных клеточных органелл. По мнению авторов, создание мультиплексных оптических систем для определения маркеров заболеваний в биологических жидкостях, а также клеточных структурах является наиболее перспективным направлением совершенствования методов современной клинической диагностики.

Литература

1. Semkina A, Abakumov M, Grinenko N, Abakumov A, Skorikov A, Mironova E et al. Core-shell-corona doxorubicin-loaded superparamagnetic Fe3O4 nanoparticles for cancer theranostics. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015; (136): 1073–80.
2. Chekhonin VP, Baklaushev VP, Yusubalieva GM, Belorusova AE, Gulyaev MV, Tsitrin EB et al. Targeted delivery of liposomal nanocontainers to the peritumoral zone of glioma by means of monoclonal antibodies against GFAP and the extracellular loop of Cx43. Nanomedicine. 2012; 8 (1): 63–70.
3. Nukolova NV, Aleksashkin AD, Abakumova TO, Morozova AY, Gubskiy IL, Kirzhanova EA et al. Multilayer polyion complex nanoformulations of superoxide dismutase 1 for acute spinal cord injury. J Control Release. 2018; (270): 226–36.
4. Ковалева Е. В., Синюкова Г. Т., Данзанова Т. Ю., Лепэдату П. И., Гудилина Е. А., Возможности УЗИ с применением контрастного усиления в диагностике метастазов в печени у больных колоректальным раком. Колопроктология. 2018; 1 (63): 36–42.
5. Бердников С. Н., Шолохов В. Н., Синюкова Г. Т., Гудилина Е. А., Абгарян М. Г., Калинин А. Е. и др. Дифференциальная диагностика очаговых гиперэхогенных образований в печени. Колопроктология. 2017; 2 (60): 19–25.
6. Nirmala D. Review: Medical image contrast enhancement techniques, Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences. 2015; 6 (3): 321–9.
7. Chen F, Hableel G, Zhao ER, Jokerst JV. Multifunctional nanomedicine with silica: Role of silica in nanoparticles for theranostic, imaging and drug monitoring. J Colloid and Interface Science. 2018; (521): 261–79.
8. Balthazar P, Shinagare AB, Tirumani SH, Jagannathan JP, Ramaiya NH, Khorosani R. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: impact of consistent contrast agent selection on radiologists' confidence in hepatic lesion assessment on restarding MRIs. Abdominal Radiology. 2018; 6 (43): 1386–92.
9. Еремина О. Е., Семенова А. А., Сергеева Е. А., Браже Н. А., Максимов Г. В., Шеховцова Т. Н. и др. Спектроскопия гигантского комбинационного рассеяния в современном химическом анализе: достижения и перспективы использования. Успехи химии. 2018; 87 (8): 741–70.
10. Вацадзе С. З., Еремина О. Е., Веселова И. А., Калмыков С. Н., Ненайденко В. Г., Радиофармпрепараты группы катехоламинов, меченные 18F, в диагностике нейродегенеративных заболеваний и нейроэндокринных опухолей: подходы к синтезу и перспективы развития. Успехи Химии. 2018; 87 (4): 350–73.
11. Веселова И. А., Сергеева Е. А., Македонская М. И., Еремина О. Е., Калмыков С. Н., Шеховцова Т. Н., Методы определения маркеров нейромедиаторного обмена в целях клинической диагностики. Журнал аналитической химии. 2016; 71 (12): 1235–49.
12. Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, Perelman LT, Itzkan I, Dasari RR et al. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). Phys Rev Lett. 1997; (78): 1667–70.
13. Оленин А. Ю., Лисичкин Г. В. Получение, динамика структуры объема и поверхности металлических наночастиц в конденсированных средах. Успехи химии. 2011; 80: 605–35.
14. Cialla D, März A, Böhme R, Theil F, Weber K, Schmitt M et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): Progress and trends. Anal Bioanal Chem. 2012; (403): 27–54.
15. Laing S, Gracie K, Faulds K. Multiplex in vitro detection using SERS. Chem Soc Rev. 2016; (45): 1901–18.
16. Semenova AA, Goodilin EA, Brazhe NA, Ivanov VK, Baranchikov AE, Lebedev VA et al. Planar SERS nanostructures with stochastic silver ring morpholgy for biosensor chips. J Mater Chem. 2012; (22): 24530–44.
17. Semenova AA, Brazhe NA, Parshina EY, Sarycheva AS, Maksimov GV, Goodilin EA. A new route for SERS analysis of intact erythrocytes using polydisperse silver nanoplatelets on biocompatible scaffolds. RSC Adv. 2016; (6): 85156–63.
18. Brazhe NA, Evlyukhin AB, Goodilin EA, Semenova AA, Novikov SM, Bozhevolnyi SI et al. Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy. Sci Rep. 2015; (5): 13793(1)–13793(13).
19. Durmanov NN, Guliev RR, Eremenko AV, Boginskaya IA, Ryzhikov IA, Trifonova EA et al. Non-labeled selective virus detection with novel SERS-active porous silver nanofilms fabricated by Electron Beam Physical Vapor Deposition. Sens Actuators B. 2018; (257): 37–47.
20. Nechaeva N, Prokopkina T, Makhaeva G, Rudakova E, Boltneva N, Dishovsky et al. Quantitative butyrylcholinesterase activity detection by surface-enhanced Raman spectroscopy. Sens Actuators B. 2018; (259): 75–82.
21. Kneipp J, Kneipp H, Wittig B, Kneipp K. One- and two-photon excited optical ph probing for cells using surface-enhanced Raman and hyper-Raman nanosensors. Nano Lett. 2007; (7): 2819–23.
22. Drescher D, Kneipp J. Nanomaterials in complex biological systems: insights from Raman spectroscopy. Chem Soc Rev. 2012; (41): 5780–99.
23. Wood BR, Caspers P, Puppels GJ, Pandiancherri S, McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. Anal Bioanal Chem. 2007; (387): 1691–703.
24. Brazhe NA, Parshina EY, Khabatova VV, Semenova AA, Brazhe AR, Yusipovich AI et al. Tuning SERS for living erythrocytes: Focus on nanoparticle size and plasmon resonance position. J Raman Spectrosc. 2013; (44): 686–94.
25. Semenova AA, Brazhe NA, Parshina EY, Ivanov VK, Maksimov GV, Goodilin EA. Aqueous diaminsilver hydroxide as a precursor of pure silver nanoparticles for SERS probing of living erythrocytes. Plasmonics. 2013; (9): 227–35.
26. Jarvis RM, Goodacre R. Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. Anal Chem. 2004; (76): 40–7.
27. Wang P, Pang S, Chen J, McLandsborough L, Nugen SR, Fan M et al. Label-free mapping of single bacterial cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. Analyst. 2016; (141): 1356–62.
28. Granger JH, Schlotter NE, Crawford AC, Porter MD. Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS). Chem Soc Rev. 2016; (45): 3865–82.
29. Hoang V, Tripp RA, Rota P, Dluhy RA. Identification of individual genotypes of measles virus using surface enhanced Raman spectroscopy. Analyst. 2010; (135): 3103–9.
30. Luo S-C, Sivashanmugan K, Liao J-D, Yao C-K, Peng H-C. Nanofabricated SERS-active substrates for single-molecule to virus detection in vitro: A review. Biosens Bioelectron. 2014; (61): 232–40.
31. El-Said WA, Kim SU, Choi J-W. Monitoring in vitro neural stem cell differentiation based on surface-enhanced Raman spectroscopy using a gold nanostar array. J Mater Chem C. 2015; (3): 3848–59.
32. Han J, Qian X, Wu Q, Jha R, Duan J, Yang Z et al. Novel surface-

enhanced Raman scattering-based assays for ultra-sensitive detection of human pluripotent stem cells. Biomaterials. 2016; (105): 66–76.
33. Howes PD, Rana S, Stevens MM. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. Chem Soc Rev. 2014; (43): 383–8.
34. McAughtrie S, Faulds K, Graham D. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS): potential applications for disease detection and treatment. J Photochem Photobiol C. 2014; (21): 40–53.
35. Puppels GJ, de Mul FFM, Otto C, Greve J, Robert-Nicoud M, Arndt-Jovin DJ et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. Nature. 1990; (347): 301–3.
36. Alvarez-Puebla RA, Liz-Marzán LM. SERS-based diagnosis and biodetection. Small. 2010; (6): 604–10.
37. März A, Mönch B, Rösch P, Kiehntopf M, Henkel T, Popp J. Detection of thiopurine methyltransferase activity in lysed red blood cells by means of lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy (LOC-SERS). Anal Bioanal Chem. 2011; (400): 2755–61.
38. Jahn IJ, Žukovskaja O, Zheng X-S, Weber K, Bocklitz TW, Cialla-May D et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy and microfluidic platforms: challenges, solutions and potential applications. Analyst. 2017; (142): 1022–47.
39. Kumar S, Goel P, Singh JP. A facile method for fabrication of buckled PDMS silver nanorod arrays as active 3D SERS cages for bacterial sensing. Sens Actuators B. 2017; (241): 577–83.
40. Polavarapu L, Perez-Juste J, Xu Q, Liz-Marzán LM. Optical sensing of biological, chemical and ionic species through aggregation of plasmonic nanoparticles. J Mater Chem C. 2014; (2): 7460–76.
41. Dhillon A, Nair M, Kumar D. Analytical methods for sensing of health-hazardous arsenic from biotic and abiotic natural resources. Anal Methods. 2015; (7): 10088–108.
42. Xiao L, Zhang M, Liu Z, Bian W, Zhang X, Zhan J. Hydrophobic silver nanowire membrane for swabbing extraction and in situ SERS detection of polycyclic aromatic hydrocarbons on toys. Anal Methods. 2017; (9): 1816–24.
43. Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. Chem Phys Lett. 1974; (26): 163–6.
44. Wachsmann-Hogiu S, Weeks T, Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy — From single cells to humans. Curr Opin Biotechnol. 2009; (20): 63–73.
45. Yazdi SH, White IM. A nanoporous optofluidic microsystem for highly sensitive and repeatable surface enhanced Raman spectroscopy detection. Biomicrofluidics. 2012; (6): 14105–59.
46. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Green synthesis and their antimicrobial activities. Adv Colloid Interface Sci. 2009; (145): 83–96.
47. Sun Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. Science. 2002; (298): 2176–9.
48. Guerrero-Martínez A, Barbosa S, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM. Nanostars shine bright for you: colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2011; (16): 118–27.
49. Lim B, Xia Y. Metal nanocrystals with highly branched morphologies. Angew Chem Int Ed. 2011; (50): 76–85.
50. Pietrobon B, Kitaev V. Photochemical synthesis of monodisperse size-controlled silver decahedral nanoparticles and their remarkable optical properties. Chem Mater. 2008; (20): 5186–90.
51. Phan-Quang GC, Lee HK, Phang IY, Ling XY. Plasmonic colloidosomes as three-dimensional SERS platforms with enhanced surface area for multiphase sub-microliter toxin sensing. Angew Chem Int Ed. 2015; (54): 9691–5.
52. Tien D-C, Liao C-Y, Huang J-C, Tseng K-H, Lung J-K, Tsung T-T et al. Novel technique for preparing a nano-silver water suspension by the arc-discharge method. Rev Adv Mater Sci. 2008; (18): 750–6.
53. Gongalsky MB, Osminkina LA, Pereira A, Manankov AA, Fedorenko AA, Vasiliev AN et al. Laser-synthesized oxide-passivated bright Si quantum dots for bioimaging. Sci Rep. 2016; (6): 24732(1)–24732(8).
54. Nadagouda MN, Varma RS. Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract. Green Chem. 2008; (10): 859–62.
55. Moulton MC, Braydich-Stolle LK, Nadagouda MN, Kunzelman S, Hussain SM, Varma RS. Synthesis, characterization and biocompatibility of "green" synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. Nanoscale. 2010; (2): 763–70.
56. Hwang H, Chon H, Choo J, Park JK. Optoelectrofluidic sandwich immunoassays for detection of human tumor marker using surface-enhanced Raman scattering. Analyt Chem. 2010; (82): 7603–10.
57. Li J-M, Ma W-F, Wei C, Guo J, Hu J, Wang C-C. Poly(styrene-co-acrylic acid) core and silver nanoparticle/silica shell composite microspheres as high performance surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrate and molecular barcode label. J Mater Chem. 2011; (21): 5992–98.
58. Chen J-W, Lei Y, Liu X-J, Jiang J-H, Shen G-L, Yu R-Q. Immunoassay using surface-enhanced Raman scattering based on aggregation of reporter-labeled immunogold nanoparticles. Anal Bioanal Chem. 2008; (392): 187–93.
59. Ma K, Yuen JM, Shah NC, Walsh JT, Glucksberg MR, Van Duyne RP. In Vivo, transcutaneous glucose sensing using surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy: multiple rats, improved hypoglycemic accuracy, low incident power, and continuous monitoring for greater than 17 days. Anal Chem. 2011; (83): 9146–52.
60. Pînzaru SC, Andronie LM, Domsa I, Cozar O, Astilean S. Bridging biomolecules with nanoparticles: surface-enhanced Raman scattering from colon carcinoma and normal tissue. J Raman Spectrosc. 2008; (39): 331–4.
61. Wang X, Qian X, Beitler JJ, Chen ZG, Khuri FR, Lewis MM et al. Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles. Cancer Res. 2011; (71): 1526–32.
62. Thomson PIT, Camus VL, Hu Y, Campbell CJ. Series of quinone-containing nanosensors for biologically relevant redox potential determination by surface-enhanced Raman spectroscopy. Anal Chem. 2015; 87 (9): 4719–35.
63. Qu L-L, Li D-W, Qin L-X, Mu J, Fossey JS, Long Y-T. Selective and sensitive detection of intracellular O2(•-) using Au NPs/cytochrome c as SERS nanosensors. Anal Chem. 2013; 85 (20): 9549–55.
64. Sivanesan A, Witkowska E, Adamkiewicz W, Dziewit Ł, Kamińska A, Waluk J. Nanostructured silver-gold bimetallic SERS substrates for selective identification of bacteria in human blood. Analyst. 2013; 139 (5): 1037–43.
65. Vitol EA, Orynbayeva Z, Bouchard MJ, Azizkhan-Clifford J, Friedman G, Gogotsi Y. In situ intracellular spectroscopy with surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)-enabled nanopipettes. ACS Nano. 2009; 3 (11): 3529–36.
66. Vitol EA, Brailoiu E, Orynbayeva Z, Dun NJ, Friedman G, Gogotsi Y. Surface-enhanced Raman spectroscopy as a tool for detecting Ca2+ mobilizing second messengers in cell extracts. Anal Chem. 2010; 8 (16): 6770–4.
67. Zhang Q, Lu X, Tang P, Zhang D, Tian J, Zhong L. Gold nanoparticle (AuNP)-based surface-enhanced Raman scattering (SERS) probe of leukemic lymphocytes. Plasmonics. 2016; (11): 1361–8.
68. Berezhna S, Wohlrab H, Champion PM. Resonance Raman investigations of cytochrome c conformational change upon interaction with the membranes of intact and Ca2+-exposed mitochondria. Biochemistry. 2003; (42): 6149–58.
69. Pankratova MS, Baizhumanov AA, Yusipovich AI, Faassen M, Shiryaeva TYu, Peterkova VA et al. Imbalance in the blood antioxidant systemin growth hormone-deficient children before and after 1 year of recombinant growth hormone therapy. Peer J. 2015; (3): e1055(1)–e1055(12).
70. Brazhe NA, Baizhumanov AA, Parshina EYu, Yusipovich AI, Akhalaya MYa, Yarlykova YuV et al. Studies of the blood antioxidant system and oxygen-transporting properties of human erythrocytes during 105-day isolation. Human physiology. 2014; (40): 804–9.
71. Rodan LH, Gibson KM, Pearl PL. Clinical Use of CSF Neurotransmitters J Pediatr Neurol. 2015; 53 (4): 277–86.

72. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. Pharmacol Rev. 2004; 56 (3): 331–49.
73. Goldstein DS, Kopin IJ, Sharabi Y. Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. Pharmacol Ther. 2014; 144 (3): 268–82.
74. Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Montplaisir JY. Markers of neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder and Parkinson's disease. Brain. 2009; 132 (12): 3298–307.
75. Subramaniam R. Pheochromocytoma — current concepts in diagnosis and management. Trends Anaesth Crit Care. 2011; 1 (2): 104–10.
76. Yangong H, Shi C, Shahbaz M, Zhengchuan N, Wang J, Liang B et al. Diagnosis and treatment experience of rectal carcinoid (a report of 312 cases). Int J Surg. 2014; 12 (5): 408–11.
77. Sadilkova K, Dugaw K, Benjamin D, Jack RM. Analysis of vanillylmandelic acid and homovanillic acid by UPLC-MS/MS in serum for diagnostic testing for neuroblastoma. Clin Chim Acta. 2013; (424): 253–7.
78. Rodriguez MC, Rubianes MD, Rivas GA. Highly selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin at glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine. J Nanosci Nanotechnol. 2008; 8 (11): 6003–9.
79. Mazloum-Ardakani M, Khoshroo A. High performance electrochemical sensor based on fullerene-functionalized carbon nanotubes/ionic liquid: Determination of some catecholamines. Electrochem Comm. 2014; (42): 9–12.
80. Rezaei B, Boroujeni MK, Ensafi AA. Fabrication of DNA, o-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer electrochemical sensor for the determination of dopamine. Biosens Bioelectron. 2015; (66): 490–6.
81. Gao N, Xu Z, Wang F, Dong SJ. Sensitive biomimetic sensor based on molecular imprinting at functionalized indium tin oxide electrodes. Electroanalisis. 2007; (19): 1655–60.
82. Poliakov AE, Dumshakova AV, Muginova SV, Shekhovtsova TN. A peroxidase-based method for the determination of dopamine, adrenaline, and α-methyldopa in the presence of thyroid hormones in pharmaceutical forms. Talanta. 2011; 84 (3): 710–6.
83. Huang H, Gao Y, Shi F, Wang G, Shah SM, Su X. Determination of catecholamine in human serum by a fluorescent quenching method based on a water-soluble fluorescent conjugated polymer-enzyme hybrid system. Analyst. 2012; 137 (6): 1481–6.
84. Liu CH, Yu CJ, Tseng WL. Fluorescence assay of catecholamines based on the inhibition of peroxidase-like activity of magnetite nanoparticles. Anal Chim Acta. 2012; (745): 143–8.
85. Schulze HG, Blades MW, Bree AV, Gorzalka BB, Greek LS, Turner RFB. Characteristics of backpropagation neural networks employed in the identification of neurotransmitter Raman spectra. Appl Spectrosc. 1994; (48): 50–7.
86. Sharma B, Frontiera RR, Henry AI, Ringe E, Van Duyne RP. SERS: Materials, applications, and the future. Mater Today. 2012; (15): 16–25.
87. Lim JW, Kang IJ. Fabrication of chitosan-gold nanocomposites combined with optical fiber as SERS substrates to detect dopamine molecules. Bull Korean Chem Soc. 2014; (35): 25–9.
88. Lim JW, Kang IJ. Chitosan-gold nano composite for dopamine analysis using Raman scattering. Bull Korean Chem Soc. 2013; (34): 237–42.
89. Tang L, Li S, Han F, Liu L, Xu L, Ma W et al. SERS-active Au@Ag nanorod dimers for ultrasensitive dopamine detection. Biosens Bioelectron. 2015; (71): 7–12.
90. Lee NS, Hsieh YZ, Paisley RF, Morris MD. Surface enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds. Anal Chem. 1998; (60): 442–6.
91. Kneipp K, Wang Y, Dasari RR, Feld MS. Near-infrared surface-enhanced Raman scattering (NIR-SERS) of neurotransmitters in colloidal silver solutions. Spectrochim Acta. 1995; (51A): 481–7.
92. Volkan M, Stokes DL, Vo-Dinh T. Surface-Enhanced Raman of dopamine and neurotransmitters using sol-gel substrates and polymer-coated fiber-optic probes. Appl Spectrosc. 2000; 54 (12): 1842–8.
93. Barreto WJ, Barreto SRG, Ando RA, Santos PS, DiMauro E, Jorge T. Raman, IR, UV–vis and EPR characterization of two copper dioxolene complexes derived from L-DOPA and dopamine. Spectrochim. Acta Part A. 2008; 71 (4): 1419–24.

References

1. Semkina A, Abakumov M, Grinenko N, Abakumov A, Skorikov A, Mironova E et al. Core-shell-corona doxorubicin-loaded superparamagnetic Fe3O4 nanoparticles for cancer theranostics. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015; (136): 1073–80.
2. Chekhonin VP, Baklaushev VP, Yusubalieva GM, Belorusova AE, Gulyaev MV, Tsitrin EB et al. Targeted delivery of liposomal nanocontainers to the peritumoral zone of glioma by means of monoclonal antibodies against GFAP and the extracellular loop of Cx43 Nanomedicine. 2012; 8 (1): 63–70.
3. Nukolova NV, Aleksashkin AD, Abakumova TO, Morozova AY, Gubskiy IL, Kirzhanova EA et al. Multilayer polyion complex nanoformulations of superoxide dismutase 1 for acute spinal cord injury. J Control Release. 2018; (270): 226–36.
4. Kovaleva EV, Sinyukova GT, Danzanova TY, Lepedatu PI, Gidulina EA, Vozmozhnosti UZI s primeneniyem contrastnogo usileniya v diagnostike metastazov v pecheni u bolnih kolorectalnim rakom. Koloproktologiya. 2018; 1 (63): 36–42.
5. Bednikov SN, Sholokhov VN, Sinyukova GT, Goodilina EA, Abgaryan MG, Kalinin AE i dr. Differentsialnaya diagnostika ochagovih giperekhogennih orazovaniy v pecheni. Koloproktologiya. 2017; 2 (60): 19–25.
6. Nirmala D. Review: Medical image contrast enhancement techniques, Research Journal of Pharmaceutical Biological and Chemical Sciences. 2015; 6 (3): 321–9.
7. Chen F, Hableel G, Zhao ER, Jokerst JV. Multifunctional nanomedicine with silica: Role of silica in nanoparticles for theranostic, imaging and drug monitoring. J Colloid and Interface Science. 2018; (521): 261–79.
8. Balthazar P, Shinagare AB, Tirumani SH, Jagannathan JP, Ramaiya NH, Khorosani R. Gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors: impact of consistent contrast agent selection on radiologists' confidence in hepatic lesion assessment on restarding MRIs. Abdominal Radiology. 2018; 6 (43): 1386–92.
9. Eremina OE, Semenova AA, Sergeeva EA, Brazhe NA, Maksimov GV, Shekhovtsova TN, Goodilin EA, Veselova IA, Surface enhanced Raman spectroscopy in modern chemical analysis: achievements and prospects. Russ Chem Rev. 2018; 87 (8): 741–70, DOI: doi.org/10.1070/RCR4804.
10. Vatsadze SZ, Eremina OE, Veselova IA, Kalmykov SN, Nenajdenko VG. 18F-Labelled catecholamine type radiopharmaceuticals in the diagnosis of neurodegenerative diseases and neuroendocrine tumours: approaches to synthesis and development prospects. Russ Chem Rev. 2018; 87 (4): 350–73, DOI: doi.org/10.1070/RCR4752/
11. Veselova IA, Sergeeva EA, Makedonskaya MI, Eremina OE, Kalmykov SN, Shekhovtsova TN. Metodi opredeleniya markerov neyromediatornogo obmena v celyah klinicheskoy diagnostiki. Russian Journal of Analytical chemistry. 2016; 71 (12): 1235–49.
12. Kneipp K, Wang Y, Kneipp H, Perelman LT, Itzkan I, Dasari RR et al. Single molecule detection using surface-enhanced Raman scattering (SERS). Phys Rev Lett. 1997; (78): 1667–70.
13. Olenin AY, Lisichkin GV. Metal nanoparticles in condensed media: preparation and the bulk and surface structural dynamics. Russ Chem Rev. 2011; (80): 605–35.
14. Cialla D, März A, Böhme R, Theil F, Weber K, Schmitt M et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS): Progress and

trends. Anal Bioanal Chem. 2012; (403): 27–54.
15. Laing S, Gracie K, Faulds K. Multiplex in vitro detection using SERS. Chem Soc Rev. 2016; (45): 1901–18.
16. Semenova AA, Goodilin EA, Brazhe NA, Ivanov VK, Baranchikov AE, Lebedev VA et al. Planar SERS nanostructures with stochastic silver ring morpholgy for biosensor chips. J Mater Chem. 2012; (22): 24530–44.
17. Semenova AA, Brazhe NA, Parshina EY, Sarycheva AS, Maksimov GV, Goodilin EA. A new route for SERS analysis of intact erythrocytes using polydisperse silver nanoplatelets on biocompatible scaffolds. RSC Adv. 2016; (6): 85156–63.
18. Brazhe NA, Evlyukhin AB, Goodilin EA, Semenova AA, Novikov SM, Bozhevolnyi SI et al. Probing cytochrome c in living mitochondria with surface-enhanced Raman spectroscopy. Sci Rep. 2015; (5): 13793(1)–13793(13).
19. Durmanov NN, Guliev RR, Eremenko AV, Boginskaya IA, Ryzhikov IA, Trifonova EA et al. Non-labeled selective virus detection with novel SERS-active porous silver nanofilms fabricated by Electron Beam Physical Vapor Deposition. Sens Actuators B. 2018; (257): 37–47.
20. Nechaeva N, Prokopkina T, Makhaeva G, Rudakova E, Boltneva N, Dishovsky et al. Quantitative butyrylcholinesterase activity detection by surface-enhanced Raman spectroscopy. Sens Actuators B. 2018; (259): 75–82.
21. Kneipp J, Kneipp H, Wittig B, Kneipp K. One- and two-photon excited optical ph probing for cells using surface-enhanced Raman and hyper-Raman nanosensors. Nano Lett. 2007; (7): 2819–23.
22. Drescher D, Kneipp J. Nanomaterials in complex biological systems: insights from Raman spectroscopy. Chem Soc Rev. 2012; (41): 5780–99.
23. Wood BR, Caspers P, Puppels GJ, Pandiancherri S, McNaughton D. Resonance Raman spectroscopy of red blood cells using near-infrared laser excitation. Anal Bioanal Chem. 2007; (387): 1691–703.
24. Brazhe NA, Parshina EY, Khabatova VV, Semenova AA, Brazhe AR, Yusipovich AI et al. Tuning SERS for living erythrocytes: Focus on nanoparticle size and plasmon resonance position. J Raman Spectrosc. 2013; (44): 686–94.
25. Semenova AA, Brazhe NA, Parshina EY, Ivanov VK, Maksimov GV, Goodilin EA. Aqueous diaminsilver hydroxide as a precursor of pure silver nanoparticles for SERS probing of living erythrocytes. Plasmonics. 2013; (9): 227–35.
26. Jarvis RM, Goodacre R. Discrimination of bacteria using surface-enhanced Raman spectroscopy. Anal Chem. 2004; (76): 40–7.
27. Wang P, Pang S, Chen J, McLandsborough L, Nugen SR, Fan M et al. Label-free mapping of single bacterial cells using surface-enhanced Raman spectroscopy. Analyst. 2016; (141): 1356–62.
28. Granger JH, Schlotter NE, Crawford AC, Porter MD. Prospects for point-of-care pathogen diagnostics using surface-enhanced Raman scattering (SERS). Chem Soc Rev. 2016; (45): 3865–82.
29. Hoang V, Tripp RA, Rota P, Dluhy RA. Identification of individual genotypes of measles virus using surface enhanced Raman spectroscopy. Analyst. 2010; (135): 3103–9.
30. Luo S-C, Sivashanmugan K, Liao J-D, Yao C-K, Peng H-C. Nanofabricated SERS-active substrates for single-molecule to virus detection in vitro: A review. Biosens Bioelectron. 2014; (61): 232–40.
31. El-Said WA, Kim SU, Choi J-W. Monitoring in vitro neural stem cell differentiation based on surface-enhanced Raman spectroscopy using a gold nanostar array. J Mater Chem C. 2015; (3): 3848–59.
32. Han J, Qian X, Wu Q, Jha R, Duan J, Yang Z et al. Novel surface-enhanced Raman scattering-based assays for ultra-sensitive detection of human pluripotent stem cells. Biomaterials. 2016; (105): 66–76.
33. Howes PD, Rana S, Stevens MM. Plasmonic nanomaterials for biodiagnostics. Chem Soc Rev. 2014; (43): 383–8.
34. McAughtrie S, Faulds K, Graham D. Surface enhanced Raman spectroscopy (SERS): potential applications for disease detection and treatment. J Photochem Photobiol C. 2014; (21): 40–53.
35. Puppels GJ, de Mul FFM, Otto C, Greve J, Robert-Nicoud M, Arndt-Jovin DJ et al. Studying single living cells and chromosomes by confocal Raman microspectroscopy. Nature. 1990; (347): 301–3.
36. Alvarez-Puebla RA, Liz-Marzán LM. SERS-based diagnosis and biodetection. Small. 2010; (6): 604–10.
37. März A, Mönch B, Rösch P, Kiehntopf M, Henkel T, Popp J. Detection of thiopurine methyltransferase activity in lysed red blood cells by means of lab-on-a-chip surface enhanced Raman spectroscopy (LOC-SERS). Anal Bioanal Chem. 2011; (400): 2755–61.
38. Jahn IJ, Žukovskaja O, Zheng X-S, Weber K, Bocklitz TW, Cialla-May D et al. Surface-enhanced Raman spectroscopy and microfluidic platforms: challenges, solutions and potential applications. Analyst. 2017; (142): 1022–47.
39. Kumar S, Goel P, Singh JP. A facile method for fabrication of buckled PDMS silver nanorod arrays as active 3D SERS cages for bacterial sensing. Sens Actuators B. 2017; (241): 577–83.
40. Polavarapu L, Perez-Juste J, Xu Q, Liz-Marzán LM. Optical sensing of biological, chemical and ionic species through aggregation of plasmonic nanoparticles. J Mater Chem C. 2014; (2): 7460–76.
41. Dhillon A, Nair M, Kumar D. Analytical methods for sensing of health-hazardous arsenic from biotic and abiotic natural resources. Anal Methods. 2015; (7): 10088–108.
42. Xiao L, Zhang M, Liu Z, Bian W, Zhang X, Zhan J. Hydrophobic silver nanowire membrane for swabbing extraction and in situ SERS detection of polycyclic aromatic hydrocarbons on toys. Anal Methods. 2017; (9): 1816–24.
43. Fleischmann M, Hendra PJ, McQuillan AJ. Raman spectra of pyridine adsorbed at a silver electrode. Chem Phys Lett. 1974; (26): 163–6.
44. Wachsmann-Hogiu S, Weeks T, Huser T. Chemical analysis in vivo and in vitro by Raman spectroscopy — From single cells to humans. Curr Opin Biotechnol. 2009; (20): 63–73.
45. Yazdi SH, White IM. A nanoporous optofluidic microsystem for highly sensitive and repeatable surface enhanced Raman spectroscopy detection. Biomicrofluidics. 2012; (6): 14105–59.
46. Sharma VK, Yngard RA, Lin Y. Green synthesis and their antimicrobial activities. Adv Colloid Interface Sci. 2009; (145): 83–96.
47. Sun Y. Shape-controlled synthesis of gold and silver nanoparticles. Science. 2002; (298): 2176–9.
48. Guerrero-Martínez A, Barbosa S, Pastoriza-Santos I, Liz-Marzán LM. Nanostars shine bright for you: colloidal synthesis, properties and applications of branched metallic nanoparticles. Curr Opin Colloid Interface Sci. 2011; (16): 118–27.
49. Lim B, Xia Y. Metal nanocrystals with highly branched morphologies. Angew Chem Int Ed. 2011; (50): 76–85.
50. Pietrobon B, Kitaev V. Photochemical synthesis of monodisperse size-controlled silver decahedral nanoparticles and their remarkable optical properties. Chem Mater. 2008; (20): 5186–90.
51. Phan-Quang GC, Lee HK, Phang IY, Ling XY. Plasmonic colloidosomes as three-dimensional SERS platforms with enhanced surface area for multiphase sub-microliter toxin sensing. Angew Chem Int Ed. 2015; (54): 9691–5.
52. Tien D-C, Liao C-Y, Huang J-C, Tseng K-H, Lung J-K, Tsung T-T et al. Novel technique for preparing a nano-silver water suspension by the arc-discharge method. Rev Adv Mater Sci. 2008; (18): 750–6.
53. Gongalsky MB, Osminkina LA, Pereira A, Manankov AA, Fedorenko AA, Vasiliev AN et al. Laser-synthesized oxide-passivated bright Si quantum dots for bioimaging. Sci Rep. 2016; (6): 24732(1)–24732(8).
54. Nadagouda MN, Varma RS. Green synthesis of silver and palladium nanoparticles at room temperature using coffee and tea extract. Green Chem. 2008; (10): 859–62.
55. Moulton MC, Braydich-Stolle LK, Nadagouda MN, Kunzelman S, Hussain SM, Varma RS. Synthesis, characterization and biocompatibility of "green" synthesized silver nanoparticles using tea polyphenols. Nanoscale. 2010; (2): 763–70.
56. Hwang H, Chon H, Choo J, Park JK. Optoelectrofluidic sandwich immunoassays for detection of human tumor marker using surface-enhanced Raman scattering. Analyt Chem. 2010; (82): 7603–10.
57. Li J-M, Ma W-F, Wei C, Guo J, Hu J, Wang C-C. Poly(styrene-co-acrylic acid) core and silver nanoparticle/silica shell composite

microspheres as high performance surface-enhanced Raman spectroscopy (SERS) substrate and molecular barcode label. J Mater Chem. 2011; (21): 5992–98.
58. Chen J-W, Lei Y, Liu X-J, Jiang J-H, Shen G-L, Yu R-Q. Immunoassay using surface-enhanced Raman scattering based on aggregation of reporter-labeled immunogold nanoparticles. Anal Bioanal Chem. 2008; (392): 187–93.
59. Ma K, Yuen JM, Shah NC, Walsh JT, Glucksberg MR, Van Duyne RP. In Vivo, transcutaneous glucose sensing using surface-enhanced spatially offset Raman spectroscopy: multiple rats, improved hypoglycemic accuracy, low incident power, and continuous monitoring for greater than 17 days. Anal Chem. 2011; (83): 9146–52.
60. Pînzaru SC, Andronie LM, Domsa I, Cozar O, Astilean S. Bridging biomolecules with nanoparticles: surface-enhanced Raman scattering from colon carcinoma and normal tissue. J Raman Spectrosc. 2008; (39): 331–4.
61. Wang X, Qian X, Beitler JJ, Chen ZG, Khuri FR, Lewis MM et al. Detection of circulating tumor cells in human peripheral blood using surface-enhanced Raman scattering nanoparticles. Cancer Res. 2011; (71): 1526–32.
62. Thomson PIT, Camus VL, Hu Y, Campbell CJ. Series of quinone-containing nanosensors for biologically relevant redox potential determination by surface-enhanced Raman spectroscopy. Anal Chem. 2015; 87 (9): 4719–35.
63. Qu L-L, Li D-W, Qin L-X, Mu J, Fossey JS, Long Y-T. Selective and sensitive detection of intracellular O2(•-) using Au NPs/cytochrome c as SERS nanosensors. Anal Chem. 2013; 85 (20): 9549–55.
64. Sivanesan A, Witkowska E, Adamkiewicz W, Dziewit Ł, Kamińska A, Waluk J. Nanostructured silver-gold bimetallic SERS substrates for selective identification of bacteria in human blood. Analyst. 2013; 139 (5): 1037–43.
65. Vitol EA, Orynbayeva Z, Bouchard MJ, Azizkhan-Clifford J, Friedman G, Gogotsi Y. In situ intracellular spectroscopy with surface enhanced Raman spectroscopy (SERS)-enabled nanopipettes. ACS Nano. 2009; 3 (11): 3529–36.
66. Vitol EA, Brailoiu E, Orynbayeva Z, Dun NJ, Friedman G, Gogotsi Y. Surface-enhanced Raman spectroscopy as a tool for detecting Ca2+ mobilizing second messengers in cell extracts. Anal Chem. 2010; 8 (16): 6770–4.
67. Zhang Q, Lu X, Tang P, Zhang D, Tian J, Zhong L. Gold nanoparticle (AuNP)-based surface-enhanced Raman scattering (SERS) probe of leukemic lymphocytes. Plasmonics. 2016; (11): 1361–8.
68. Berezhna S, Wohlrab H, Champion PM. Resonance Raman investigations of cytochrome c conformational change upon interaction with the membranes of intact and Ca2+-exposed mitochondria. Biochemistry. 2003; (42): 6149–58.
69. Pankratova MS, Baizhumanov AA, Yusipovich AI, Faassen M, Shiryaeva TYu, Peterkova VA et al. Imbalance in the blood antioxidant systemin growth hormone-deficient children before and after 1 year of recombinant growth hormone therapy. Peer J. 2015; (3): e1055(1)–e1055(12).
70. Brazhe NA, Baizhumanov AA, Parshina EYu, Yusipovich AI, Akhalaya MYa, Yarlykova YuV et al. Studies of the blood antioxidant system and oxygen-transporting properties of human erythrocytes during 105-day isolation. Human physiology. 2014; (40): 804–9.
71. Rodan LH, Gibson KM, Pearl PL. Clinical Use of CSF Neurotransmitters J Pediatr Neurol. 2015; 53 (4): 277–86.
72. Eisenhofer G, Kopin IJ, Goldstein DS. Catecholamine metabolism: a contemporary view with implications for physiology and medicine. Pharmacol Rev. 2004; 56 (3): 331–49.
73. Goldstein DS, Kopin IJ, Sharabi Y. Catecholamine autotoxicity. Implications for pharmacology and therapeutics of Parkinson disease and related disorders. Pharmacol Ther. 2014; 144 (3): 268–82.
74. Postuma RB, Gagnon JF, Vendette M, Montplaisir JY. Markers of neurodegeneration in idiopathic rapid eye movement sleep behaviour disorder and Parkinson's disease. Brain. 2009; 132 (12): 3298–307.
75. Subramaniam R. Pheochromocytoma — current concepts in diagnosis and management. Trends Anaesth Crit Care. 2011; 1 (2): 104–10.
76. Yangong H, Shi C, Shahbaz M, Zhengchuan N, Wang J, Liang B et al. Diagnosis and treatment experience of rectal carcinoid (a report of 312 cases). Int J Surg. 2014; 12 (5): 408–11.
77. Sadilkova K, Dugaw K, Benjamin D, Jack RM. Analysis of vanillylmandelic acid and homovanillic acid by UPLC-MS/MS in serum for diagnostic testing for neuroblastoma. Clin Chim Acta. 2013; (424): 253–7.
78. Rodriguez MC, Rubianes MD, Rivas GA. Highly selective determination of dopamine in the presence of ascorbic acid and serotonin at glassy carbon electrodes modified with carbon nanotubes dispersed in polyethylenimine. J Nanosci Nanotechnol. 2008; 8 (11): 6003–9.
79. Mazloum-Ardakani M, Khoshroo A. High performance electrochemical sensor based on fullerene-functionalized carbon nanotubes/ionic liquid: Determination of some catecholamines. Electrochem Comm. 2014; (42): 9–12.
80. Rezaei B, Boroujeni MK, Ensafi AA. Fabrication of DNA, o-phenylenediamine, and gold nanoparticle bioimprinted polymer electrochemical sensor for the determination of dopamine. Biosens. Bioelectron. 2015; (66): 490–6.
81. Gao N, Xu Z, Wang F, Dong SJ. Sensitive biomimetic sensor based on molecular imprinting at functionalized indium tin oxide electrodes. Electroanalisis. 2007; (19): 1655–60.
82. Poliakov AE, Dumshakova AV, Muginova SV, Shekhovtsova TN. A peroxidase-based method for the determination of dopamine, adrenaline, and α-methyldopa in the presence of thyroid hormones in pharmaceutical forms. Talanta. 2011; 84 (3): 710–6.
83. Huang H, Gao Y, Shi F, Wang G, Shah SM, Su X. Determination of catecholamine in human serum by a fluorescent quenching method based on a water-soluble fluorescent conjugated polymer-enzyme hybrid system. Analyst. 2012; 137 (6): 1481–6.
84. Liu CH, Yu CJ, Tseng WL. Fluorescence assay of catecholamines based on the inhibition of peroxidase-like activity of magnetite nanoparticles. Anal Chim Acta. 2012; (745): 143–8.
85. Schulze HG, Blades MW, Bree AV, Gorzalka BB, Greek LS, Turner RFB. Characteristics of backpropagation neural networks employed in the identification of neurotransmitter Raman spectra. Appl Spectrosc. 1994; (48): 50–7.
86. Sharma B, Frontiera RR, Henry AI, Ringe E, Van Duyne RP. SERS: Materials, applications, and the future. Mater Today. 2012; (15): 16–25.
87. Lim JW, Kang IJ. Fabrication of chitosan-gold nanocomposites combined with optical fiber as SERS substrates to detect dopamine molecules. Bull Korean Chem Soc. 2014; (35): 25–9.
88. Lim JW, Kang IJ. Chitosan-gold nano composite for dopamine analysis using Raman scattering. Bull Korean Chem Soc. 2013; (34): 237–42.
89. Tang L, Li S, Han F, Liu L, Xu L, Ma W et al. SERS-active Au@Ag nanorod dimers for ultrasensitive dopamine detection. Biosens Bioelectron. 2015; (71): 7–12.
90. Lee NS, Hsieh YZ, Paisley RF, Morris MD. Surface enhanced Raman spectroscopy of the catecholamine neurotransmitters and related compounds. Anal Chem. 1998; (60): 442–6.
91. Kneipp K, Wang Y, Dasari RR, Feld MS. Near-infrared surface-enhanced Raman scattering (NIR-SERS) of neurotransmitters in colloidal silver solutions. Spectrochim Acta. 1995; (51A): 481–7.
92. Volkan M, Stokes DL, Vo-Dinh T. Surface-Enhanced Raman of dopamine and neurotransmitters using sol-gel substrates and polymer-coated fiber-optic probes. Appl Spectrosc. 2000; 54 (12): 1842–8.
93. Barreto WJ, Barreto SRG, Ando RA, Santos PS, DiMauro E, Jorge T. Raman, IR, UV–vis and EPR characterization of two copper dioxolene complexes derived from L-DOPA and dopamine. Spectrochim. Acta Part A. 2008; 71 (4): 1419–24.

МАТЕМАТИЧЕСКОЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЕ ПАРАМЕТРОВ ОПУХОЛЬ-СЕЛЕКТИВНОГО НАКОПЛЕНИЯ ПАРАМАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ КЛЕТКАМИ РЕТИНОБЛАСТОМЫ

Р. Дж. Йохансен[1,2], А. А. Бухвостов[3], К. В. Ермаков[3], Д. А. Кузнецов[2,3] ✉

[1] Кафедра математики и компьютерных наук, Университет Южной Дании, Оденсе, Дания

[2] Институт химической физики имени Н. Н. Семенова РАН, Москва

[3] Кафедра медицинских нанобиотехнологий, Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

Ретинобластома — злокачественное новообразование, поражающее сетчатку глаза. Целью работы было разработать вычислительный подход к прогнозированию опухоль-специфического накопления наночастиц, высвобождающих катионы изотопов двухвалентных металлов (^{25}Mg, ^{43}Ca, ^{60}Co, ^{67}Zn, …) в клетках ретинобластомы человека. Предложена математическая модель, основанная на применении уравнения Гомперца и оригинальной версии немарковской популяционной динамики. Она основана на факте ярко выраженного дискриминационного распределения препарата между злокачественными и «соседствующими» с ними нормальными клетками и различиях в параметрах их клеточных циклов. Учтены как фармакокинетические, так и фармакодинамические особенности наночастиц PMC16 — порфирин-производных фуллерена C_{60}, известных благодаря их уникальным возможностям в отношении направленной доставки парамагнитных изотопов металлов в раковые клетки, сопровождающейся существенным химиотерапевтическим эффектом. Демонстрируя зависимость от скорости роста опухоли, но не от ее массы в стационарной фазе, рандомизированный уровень накопления препарата в клетках ретинобластомы формализован как ценный в прогностическом отношении расчетный метод, пригодный для оптимизации проводимых в настоящее время доклинических исследований катионообменных наночастиц PMC16.

Ключевые слова: ретинобластома, парамагнитные цитостатики, нанокатиониты, опухоль-селективное накопление наночастиц, математическая модель накопления препарата

Благодарности: эта работа была бы невозможна без помощи в технических вопросах, которую нам оказали сотрудники Университета Южной Дании в Оденсе в рамках программы Erasmus-Plus DK06811/2020. Авторы выражают особую благодарность Патриции Владычевской, главному руководителю SDS Erasmus.

✉ **Для корреспонденции:** Дмитрий Анатольевич Кузнецов
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; kuznano@mail.ru

Статья получена: 27.06.2018 **Статья принята к печати:** 18.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.078

TOWARDS A COMPUTATIONAL PREDICTION FOR THE TUMOR SELECTIVE ACCUMULATION OF PARAMAGNETIC NANOPARTICLES IN RETINOBLASTOMA CELLS

Johansen RJ[1,2], Bukhvostov AA[3], Ermakov KV[3], *Kuznetsov DA[2,3] ✉

[1] Department of Mathematics and Computer Science, University of Southern Denmark, Odense, DK-5230, Denmark

[2] N. N. Semenov Institute of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Moscow

[3] Department of Medical Nanobiotechnologies, N. I. Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Retinoblastoma is a malignant growth affecting retina. An original combination of modified Non-Markov and Gompertzian computational approaches is proven of being a reliable tool for prediction of tumor selective accumulation of the bivalent metal isotopes (^{25}Mg, ^{43}Ca, ^{60}Co, ^{67}Zn, …) — releasing nanoparticles in human retinoblastoma cells. This mathematical model operates with a starting point of the discriminative drug uptake caused by a gap-like distinction between the neighboring malignant and normal cell proliferation rates. This takes into account both pharmacokinetic and pharmacodynamic peculiarities of PMC16, fullerene-C_{60} based nanoparticles, known for their unique capabilities for a cancer-targeted delivery of paramagnetic metal isotopes followed by an essential chemotherapeutic effect. Being dependent on a tumor growth rate but not on the neoplasm steady state mass, a randomized level of drug accumulation in retinoblastoma cells has been formalized as a predictive paradigm suitable to optimize an ongoing PMC16 preclinical research.

Keywords: retinoblastoma, paramagnetic cytostatics, nanocationites, tumor selective nanoparticles uptake, drug accumulation mathematical model

Acknowledgments: this work was performed due to an exceptional technical assistance kindly provided by Erasmus-Plus DK06811/2020 Program associates affiliated with the Southern Denmark University at Odense, Denmark, and, most specifically, by Ms. Patricia Wladycziewski, SDU Erasmus chief supervising officer.

✉ **Correspondence should be addressed:** Dmitry A. Kuznetsov
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; kuznano@mail.ru

Received: 27.06.2018 **Accepted:** 18.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.078

Ретинобластома (РБ) человека очень чувствительна к некоторым парамагнитным изотопам металлов, индуцирующих магнитные изотопные эффекты, которые ингибируют репарацию ДНК в злокачественных клетках и способствуют образованию укороченных фрагментов ДНК, непригодных для репарации дефектов нуклеосомной ДНК [1–4]. Это свидетельствует в пользу перспективности нового подхода в химиотерапии РБ, основанного на применении наночастиц (НЧ), высвобождающих $^{25}Mg^{2+}$, $^{43}Ca^{2+}$, $^{60}Co^{2+}$, $^{67}Zn^{2+}$, на фоне гиперэкспрессии репарационных ДНК-полимераз β [1, 5, 6].

Комплексы парамагнитных изотопов с PMC16 (рис. 1) — специфический тип амфифильных низкотоксичных НЧ — были разработаны в качестве транспортеров ионов, применяемых как в таргетной противоопухолевой терапии, так и для последующего контролируемого высвобождения препарата в клетках [1, 5]. Влияние этих парамагнетиков проявляется в значительном снижении скорости пролиферации, что показано в экспериментах на клеточных линиях РБ Y79 и WERI-RB-1 [2–4].

Согласно статистике PubMed, количество публикаций, посвященных использованию НЧ для пассивной адресной доставки лекарств, увеличилось за последние 15 лет с 40 (2000 г.) до почти 1800 (2015 г.), причем НЧ рассматриваются только в контексте терапии солидных опухолей [7]. Предполагается, что в ходе доклинических испытаний будет показана возможность использования PMC16 в отношении РБ. Однако ряд эпигенетических факторов, характерных для данного типа опухоли, не позволяет *a priori* судить о селективном поглощении таких НЧ [8–10].

Таким образом, надежный метод прогнозирования объемов селективного накопления НЧ (PMC16) в РБ может быть полезен для исследований, в которых изучается возможность применения данного препарата в борьбе с этим видом онкологических заболеваний.

Целью данной работы было предпринять попытку разработать такой метод с использованием инструментов математического моделирования.

Следует отметить, что математический подход к разработке сценария доклинических и клинических испытаний новых лекарств уже практиковали в экспериментальной онкологии и близких к ней областях [11–17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для моделирования использовали конвенциональные значения объемов распределения НЧ в клетках и параметры их митотических циклов для нормальной и РБ-измененной тканей сетчатки глаза (таблица) [8, 9, 15,18]. Эти данные обрабатывали с помощью алгоритма Sigma QXL600 в анализаторах HP9107 (Hewlett-Packard, Inc; США) и Olivetti Riccetta SL110 (Ing. C. Olivetti & Co.; Италия). Использовали модифицированный метод вероятностной аппроксимации Пенмана–Дальбрё [14, 16], позволяющий синхронно процессировать решения составленных на основе данных эксперимента и литературных данных модифицированных систем уравнений немарковской популяционной динамики [12, 14] и рутинной системы уравнений Гомперца [11].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Цитотоксичное действие препаратов на здоровые ткани, резистентность к ним опухолевых клеток и опухоль-селективное накопление лекарств — критически важные проблемы, возникающие при химиотерапии [5, 6, 8]. Методы математического моделирования могут помочь в выборе и анализе возможных путей, применимых для решения этих проблем [7, 14, 17, 18]. В некоторых случаях такой подход помогает прогнозировать уровень чувствительности к фазоспецифичным средствам (НЧ) с учетом их невекторального, «пассивного», распределения в клеточном пуле, состоящем из клеток, делящихся с разными скоростями и характеризующихся разными величинами продолжительности интерфаз их митозов.

Немарковская популяционная динамика

Динамику популяций с разными параметрами клеточных циклов, которые подвергаются воздействию лекарственных средств, можно моделировать следующим наиболее простым способом:

$$x(t) = \lambda\, x\,(t - \tau)[1 - \mathrm{D}(t)]\,,$$

где x (t) — плотность популяции в заданный момент времени t, λ — скорость обновления клеток, τ — время генерации, D (t) — фактор влияния среды, т. е. D (t) > 0 — достижение эффективной концентрации препарата в системе. Согласно этой модели, время элиминации популяции злокачественных клеток (T_m) и сопредельной поддерживающей популяции (незлокачественных) клеток (T_h), при коэффициенте элиминации Z, отражающем эффективность лечения:

$$Z = 1 - T_m/T_h\,.$$

Эффективность лечения является немонотонной функцией отношения между временем генерации клеток и длительностью курса лекарственной терапии при достижении максимума в момент, когда продолжительность генеративного цикла ограничивающих клеток кратна продолжительности химиотерапии. Дальнейший анализ показывает, что в полностью периодических системах при условии, что $\tau > \delta > \tau/2$, время элиминации T должно быть:

$$T = \tau\omega/|\tau - (\delta + \omega)|\,.$$

Здесь δ — продолжительность периода, в течение которого лекарство производит ожидаемый эффект, а ω — период, в рамках которого дозировка препарата не позволяет

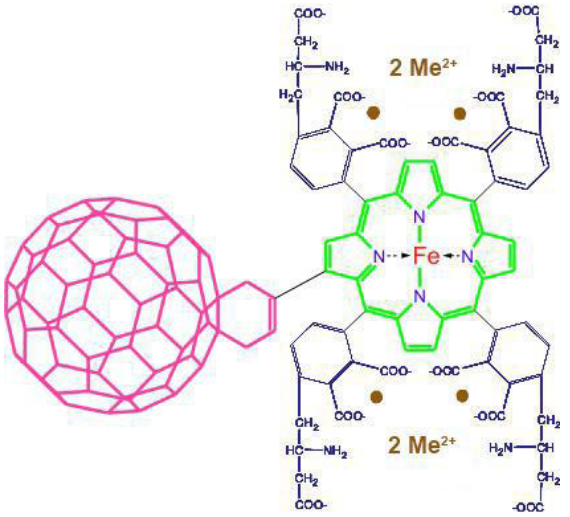


Рис. 1. Структура наночастиц PMC16 (циклогексил(C_{60})порфирин), переносящих Me^{2+} и обладающих выраженными мембранотропными/амфифильными свойствами [1]

Таблица. Параметры обновления клеточных популяций в культурах клеток РБ человека Y79 и WERI-RB-1

Параметр	Значение	T, ч	Источник
TG_1	Продолжительность фазы G_1	8,0	[9, 15]
T_S	Продолжительность фазы S	7,5	[8, 15]
T_{G_2M}	Продолжительность фазы G_2M	2,0	[8, 18]
T_{G_0}	Продолжительность фазы G_0	3,0	[9, 15]
$T_{Apoptosis}$	Продолжительность фазы апоптоза	4,0	[8, 9]

ему оказывать воздействие. $\tau = \delta + \omega$ — точка, в которой значение T бесконечно.

Исходя из этого можно предположить, что классическая немарковская модель популяционной динамики [12, 14] позволяет моделировать распределение НЧ (PMC16) между злокачественной (быстрорастущей) и здоровой (медленнорастущей) частями клеточного пула. Упоминавшийся ранее амфифильный фармакофор (PMC16, транспортер изотопов бивалентных металлов на основе циклогексил-порфина-C_{60}; рис. 1) является подходящим объектом для немарковской модели: ранее была показана способность НЧ этого типа индуцировать цитостатический эффект в клетках острого миелобластного лейкоза и РБ [1, 5, 6].

Предложенная нами двухрезервуарная (бикомпартментная) модель вполне соответствует представленным ниже фармакокинетическим параметрам (применимы в немарковской модели); межвидовые и рандомизированные влияния на CL, V, Q и V2 скорректированы с учетом остаточной ошибки [12, 13, 16]. Эта модель позволяет прогнозировать как селективное поглощение PMC16 клетками опухоли, обусловленное их быстрой пролиферацией, так и обычные фармакокинетические параметры.

Межвидовые ковариантные модели

А. Фармакокинетическая модель

$$C = D/V \bullet \left[\frac{(\alpha - k_{21})}{(\alpha - \beta)} exp - (\alpha \bullet t) + \frac{(k_{21} - \beta)}{(\alpha - \beta)} \bullet exp - (\beta \bullet t) \right]$$

Б. Невекторная ковариантная модель

$$CL_j = [\theta_3 \bullet OCC1 + \theta_4 (WT - 75)] \bullet exp\,(\eta_{CLj})$$

$$V_{cj} = [\theta_1 - (GFR - 80) \bullet \theta_2] \bullet exp\,(\eta_{Vj})$$

$$k_{12_j} = (\theta_5) \bullet exp\,(\eta_{k12_j})$$

В. Модель популяционной динамики

$$C_{ij} = \frac{D_{iv}}{\theta_1 \bullet OCC_1 + \theta_2 \bullet (WT - 75) \bullet exp\,(\eta_{V_j})} \begin{cases} \dfrac{k_{21} - \dfrac{CL_j}{V_{vj}} \bullet exp - \left(\dfrac{CL_j}{V_{cj}} t\right)}{\beta - \dfrac{CL_j}{V_{cj}}} \\ + \dfrac{k_{21} - k_{12}}{\dfrac{CL_j}{V_{cj}} - \beta} \bullet exp - (k_{12} f) \end{cases} \bullet exp\,(\varepsilon_y)$$

Г. Популяционные параметры

$$\theta_1 = 19{,}5$$
$$\theta_2 = 0{,}198$$

Гомперцианская модель

Модели, основанные на функции Гомперца, использовали для описания динамики роста раковых опухолей [7, 11, 14], а также в целях оптимизации стратегий лечения, включающих в себя антиангиогенную [11, 12] и лучевую терапию [11, 13].

Модель является детерминистической. Длительности фаз клеточного цикла τ_φ дискретизированы в нескольких элементарных возрастных интервалах $\alpha \in \{1,\ldots, N_\phi\}$, где N_ϕ — целое число, такое как $\tau_\phi = dt \bullet N_\phi$. Здесь dt — временной шаг модели клеточного цикла. Плотность клеток $n_{\alpha,\phi}$ возраста α в фазе ϕ определяется по формуле:

$$\frac{\partial n_{\alpha,\varphi}}{\partial t} + \nabla \bullet (\nu n_{\alpha,\varphi}) = P_{\alpha,\varphi}\,.$$

В этом уравнении $\phi \in \{G_1, S, G_2\ M, G_0$, апоптоз$\}$, а $\alpha \in \{1,\ldots, N_\phi\}$. $P_{\alpha,\phi}$ — время роста плотности клеток в фазе ϕ возраста α, следуют из общей модели клеточного цикла. Здесь внутриклеточные и внеклеточные условия были определены для клеток в конце фазы G_1.

Далее, принимая во внимания, что $\sum_{\alpha,\phi} n_{\alpha,\phi}$ постоянны, мы получаем описание поля давления:

$$-\nabla \bullet (k \nabla p) = \sum_{\alpha,\varphi} P_{\alpha,\varphi}\,.$$

Компьютерная обработка начинается с учета изначального распределения соседствующих клеток РБ и ТР (ткань ретины/нормальной ткани) в каждом состоянии $\{\alpha, \phi\}$. Расчеты выполнены с применением метода разделения функций. Модель клеточного цикла для одного временного шага dt, дает новые значения $n_{\alpha,\phi}$. Уровень $P_{\alpha,\phi}$ определяется в результирующей системе:

$$\begin{cases} \dfrac{\partial n_{\alpha,\varphi}}{\partial t} + \nabla \bullet (\upsilon n_{\alpha,\varphi}) = 0 \\ \dfrac{\partial n_{\alpha,\varphi}}{\partial t} + \upsilon \bullet \nabla n_{\alpha,\varphi} = \left(\sum\limits_{\alpha',\varphi'} P_{\alpha',\varphi'} \right) n_{\alpha,\varphi} \end{cases}$$

Показателен вариант ее преобразования после применения к ключевым параметрам митотических циклов (*см.* таблицу), представленных в рамках немарковской модели популяционной динамики, отражающей череду возобновляемых состояний, биологически определенных как фазы (G_1, S, G_2 и M):

$$\begin{cases} \dfrac{\partial n_i(t, x)}{\partial t} + \dfrac{\partial n_i(t, x)}{\partial t} + d_\tau(t, x) n_\tau(t, x) + K_{i \to i+1}(t, x) n_i(t, x) = 0 \\ n_{\tau+1}(t, 0) = \int_0^\infty K_{i \to i+1}(t, x) n_i(t, x) dx \\ n_1(t, 0) = 2 \int_0^\infty K_{I \to 1}(t, x) n_I(t, x) dx\,. \end{cases}$$

Здесь начальные условия — $(n_i\,(t = 0))_{1 \le i \le I}$.

Скорости гибели клеток в фазах обозначены как d_ϕ; скорость же перехода между фазами принимается как периодически воспроизводимая. $K_{i \to i+1}$. Фаза i ($1 \le i \le I$) может быть одной из классических четырех (G_1, S, G_2 или M); также она может представлять собой аггрегированную фазу, например S-G_2, или фазу пролиферации G_1-S-G_2-M. С другой стороны, $n_i\,(t, x)$ может быть «субфазой», например до или после ограничения в фазе G_1. Уравнение описывает «эволюцию» значений плотности клеток $n_\phi\,(t, x)$, имеющих возраст x во время t в фазе i.

Системы, представленные выше, описывают две соседние клеточные популяции — быстрорастущую и медленнорастущую; физически они изолированы друг от друга, но являются «соседствующими». Поэтому в данной системе уравнений предполагается введение показателя

эффективности противоопухолевого препарата (g) и функции цитотоксичности (f):

$$g(D, t) = ll\left(1 + \cos(2\pi \frac{(t - \varphi_B)}{24})\right) \cdot \frac{(D^{\Upsilon,B})}{D_{50}^{\Upsilon,B} + D^{\Upsilon,B}},$$

где λ, ν, ε_D, α, B_{max}, H, φ_B, Υ_B, D_{50} — положительные константы, определенные на кривых динамики увеличения массы опухоли, взятые из литературных данных [8, 15, 18] или вычисленные иными способами.

Разница в реакциях этих двух популяций клеток (пара РБ–ТР) на препарат выражается как $\varphi_A - \varphi_B = 13$ ч.

Возвращаясь к исходным положениям Гомперца, видим, что затухающая гармоническая аппроксимация отражает динамику популяции здоровых клеток (ТР):

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = -\lambda P + \frac{i(t)}{V_{dist}}\phi(t) \\ \frac{dC}{dt} = -\mu C + \varepsilon_C P \\ \frac{dP}{dt} = \{-\alpha - f(C, t)\} Z - \beta A + \Upsilon \\ \frac{dA}{dt} = Z - Z_{eq}, \end{cases}$$

где

$$f(C, t) = F\left(1 + \cos(2\pi \frac{t - \varphi_A}{24})\right) \frac{C^{y,A}}{C_{50}^{Y,A} + C^{Y,A}},$$

а λ, μ, ε_C, α, β, Υ, Z_{eq}, F, φ_A, Υ_A, C_{50} — положительные константы, определенные из кривых динамики увеличения массы опухоли [7, 10, 15].

Эти уравнения отражают диффузию и выведение лекарства согласно кинетике первого порядка (P и C) для однократного внутривенного введения препарата. Здесь мгновенная доставка лекарства $i(t)$ и Φ (функция «открыто/закрыто») соответствуют условиям гомеостаза здоровых тканей в линейной системе, устойчиво сфокусированной на Z_{eq}, $A_{eq} = \beta^{-1}(\Upsilon - \alpha Z_{eq})$. Вмешательство цитотоксичного препарата увеличивает значение коэффициента саморегуляции α.

Таким образом, наша модель, выведенная из ряда уравнений Гомперца, вполне подходит для прогнозирования динамики популяций опухолевых клеток:

$$\begin{cases} \frac{dP}{dt} = -\lambda P + \frac{i(t)}{V_{dist}}\phi(t) \\ \frac{dD}{dt} = -\nu D + \varepsilon_D P \\ \frac{dB}{dt} = -\alpha B \ln\left(\frac{B}{B_{max}} - g(D, t)B\right). \end{cases}$$

Этот подход — не что иное как способ представить изменения в составе клеточной популяции, прибегая к простому линейному аппроксимированию, обычно исключающему ответные реакции на введение эффектора (лекарства), если оно не приводит к увеличению объема «резервуара» клеток, т. е. массы опухоли:

$$\begin{cases} \frac{\partial}{\partial t}\mathrm{p}(t, x) + \frac{\partial}{\partial x}\mathrm{p}(t, x) + \{\mu + K(x)\}\mathrm{p}(t, x) = 0 \\ \mathrm{p}(t, x = 0) = 2(1 - f)\int_{\varepsilon \geq 0} K(\varepsilon)\,\mathrm{p}(t, \varepsilon)\,d\varepsilon \\ \mathrm{p}(t, x = 0) = \mathrm{p}_0(x) \\ \frac{d}{dt}Q(t) = 2f\int_{\varepsilon \geq 0} K(\varepsilon)\,\mathrm{p}(t, \varepsilon)\,d\varepsilon - \nu Q(t) \\ Q(0) = Q_0 \end{cases}$$

Акцентируя внимание на перспективах практического применения этой модели, следует указать на связь между цитостатическим эффектом и удельным объемом накопления препарата, выражающуюся в прерывании процесса пролиферации (плотность $p(t, x)$) в момент, соответствующий уровню клеточной популяции $Q(t)$ при наличии мишени для действия препарата f; для скорости прекращения митоза Q, где f обладает высокой аффинностью к цитостатику.

ОБСУЖДЕНИЕ

Селективное поглощение НЧ клетками опухоли. Вероятность и прогноз

Итак, вероятностный прогноз объемов селективного поглощения НЧ клетками РБ преимущественно зависит от соотношения скоростей пролиферации злокачественных и здоровых клеток, тогда как величиной массы злокачественной ткани *per se* (количеством клеток РБ) можно практически пренебречь (рис. 2). Это следует из предсказуемого ответа клеток на быструю диффузию РМС16 *in situ* в момент появления нанопереносчиков Me^{2+} на границе раздела РБ/ТР. Однако в этом стохастическом сценарии «содружество» клеток лишь частично отражает энергетический ланшафт клеток-мишеней [16, 19], что делает вероятность захвата клетками наночастиц зависимой от подвижности энергетического ландшафта и, следовательно, от скорости увеличения объема наиболее быстрорастущей компоненты в паре РБ/ТР (рис. 3).

Изменение цветности от синего к красному на рис. 2 и 3 отражает тенденцию к преимущественному накоплению НЧ в наиболее быстрорастущем «резервуаре» в составе пары РБ/ТР.

Возвращаясь к вероятностному подходу [12, 14], можно сказать, что селективное накопление препарата с РМС16 в опухоли становится предсказуемым ввиду огромной разницы в скоростях увеличения тканевой массы РБ и ТР [8–10, 12]. Таким образом, прогнозируемое в нашей модели (рис. 2) поглощение РМС16, зависящее от скорости пролиферации, описывается уравнением:

$$A_C = Kd[\mathrm{tg}\alpha_{RB}/(\mathrm{tg}\alpha_{RB} - \mathrm{tg}\alpha_{RT})],$$

где K_d — постоянная аппроксимации Арно–Пито [16, 19].

«Волшебная пуля» Пауля Эрлиха: мечта или кошмар?

В 1908–1913 гг. Пауль Эрлих предложил концепцию «волшебной пули» [8, 17], которая ознаменовала закат Вирховианской теории общей патологии. Сегодня эта концепция принята в контексте разработки средств адресной доставки лекарственных препаратов [5,

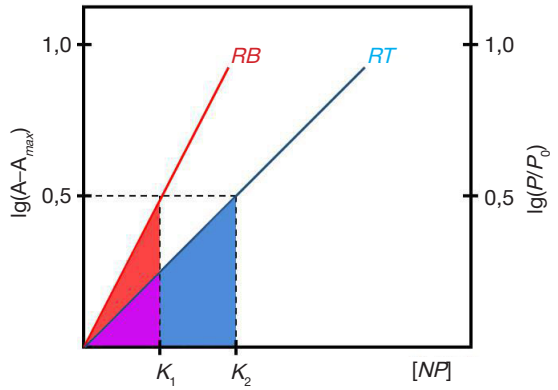


Рис. 2. Прогнозирование селективного поглощения НЧ при полной доступности внутриклеточных лигандов. P — [NP] внутриклеточная концентрация поглощенных НЧ, количество массовых единиц на клетку; P_0 — начальная внутриклеточная концентрация НЧ-лигандов; K_S — вектор K уравнения Гомперца; K_1 — константа поглощения НЧ клеткой при достижении равновесного состояния; K_2 — эффективная константа насыщения пула клеточных лигандов при НЧ → 0,5 P_{max}

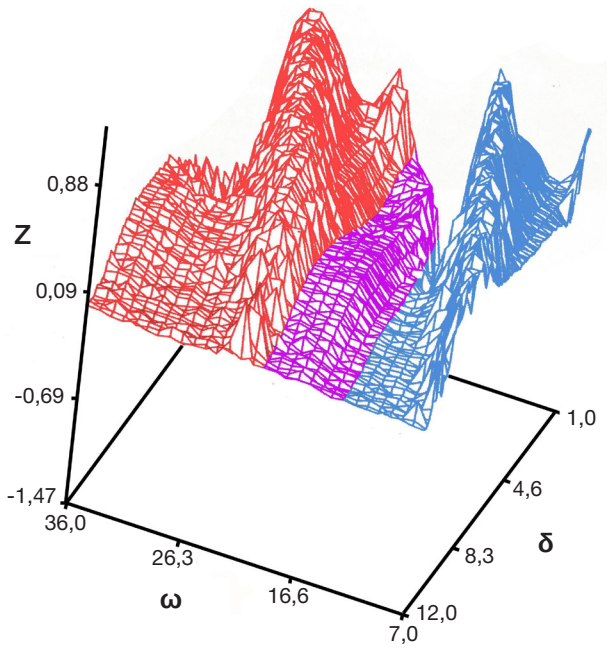


Рис. 3. Вероятностная модель распределения НЧ между соседствующими клетками РБ и ТР как функция дискриминационного отбора на основе различий между параметрами клеточных циклов. Z — коэффициент элиминации для злокачественных и окружающих здоровых клеток, определенный для времени действия лекарственного средства (σ) и времени функционирования клеток в его отсутствие (ω). Обычно σ распределяется в пределах диапазона изменений σ = σ / 10, где ω остается постоянным, в то время как внутренняя скорость появления «новорожденных» клеток составляет λ = 2 при начальном объеме популяции *x* (0) = 5

7, 19]. Такие средства подразумевают использование наноструктур (частиц, контейнеров), т. е. разнообразных «волшебных пуль», которые не только доставляют препараты в клетки-мишени, но и обеспечивают затем их программируемое высвобождение в них [1, 5, 17].

Однако «стрелок», вооруженный «волшебными пулями», не видит полной картины. Так, к границе опухоли может быть доставлено достаточное количество молекул или ионов лекарства, что означает хороший выстрел, но теперь его результат во многом зависит от селективности поглощения этих молекул/ионов опухолевыми клетками. Таким образом, решающее значение имеет не столько точность траектории «полета» пули, сколько последующее распределение НЧ между соседствующими «резервуарами» злокачественных и здоровых клеток. Поэтому предложенная нами прогностическая модель может стать полезным инструментом для оптимизации алгоритмов доклинических и клинических исследований НЧ типа PMC16.

При введении препарата через шлеммов канал и/или интраокулярно (пути, часто используемые в терапии РБ [8]) такой подход не только возможен, но и предпочтителен. Побочные эффекты, которые обычно возникают при парентеральном введении лекарств, можно не учитывать, когда приоритетом является химиотерапия РБ.

ВЫВОДЫ

Предложенная математическая модель позволяет прогнозировать объем селективного накопления лекарственных катионообменных НЧ в клетках ретинобластомы человека, если эти НЧ являются амфифильными и мембранотропными и обладают способностью проникать в клетку-мишень. Этим критериям полностью соответствуют представители семейства PMC16, созданные на основе порфириновых производных фуллерена C_{60}, способные переносить и высвобождать катионы двухвалентных металлов. Модель, учитывающая различия в скоростях пролиферации здоровых и злокачественных клеток, может эффективно применяться для разработки и оптимизации программ доклинических исследований PMC16 и подобных им фармакофоров.

Литература

1. Buchachenko AL. Magneto-Biology and Medicine. New York: Nova Biomedical Publ., 2015.
2. Bukhvostov AA, Dvornikov AS, Ermakov KV, Kurapov PB, Kuznetsov DA. Retinoblastoma: magnetic isotope effects might make a differece in the current anti-cancer research strategy. Acta Medica (Prague). 2017; 60 (2): 93–6.
3. Bukhvostov AA, Dvornikov AS, Ermakov KV, Kuznetsov DA. Retinoblastoma case: shall we get a paramagnetic trend in chemotherapy? Arch Cancer Res. 2017; 5 (4): 158–62.
4. Bukhvostov AA, Pavlov KA, Ermakov KV, Sidoruk KN, Rybakova IV, Kuznetsov DA, Roumiantsev SA. An atypical β-like DNA Polymerase of retinoblastoma cells as a target for spin-selective inhibitory cytostatics. J Fund Med Biol (Russian). 2018; 7 (2): 50–3.
5. Orlova MA, Osipova EY, Roumiantsev SA. Effect of ^{67}Zn-nanoparticles on leukemic cells and normal lymphocytes. Brit J Med Med Res. 2012; 2 (1): 21–30.
6. Orlov AP, Orlova MA, Trofimova TP, Kalmykov SN, Kuznetsov DA. The role of zinc and its compounds in leukemia. J Biol Inorg Chem. 2018; 23 (3): 347–62.
7. Siccardi M, Owen A. Towards a computational prediction of nanoparticle pharmakokinetics and distribution. J In Silico & In Vitro Pharmacol. 2016; 2 (1): 8–11.
8. Augsburger JJ, Chow CML, Dyer V, Roussel MF. Translating science into survival. In: Cajjar A, Pappo A, editors. St. Jude's Children's Research Hospital Report. St. Judes CRH Publ.: Memphis, TN — Cincinnati, OH. 2016; 6–55.
9. Zhang J, Benavente CA, McEvoy J, Flores-Otero J, Ding L, Chen X, Ulyanov A. A novel retinoblastoma therapy from genomic and

epigenetic analyses. Nature. 2012; 481 (7381): 329–34.
10. Bozic I, Nowak MA. Resisting resistance. Ann Rev Cancer Biol. 2017; 1 (1): 203–21.
11. Bassukas ID. Comparative Gompertzian analysis of alterations of tumor growth patterns. Cancer Res. 1994; 54 (16): 4385–92.
12. Byrne H, Prezidosi L. Modelling solid tumor growth using the theory of mixtures. Math Med Biol. 2003; 20 (4): 341–66.
13. Komarova NL. Mathematical modelling of tumorigenesis: mission possible. Curr Opinion Oncol. 2005; 17 (1): 39–43.
14. Trapp S, Horobin RW. A predictive model for the selective accumulation of chemicals in tumor cells. Eur Biophys J. 2005; 34 (7): 959–66.
15. Udvardi L, Lakatos J, Loewenhaupt RK. Dividing Cell. In Vitro–In Silico Models. Szeged, Budapest: Alba Regia, 2017.
16. Lehman RJ, Waugh TS, Rattenau KR, Bielka H. An expanding compartment mode to implement a guest probe diffusion input adopted by the comprehensive Gunault muxtures theory. In: Sieliwanowicz B, Martell SJ, edsitors.Combinational Dynamics in Systems Theory. Sydney—Melbourne—Perth: Adler & Adler Publ., 2018; 116–37.
17. Lamprecht A, Pellecker J. Anti-cancer nano-size agents: targeting paths and pharmacokinetics. In: Lamprecht A, editor. Nanotherapeutics. Drug Delivery Concepts in Nanoscience. NY—London—Singapore: Pan Stanford Publ., 2018; 92–101.
18. Altinok A, Gonze D, Levi F, Goldbeter A. An Automaton model for the cell cycle. Interface Focus. 2011; 1 (1): 36–47.
19. Delbreaux J, Pitot CA. Mathematical model in a new drug preclinical trial. Predictive power and limitations. Leuven—Ghent—Antwerp: Leuven University Press, 2018.

References

1. Buchachenko AL. Magneto-Biology and Medicine. New York: Nova Biomedical Publ., 2015.
2. Bukhvostov AA, Dvornikov AS, Ermakov KV, Kurapov PB, Kuznetsov DA. Retinoblastoma: magnetic isotope effects might make a differece in the current anti-cancer research strategy. Acta Medica (Prague). 2017; 60 (2): 93–6.
3. Bukhvostov AA, Dvornikov AS, Ermakov KV, Kuznetsov DA. Retinoblastoma case: shall we get a paramagnetic trend in chemotherapy? Arch Cancer Res. 2017; 5 (4): 158–62.
4. Bukhvostov AA, Pavlov KA, Ermakov KV, Sidoruk KN, Rybakova IV, Kuznetsov DA, Roumiantsev SA. An atypical β-like DNA Polymerase of retinoblastoma cells as a target for spin-selective inhibitory cytostatics. J Fund Med Biol (Russian). 2018; 7 (2): 50–3.
5. Orlova MA, Osipova EY, Roumiantsev SA. Effect of ^{67}Zn-nanoparticles on leukemic cells and normal lymphocytes. Brit J Med Med Res. 2012; 2 (1): 21–30.
6. Orlov AP, Orlova MA, Trofimova TP, Kalmykov SN, Kuznetsov DA. The role of zinc and its compounds in leukemia. J Biol Inorg Chem. 2018; 23 (3): 347–62.
7. Siccardi M, Owen A. Towards a computational prediction of nanoparticle pharmakokinetics and distribution. J In Silico & In Vitro Pharmacol. 2016; 2 (1): 8–11.
8. Augsburger JJ, Chow CML, Dyer V, Roussel MF. Translating science into survival. In: Cajjar A, Pappo A, editors. St. Jude's Children's Research Hospital Report. St. Judes CRH Publ.: Memphis, TN — Cincinnati, OH. 2016; 6–55.
9. Zhang J, Benavente CA, McEvoy J, Flores-Otero J, Ding L, Chen X, Ulyanov A. A novel retinoblastoma therapy from genomic and epigenetic analyses. Nature. 2012; 481 (7381): 329–34.
10. Bozic I, Nowak MA. Resisting resistance. Ann Rev Cancer Biol. 2017; 1 (1): 203–21.
11. Bassukas ID. Comparative Gompertzian analysis of alterations of tumor growth patterns. Cancer Res. 1994; 54 (16): 4385–92.
12. Byrne H, Prezidosi L. Modelling solid tumor growth using the theory of mixtures. Math Med Biol. 2003; 20 (4): 341–66.
13. Komarova NL. Mathematical modelling of tumorigenesis: mission possible. Curr Opinion Oncol. 2005; 17 (1): 39–43.
14. Trapp S, Horobin RW. A predictive model for the selective accumulation of chemicals in tumor cells. Eur Biophys J. 2005; 34 (7): 959–66.
15. Udvardi L, Lakatos J, Loewenhaupt RK. Dividing Cell. In Vitro–In Silico Models. Szeged, Budapest: Alba Regia, 2017.
16. Lehman RJ, Waugh TS, Rattenau KR, Bielka H. An expanding compartment mode to implement a guest probe diffusion input adopted by the comprehensive Gunault muxtures theory. In: Sieliwanowicz B, Martell SJ, edsitors.Combinational Dynamics in Systems Theory. Sydney—Melbourne—Perth: Adler & Adler Publ., 2018; 116–37.
17. Lamprecht A, Pellecker J. Anti-cancer nano-size agents: targeting paths and pharmacokinetics. In: Lamprecht A, editor. Nanotherapeutics. Drug Delivery Concepts in Nanoscience. NY—London—Singapore: Pan Stanford Publ., 2018; 92–101.
18. Altinok A, Gonze D, Levi F, Goldbeter A. An Automaton model for the cell cycle. Interface Focus. 2011; 1 (1): 36–47.
19. Delbreaux J, Pitot CA. Mathematical model in a new drug preclinical trial. Predictive power and limitations. Leuven—Ghent—Antwerp: Leuven University Press, 2018.

НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЙ ФОТОСЕНСИБИЛИЗАТОР НА ОСНОВЕ ТЕТРАКАТИОННОГО ПРОИЗВОДНОГО БАКТЕРИОХЛОРИНА ДЛЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Г. А. Меерович[1,2] ✉, Е. В. Ахлюстина[2], И. Г. Тиганова[3], Е. А. Макарова[4], Н. И. Филипова[3], И. Д. Романишкин[1], Н. В. Алексеева[3], Е. А. Лукьянец[4], Ю. М. Романова[3], В. Б. Лощенов[1,2]

[1] Институт общей физики имени А. М. Прохорова РАН, Москва

[2] Инженерно-физический институт биомедицины, Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», Москва

[3] Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи, Москва

[4] Научно-исследовательский институт органических полупродуктов и красителей, Москва

Задача повышения эффективности антибактериальной ФДТ делает актуальными создание и исследование фотосенсибилизаторов (ФС) на основе поликатионных синтетических бактериохлоринов. Целью работы было изучить в широком диапазоне концентраций фотофизические и антибактериальные свойства наноструктурированного ФС на основе тетракатионного амфифильного производного синтетического бактериохлорина 3-$Py_4BCHp_4Br_4$. Наноструктурированную дисперсию ФС получили путем его солюбилизации в 4%-м Kolliphor ELP. Исследование интенсивности и формы спектров поглощения и флуоресценции в диапазоне концентраций от 0,001 до 0,2 мМ продемонстрировало низкую агрегацию этого ФС во всем диапазоне и высокую эффективность фотодинамической инактивации грамположительных бактерий *S. aureus* и грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*.

Ключевые слова: фотосенсибилизатор, катионный бактериохлорин, агрегация, наноструктурированная дисперсия, флуоресценция, антибактериальная фотодинамическая терапия

✉ **Для корреспонденции:** Геннадий Александрович Меерович
ул. Вавилова, д. 38, г. Москва, 119991; meerovich@mail.ru

Статья получена: 31.08.2018 **Статья принята к печати:** 27.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.087

NANOSTRUCTURED PHOTOSENSITIZER BASED ON A TETRACATIONIC DERIVATIVE OF BACTERIOCHLORIN FOR ANTIBACTERIAL PHOTODYNAMIC THERAPY

Meerovich GA[1,2] ✉, Akhlyustina EV[2], Tiganova IG[3], Makarova EA[4], Philipova NI[3], Romanishkin ID[1], Alekseeva NV[3], Lukyanets EA[4], Romanova YuM[3], Loschenov VB[1,2]

[1] Prokhorov General Physics Institute of the Russian Academy of Sciences, Moscow

[2] Institute of engineering physics for biomedicine, National Research Nuclear University "MEPHI", Moscow

[3] Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Moscow

[4] Organic Intermediates and Dyes Institute, Moscow

Making antibacterial PDT more effective is a task that calls for the development of photosensitizers (PS) based on polycationic synthetic bacteriochlorins and subsequent analysis of properties of such photosensitizers. This study aimed to explore photophysical and antibacterial properties of the nanostructured PS based on 3-$Py_4BSHp_4Br_4$, tetracationic amphiphilic derivative of synthetic bacteriochlorin. The PS was solubilized in a 4% Kolliphor ELP to obtain its nanostructured dispersion. We researched the absorption and fluorescence spectra intensity and profiles, studying concentrations from 0.001 to 0.2 mM, and found that the aggregation level of the PS in question is low throughout the range investigated while the *S. aureus* (gram-positive) and *P. aeruginosa* and *K. pneumoniae* (gram-negative) PD inactivation effectiveness is high.

Keywords: photosensitizer, cationic bacteriochlorin, aggregation, nanostructured dispersion, fluorescence, antibacterial photodynamic therapy

✉ **Correspondence should be addressed:** Gennady A. Meerovich
Vavilova 38, Moscow, 119991; meerovich@mail.ru

Received: 31.08.2018 **Accepted:** 27.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.087

Антибактериальная фотодинамическая терапия (АФДТ) является перспективным способом лечения локальных инфицированных очагов, в частности хирургических и ожоговых ран, трофических и диабетических язв [1, 2]. При АФДТ в отличие от антибиотикотерапии разрушение бактериальных клеток происходит без развития резистентности в ответ на лечение [3–6]. Большинство патогенных микроорганизмов, в том числе устойчивые к антибиотикам штаммы бактерий, восприимчиво к АФДТ [7].

В локальных инфицированных очагах, в частности инфицированных ранах, наиболее часто обнаруживаются

грамположительные бактерии *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), грамотрицательные бактерии *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) и *Klebsiella pneumoniae* (*K. pneumoniae*), штаммы которых могут обладать множественной антибиотикорезистентностью, приводить к переходу процессов в хроническое состояние и различным опасным последствиям для пациентов [8].

Грамположительные и грамотрицательные бактерии имеют принципиальные различия в своем строении и чувствительности к лекарственному воздействию. Клеточная стенка грамположительных бактерий не оказывает существенного влияния на проникновение в них большинства фотосенсибилизаторов (ФС). У грамотрицательных бактерий она обладает дополнительным структурным элементом — наружной мембраной толщиной 10–15 нм, имеющей гетерогенный состав (белки с пориновой функцией, липополисахаридные тримеры и липопротеины, создающие внешнюю псевдоповерхность плотно упакованных отрицательных зарядов) [9–11]. Такая система препятствует проникновению гуморальных защитных факторов организма и является причиной устойчивости ко многим лекарственным препаратам: через пориновые каналы диффундируют только относительно гидрофильные соединения с молекулярной массой ниже 700 Да, а при увеличении размеров и массы молекул вероятность их диффузии внутрь грамотрицательных бактерий снижается. С грамотрицательными бактериями эффективно взаимодействуют только катионные ФС [10, 11]. Дополнительным преимуществом катионных ФС может быть возможность использования для сенсибилизации их высококонцентрированных водных композиций (растворов или нанодисперсий), поскольку кулоновское отталкивание молекул катионных бактериохлоринов может частично уменьшить их агрегацию [12], снижающую эффективность фотодинамических процессов.

При выборе ФС для АФДТ необходимо иметь в виду, что глубина очагов инфекционного поражения некоторыми бактериями, например *P. aeruginosa*, может достигать 12–15 мм [13], делая неэффективным применение как обычных аппликационных антибактериальных средств (растворов, мазей, гелей), так и ФС, проявляющих фототоксичность при возбуждении в видимом диапазоне спектра. Поэтому для надлежащего фотодинамического воздействия на такие очаги необходимо использовать для АФДТ ФС ближнего инфракрасного диапазона, возбуждение которых осуществляется в «спектральном окне прозрачности биологической ткани» (720–850 нм). В связи с этим в качестве ФС для АФДТ активно исследуют катионные производные бактериохлоринов. Исследования, проведенные на поликатионных производных синтетических бактериохлоринов с молекулярной массой 1500–1800 Да, показали, что эти ФС обеспечивают инактивацию как грамположительных бактерий *S. aureus*, так и грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa*, однако значения минимальной бактерицидной концентрации при использовании этих ФС достаточно высоки (> 6 мкМ на *S. aureus*, около 25 мкМ на *P. aeruginosa*) [14].

Задача повышения эффективности антибактериальной ФДТ делает актуальными создание и исследование ФС на основе поликатионных синтетических бактериохлоринов с уменьшенными размером молекулы и молекулярной массой. Целью работы было изучить в широком диапазоне концентраций фотофизические и антибактериальные свойства наноструктурированного ФС на основе тетракатионного амфифильного производного синтетического бактериохлорина *мезо*-тетра(1-гептил-3-пиридил)бактериохлорина тетрабромида 3-$Py_4BCHp_4Br_4$.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Тетракатионное амфифильное производное синтетического бактериохлорина — *мезо*-тетра(1-гептил-3-пиридил) бактериохлорина) тетрабромид 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ — обладает меньшей степенью липофильности и меньшим радиусом молекулы по сравнению с производным, описанным ранее [14]. Оно было синтезировано алкилированием *мезо*-тетра(3-пиридил)бактериохлорина бромистым гептилом в нитрометане в инертной атмосфере. Наноструктурированную дисперсию 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ получили путем его солюбилизации в 4%-й дисперсии Kolliphor ELP (BASF; Германия). Гидродинамический размер наночастиц, по результатам измерений на приборе Zetasizer Nano Series ZS 3600 (Malvern Panalitical; Великобритания), лежит в пределах 12–14 нм.

Поглощение ФС в диапазоне концентраций 0,001–0,1 мМ изучали на двухлучевом спектрофотометре Hitachi U-3410 (Hitachi; Япония), а спектрально-флуоресцентные исследования проводили с использованием спектроанализатора ЛЭСА-01-Биоспек (ООО БИОСПЕК; Россия). Флуоресценцию возбуждали лазерным излучением с длиной волны 532 нм, попадающей в Q_2-полосу производного бактериохлорина. Для изучения особенностей формы спектральной полосы спектрально-флуоресцентные исследования ФС проводили в кюветах разной длины (1 мм и 10 мм), а спектральную интенсивность флуоресценции дополнительно нормировали на интенсивность флуоресценции в спектральном максимуме ее полосы (приводили спектральный максимум к 1). Это позволило при анализе спектров разделить изменения, связанные с перепоглощением и агрегацией.

Для измерения времени жизни люминесценции водных композиций исследуемых ФС использовали спектрометр с время-разрешающей регистрацией. Спектрометр включал в себя пикосекундный импульсный лазерный источник с оптоволоконным выходом Picosecond Light Pulser PLP-10 (Hamamatsu; Япония), генерирующий импульсное лазерное излучение с длиной волны 637 нм и длительностью импульса 65 пс, полихроматор Jarrell-Ash (Division of Fisher Co; США) с оптоволоконным входом и оптическим фильтром Semrock LD01-785/10-12.5 (Semrock Inc; США) на входе, который пропускал только спектральную область полосы люминесценции производных бактериохлоринов и минимизировал влияние сторонних засветок. Полученный сигнал аппроксимировали суммой нескольких экспонент.

Изучение фотоинактивации планктонных бактерий проводили на клинических изолятах *S. aureus* 15, *P. aeruginosa* 32, *K. pneumoniae* 1556. Бактерии выращивали в питательном бульоне LB или на 1%-м агаре LB (Difco; США). Для планктонных культур определяли минимальную бактерицидную концентрацию (МБК) ФС в стандартных условиях: инкубация бактерий с ФС в течение 30 мин, плотность дозы облучения — 20 Дж/см^2. Исходный титр бактерий составляли 1 • 10^8 КОЕ/мл (колониеобразующих единиц в миллилитре). Использовали двукратные разведения ФС, начиная с 1 мМ. После инкубации бактериальную суспензию центрифугировали в течение 5 мин при 7000 об./мин на лабораторной центрифуге Eppendorf (Eppendorf; Германия), ФС удаляли, бактерии ресуспендировали в физиологическом растворе, суспензии каждой концентрации (а также контроль без ФС) разливали по 100 мкл в лунки двух 96-луночных

плоскодонных планшетов. Один из них был предназначен для опыта с облучением, другой для контроля без облучения.

Для облучения использовали светодиодный источник СФД-М-760 (АНО «МИКЭЛ»; Россия) с длиной волны спектрального максимума 760 нм и полушириной спектральной полосы, равной примерно 35 нм. Плотность мощности составляла 22–25 мВт/см^2, длительность облучения — 20 мин. Для контроля плотности мощности использовали измеритель Coherent labmax (Coherent; США) с диафрагмой.

После облучения 50 мкл из каждой лунки высевали на чашки Петри с агаром LB, инкубировали в темноте при 37 °С в течение 20 ч. Отмечали наименьшую концентрацию ФС, высев из которой не давал роста. Эту концентрацию принимали за МБК.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Изучение зависимости поглощения 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ от его концентрации в нанодисперсии проводили для оценки выраженности агрегационных процессов. Рабочая полоса поглощения 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ имеет узкий спектральный контур (полуширина составляет примерно 22 нм) с максимумом около 760 нм. Исследования показали, что в отличие от поликатионных фталоцианинов признаки агрегации в спектрах поглощения дисперсии 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ не выражены [15]: форма спектра поглощения не изменяется при увеличении концентрации; зависимость оптической плотности от молярной концентрации линейна (выполняется закон Бугера) и согласуется со значениями экстинкции, определенными при низких концентрациях (рис. 1).

Для подтверждения высказанного предположения о невысокой степени агрегации изучаемого ФС проводили спектрально-флуоресцентные исследования его нанодисперсии. Изучали форму и интенсивность спектров флуоресценции, а также излучательное время жизни возбужденного состояния 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ при высоких и низких значениях концентрации.

Анализ приведенных спектров флуоресценции ФС показывает, что увеличение длины кюветы от 1 до 10 мм при низких (0,005 мМ) значениях концентрации не влияет на форму спектрального контура (рис. 2, спектры 1, 2), приводя только к незначительному (на 0,3 нм) сдвигу спектрального максимума из-за перепоглощения. При этом полоса флуоресценции остается узкой (27 нм).

При высоких (0,05 мМ) значениях концентрации, примерно соответствующих концентрации ФС в плазме крови через 1 ч после внутривенного введения, из-за перепоглощения происходит длинноволновое смещение спектрального максимума полосы флуоресценции, зависящее от длины кюветы (на 1,5 нм — в кювете длиной 1 мм и на 3,4 нм — в кювете длиной 10 мм). При этом увеличивается и полуширина полосы флуоресценции (в кювете 1 мм — на 1,1 нм, а в кювете 10 мм — на 4,3 нм),

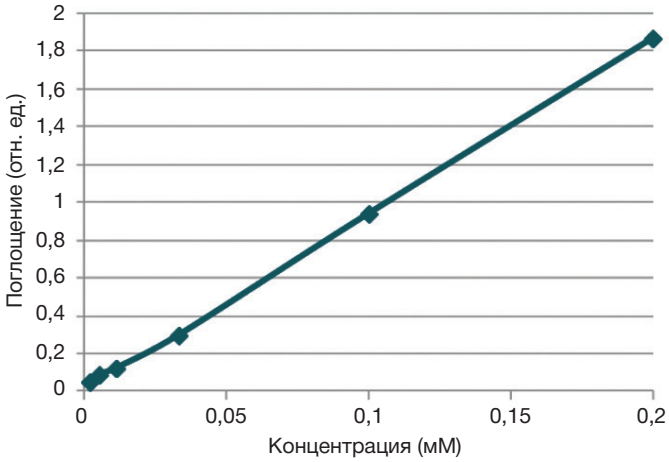


Рис. 1. Зависимость поглощения дисперсии 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ в 4%-м Kolliphor ELP от ее концентрации

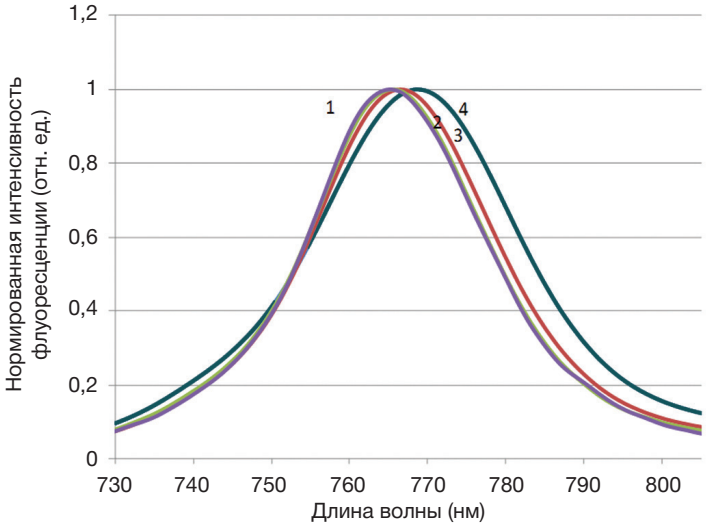


Рис. 2. Приведенные спектры флуоресценции дисперсий 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ разной концентрации (спектры 1,2 — 0,005 мМ; спектры 3,4 — 0,05 мМ) при исследованиях в кюветах разной длины (спектры 1, 3 — 1 мм; спектры 2, 4 — 10 мм)

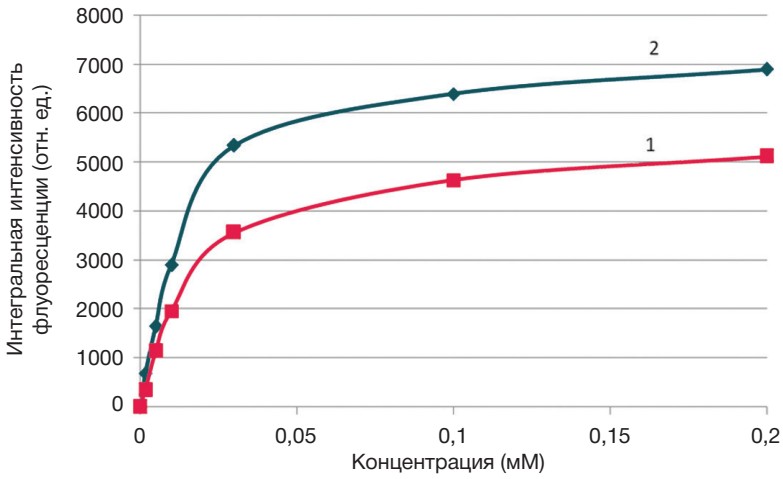


Рис. 3. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции водных композиций 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ от их молярной концентрации: 1 — в воде; 2 — в плазме крови

но форма спектрального контура не меняется, в нем не появляются дополнительные батохромно и гипсохромно сдвинутые пики.

Исследование излучательного времени жизни с использованием ранее описанного подхода [16] показало наличие двух компонент. Доминирующей при исследованиях в воде является компонента со средним значением времени жизни, равным 2,8 нс, доля которой составляет примерно 86%. В плазме крови, где агрегация снижается, доминирующая компонента со средним значением времени жизни, равным около 2,9 нс, составляет почти 100%.

Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции дисперсии от концентрации ФС близка к линейной до 0,03 мМ (рис. 3), а при более высоких концентрациях становится сублинейной. Такая же зависимость наблюдается для композиции 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ в плазме крови. При этом форма кривых почти не изменяется, хотя интенсивность флуоресценции в плазме крови выше по сравнению с интенсивностью флуоресценции в воде в 1,3–1,4 раза.

Результаты определения МБК 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ в стандартных условиях представлены в таблице (см. ниже).

ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследования поглощения ФС свидетельствуют о невысокой степени их агрегации в изучаемом диапазоне концентраций [15], поскольку во всем диапазоне его концентраций форма и полуширина спектра полосы поглощения не изменяются, а поглощение линейно зависит от концентрации.

Анализ особенностей изменения формы спектральной полосы флуоресценции при увеличении концентрации и длины кюветы позволяет предположить, что наблюдаемые явления, происходящие при высокой концентрации изучаемого ФС, связаны преимущественно с перепоглощением; при этом имеет место и агрегация, но вклад ее незначителен. Об этом же свидетельствуют результаты изучения излучательного времени жизни возбужденного состояния ФС на основе 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ и зависимости интенсивности флуоресценции от концентрации 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ в дисперсии, особенно в плазме крови [17–21].

Эти данные позволяют сделать вывод, что эффективность фотодинамических процессов при высоких концентрациях 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ не будет снижаться и дает возможность использовать нанодисперсии 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ с такими концентрациями для сенсибилизации при АФДТ.

По сравнению с ФС на основе катионных бактериохлоринов, описанных ранее [14], 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ имеет значительно более низкие значения МБК для грамположительных бактерий *S. aureus* и грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* в планктонном состоянии. Низкие значения МБК получены также для грамотрицательных бактерий *K. pneumoniae*.

ВЫВОДЫ

Результаты исследований показывают, что исследуемый тетракатионный ФС на основе синтетического амфифильного производного бактериохлорина 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ с уменьшенными размером молекулы и молекулярной массой обладает высокой эффективностью фотодинамической инактивации грамположительных бактерий *S. aureus* и грамотрицательных бактерий *P. aeruginosa* и *K. pneumoniae*. Исследования фотофизических свойств ФС в широком диапазоне концентраций продемонстрировали его низкую агрегацию в воде и плазме крови. Результаты исследований позволяют сделать вывод, что ФС на основе наноструктурированной формы 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ перспективен для фотодинамического лечения локальных инфицированных очагов, вызванных грамположительными и грамотрицательными бактериями.

Таблица. Значения МБК для 3-$Py_4BCHp_4Br_4$ в стандартных условиях (время инкубации — 0,5 ч, доза облучения — 20 Дж/см^2)

Вид бактерий	*S. aureus*	*P. aeruginosa*	*K. pneumoniae*
Значения МБК, мкМ	0,2	6,2	3,1

Литература

1. Park YS, Lee HB, Chin S et al. Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems. Hosp Infect. 2011; 79 (1): 54–8. DOI: 10.1016/j.jhin.2011.05.014.
2. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori et al. Photosensitising activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. Microbios. 1992; 71 (286): 33–46.
3. Nakonieczna J, Michta E, Rybicka M et al. Superoxide dismutase is upregulated in Staphylococcus aureus following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment. BMC Microbiol. 2010; (10): 323. https://DOI.org/10.1186/1471-2180-10-323.
4. Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. Marine Drugs. 2010; 8 (1): 91–105. DOI: 10.3390/md8010091.
5. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease. Photochem Photobiol Sci. 2004; 3 (5): 436–50.
6. Vera DM, Haynes MH, Ball AR et al. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. Photochem Photobiol. 2012; 88 (3): 499–511. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01087.x.
7. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. Photochem Photobiol. 2015; 14 (8): 1518–26. DOI: 10.1039/c5pp00037h.
8. Almeida A, Cunha A, Faustino MAF et al. Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents. In: Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications. Hamblin MR, Jori G, editors. London: RSC Publishing, 2011; p. 83–160.
9. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. Antimicrob Chemother. 1998; 42 (1): 13–28.
10. Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, Hancock RE. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44 (8): 2086–92.
11. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barrier and active efflux. Science. 1994; 264 (5157): 382–8.
12. Moan J. Photochemistry and Photobiology. The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. 1984; (39): 445–9. Available from: https://DOI.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb03873.x.
13. Bjarnsholt Th, Jensen PO, Moser C, Hoiby N. Biofilm infections. Heidelberg: Springer, 2011.
14. Тиганова И. Г., Макарова Е. А., Меерович Г. А., Алексеева Н. В., Толордава Э. Р., Жижимова Ю. С. и др. Фотодинамическая инактивация патогенных бактерий в биопленках с использованием новых синтетических производных бактериохлорина. Biomedical Photonics. 2017; 6 (4): 27–36. Доступно по ссылке: https://DOI.org/10.24931/2413-9432-2017-6-4-27-36.
15. Макаров Д. А., Кузнецова Н. А., Южакова О. А., Савина Л. П., Калия О. Л., Лукьянец Е. А. и др. Поликатионные фталоцианины цинка и алюминия: синтез, влияние степени замещения на физико-химические свойства и фотодинамическую активность в водной среде. Журнал физической химии. 2009; 83 (6): 1183–90.
16. Быстров Ф. Г., Макаров В. И., Поминова Д. В., Рябова А. В., Лощенов В. Б. Исследование кинетики затухания фотолюминесценции молекулярных нанокристаллов фталоцианина алюминия при взаимодействии с иммунокомпетентными клетками. Biomedical Photonics. 2016; 5 (1): 3–8. Доступно по ссылке: https://DOI.org/10.24931/2413-9432-2016-5-1-3-8.
17. Juzenas P, Juzeniene A, Rotomskis R, Moan J. Spectroscopic evidence of monomeric aluminium phthalocyanine tetrasulphonate in aqueous solutions. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2004; 75 (1–2): 107–10. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2004.05.011.
18. Dhami S, Phillips D. Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminium phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 1996; 100 (1–3): 77–84.
19. Reddi E, Jori G. Reviews of Chemical Intermediates. 1988; (10): 241–68. Available from: https://DOI.org/10.1007/BF03155995
20. Tominaga TT, Yusbmanov VE, Borissevitch IE, Imasato H, Tabak M. Aggregation phenomena in the complexes of iron tetraphenylporphine sulfonate with bovine serum albumin. Journal of Inorganic Biochemistry. 1997; (65): 235–44.
21. Changenet-Barret P, Gustavsson T, Markovitsi D, Manet I, Monti S. Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. Physical Chemistry Chemical Physics. 2013; 15 (8): 2937–44.

References

1. Park YS, Lee HB, Chin S et al. Acquisition of extensive drug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* among hospitalized patients: risk factors and resistance mechanisms to carbapenems. Hosp Infect. 2011; 79 (1): 54–8. DOI: 10.1016/j.jhin.2011.05.014.
2. Bertoloni G, Rossi F, Valduga G, Jori et al. Photosensitising activity of water- and lipid-soluble phthalocyanines on prokaryotic and eukaryotic microbial cells. Microbios. 1992; 71 (286): 33–46.
3. Nakonieczna J, Michta E, Rybicka M et al. Superoxide dismutase is upregulated in Staphylococcus aureus following protoporphyrin-mediated photodynamic inactivation and does not directly influence the response to photodynamic treatment. BMC Microbiol. 2010; (10): 323. https://DOI.org/10.1186/1471-2180-10-323.
4. Tavares A, Carvalho CMB, Faustino MA et al. Antimicrobial photodynamic therapy: study of bacterial recovery viability and potential development of resistance after treatment. Marine Drugs. 2010; 8 (1): 91–105. DOI: 10.3390/md8010091.
5. Hamblin MR, Hasan T. Photodynamic therapy: a new antimicrobial approach to infectious disease. Photochem Photobiol Sci. 2004; 3 (5): 436–50.
6. Vera DM, Haynes MH, Ball AR et al. Strategies to potentiate antimicrobial photoinactivation by overcoming resistant phenotypes. Photochem Photobiol. 2012; 88 (3): 499–511. DOI: 10.1111/j.1751-1097.2012.01087.x.
7. Maisch T. Resistance in antimicrobial photodynamic inactivation of bacteria. Photochem Photobiol. 2015; 14 (8): 1518–26. DOI: 10.1039/c5pp00037h.
8. Almeida A, Cunha A, Faustino MAF et al. Porphyrins as antimicrobial photosensitizing agents. In: Photodynamic Inactivation of Microbial Pathogens: Medical and Environmental Applications. Hamblin MR, Jori G, editors. London: RSC Publishing, 2011; p. 83–160.
9. Wainwright M. Photodynamic antimicrobial chemotherapy. Antimicrob Chemother. 1998; 42 (1): 13–28.
10. Friedrich CL, Moyles D, Beveridge TJ, Hancock RE. Antibacterial action of structurally diverse cationic peptides on Gram-positive bacteria. Antimicrob Agents Chemother. 2000; 44 (8): 2086–92.
11. Nikaido H. Prevention of drug access to bacterial targets: Permeability barrier and active efflux. Science. 1994; 264 (5157): 382–8.
12. Moan J. Photochemistry and Photobiology. The photochemical yield of singlet oxygen from porphyrins in different states of aggregation. 1984; (39): 445–9. Available from: https://DOI.org/10.1111/j.1751-1097.1984.tb03873.x.
13. Bjarnsholt Th, Jensen PO, Moser C, Hoiby N. Biofilm infections. Heidelberg: Springer, 2011.
14. Tiganova IG, Makarova EA, Meerovich GA, Alekseeva NV, Tolordava ER, Zhizhimova YS et al. Photodynamic inactivation of pathogenic bacteria in biofilms using new synthetic bacteriochlorin

derivatives. Biomedical Photonics. 2017; 6 (4): 27–36. Russian. Available from: https://DOI.org/10.24931/2413-9432-2017-6-4-27-36.

15. Makarov DA, Kuznetsova NA, Yuzhakova OA, Savina LP, Kaliya OL, Lukyanets EA et al. Effects of the degree of substitution on the physicochemical properties and photodynamic activity of zinc and aluminum phthalocyanine polycations. Russian Journal of Physical Chemistry A. 2009; 83 (6): 1044–50.
16. Bystrov FG, Makarov VI, Pominova DV, Ryabova AV, Loschenov VB. Analysis of photoluminescence decay kinetics of aluminum phthalocyanine nanoparticles interacting with immune cells. Biomedical Photonics. 2016; 5 (1): 3–8. Russian. Available from: https://DOI.org/10.24931/2413-9432-2016-5-1-3-8.
17. Juzenas P, Juzeniene A, Rotomskis R, Moan J. Spectroscopic evidence of monomeric aluminium phthalocyanine tetrasulphonate in aqueous solutions. Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology. 2004; 75 (1–2): 107–10. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2004.05.011.
18. Dhami S, Phillips D. Comparison of the photophysics of an aggregating and non-aggregating aluminium phthalocyanine system incorporated into unilamellar vesicles. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 1996; 100 (1–3): 77–84.
19. Reddi E, Jori G. Reviews of Chemical Intermediates. 1988; (10): 241–68. Available from: https://DOI.org/10.1007/BF03155995
20. Tominaga TT, Yusbmanov VE, Borissevitch IE, Imasato H, Tabak M. Aggregation phenomena in the complexes of iron tetraphenylporphine sulfonate with bovine serum albumin. Journal of Inorganic Biochemistry. 1997; (65): 235–44.
21. Changenet-Barret P, Gustavsson T, Markovitsi D, Manet I, Monti S. Unravelling molecular mechanisms in the fluorescence spectra of doxorubicin in aqueous solution by femtosecond fluorescence spectroscopy. Physical Chemistry Chemical Physics. 2013; 15 (8): 2937–44.

НАНОЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

П. Б. Курапов[1]✉, Е. Ю. Бахтенко[2]

[1] Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва
[2] Вологодский государственный университет, Вологда

Химическая стабильность, низкая токсичность, относительная простота методов синтеза и модификации наночастиц (НЧ) золота способствуют их использованию в различных областях биомедицины, таких как диагностика *in vitro*, адресная доставка лекарств, фототермическая и фотодинамическая терапия. Высокое соотношение площади поверхности к объему этих НЧ существенно облегчает создание на их основе комплексных наноплатформ, используемых сразу в нескольких терапевтических и диагностических направлениях. Уникальные электрические и оптические свойства НЧ золота, известные как локализованный поверхностный плазмонный резонанс особенно актуальны для диагностики различных заболеваний. Рассмотрены основные методы синтеза и модификации НЧ золота, в частности методами «зеленой химии», фармакологические аспекты их применения и использования в качестве диагностических агентов. По нашему мнению, именно благодаря своим уникальным свойствам наноплатформы для адресной доставки лекарственных препаратов и тераностики, созданные на основе НЧ золота, имеют неоспоримые преимущества перед другими типами наночастиц.

Ключевые слова: наночастицы золота, нанодиагностика, нанотерапия, адресная доставка лекарственных средств, тераностика, онкология

✉ **Для корреспонденции:** Павел Борисович Курапов
ул. Островитянова, д. 1, г. Москва, 117997; kurapoff@mail.ru

Статья получена: 29.11.2018 **Статья принята к печати:** 18.12.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.090

GOLD NANOPARTICLES IN THE DIAGNOSIS AND TREATMENT OF CANCER

Kurapov PB[1]✉, Bakhtenko EYu[2]

[1] Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow
[2] Vologda State University, Vologda

Due to chemical stability, low toxicity, and relative simplicity of synthesis/modification techniques, gold nanoparticles (NP) enjoy a wide range of biomedical applications, including *in vitro* diagnostics, targeted drug delivery, contrast-enhanced radiation therapy, and photothermal therapy. The high ratio of the gold NP surface area to their volume facilitates design of complex nanoplatforms for various therapeutic and diagnostic purposes. Unique electrical and optical properties of gold NP known as surface plasmon resonance assist medical diagnosis. In this work we look at the basic methods for gold NP synthesis and modification, including the so-called green chemistry, talk about the pharmacological aspects of their application and highlight their potential as diagnostic agents. We believe that due to their unique properties, gold-based nanoplatforms for targeted drug delivery and theranostics have indisputable advantages over other nanoparticles.

Keywords: gold nanoparticles, nanodiagnostics, nanotherapy, targeted drug delivery, theranostics, cancer research

✉ **Correspondence should be addressed:** Pavel B. Kurapov
Ostrovityanova 1, Moscow, 117997; kurapoff@mail.ru

Received: 29.11.2018 **Accepted:** 18.12.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.090

Началом применения наночастиц (НЧ) золота в биомедицине можно считать работу, в которой конъюгированные с коллоидным золотом антитела использовали для прямой микроскопической визуализации поверхностных антигенов сальмонеллы [1]. В настоящее время это направление сформировалось в отдельную самостоятельную отрасль знаний, включающую в себя использование НЧ золота в биомедицинских исследованиях, диагностике, биосенсорах, фототермической и фотодинамической терапии, а также в адресной доставке лекарств и генетических материалов [2].

Интерес исследователей к НЧ золота постоянно растет, увеличивается количество научных публикаций, посвященных этой теме (рис. 1).

По строению и использованию НЧ золота можно разделить на две большие группы. Первая включает в себя конъюгаты НЧ с молекулярными структурами, обладающими самыми разнообразными функциями и свойствами. Такие структуры используют, например, для адресной доставки и контролируемого высвобождения противораковых лекарственных средств [3], локальной гипертермии опухолей [4], а также для оптической визуализации и создания сенсоров [5]. Важным при использовании НЧ золота для целей биомедицины являются хорошо разработанные способы синтеза, а также простота и надежность методов модификации их поверхности. Существующие методики позволяют легко присоединять к поверхности НЧ золота олигонуклеотиды, пептиды и полиэтиленгликоль.

Ко второй группе следует отнести полые НЧ с диэлектрическим или магнитным ядром и золотой оболочкой. Такие структуры используют для инкапсуляции лекарственных препаратов. Размеры НЧ золота могут

меняться от 20 до 500 нм, что позволяет легко оптимизировать их биораспределение в условиях пассивной адресной доставки. Главным достоинством таких многослойных частиц является их полифункциональность, которая реализуется за счет разделения функций ядра и оболочки.

НЧ золота имеют повышенное сечение поглощения и рассеивания света, а характер их спектра поглощения зависит от размера и формы. Например, сферические НЧ Au^0 диаметром 10–25 нм поглощают в области 520 нм, а золотые наностержни — в ближнем ИК-диапазоне. Эту их особенность можно использовать для диагностики и терапии *in vivo*.

Модифицированные НЧ золота обладают низкой иммуногенностью и высокой биосовместимостью. Такие частицы размером 10–22 нм можно использовать в качестве носителя для доставки вакцин [6]. Показано, что НЧ Au^0 усиливают иммунный ответ *in vivo*, особенно в отношении вирусных инфекций — клещевого энцефалита, ВИЧ и гепатита В.

Благодаря уникальным электрическим и оптическим свойствам и способности образовывать прочные комплексы с биомолекулами НЧ золота активно используют при конструировании биосенсоров. Так, были сконструированы ДНК-биосенсоры на основе оксида графена, модифицированного ночастицами Au^0, для обнаружения ряда биомаркеров, в том числе белка, локализованного на поверхности клеток рака молочной железы.

Известно, что концентрация человеческого С-реактивного белка плазмы крови повышается при воспалении. Этот белок используют в клинической диагностике как индикатор многих болезней, в том числе при сердечно-сосудистых заболеваниях [7, 8]. Была разработана методика электрохимического определения в плазме крови специфического биомаркера повреждения ткани миокарда (тропонин I) по регистрации сигнала НЧ Au^0, локализованных на поверхности электрода [9].

Методы синтеза НЧ золота

НЧ золота синтезируют с помощью двух основных методик — дисперсионной или конденсационной. Диспергирование, как правило, происходит за счет жесткого физического воздействия на металл, например, с использованием электрического тока высокого напряжения. При конденсационных методах НЧ восстановленного металла образуются из ионов соответствующих солей путем мягкого физического (радиолиз, воздействие ультразвуком и др.) или химического воздействия [2]. Основным недостатком дисперсионных методов является образование неоднородных по величине частиц. По этой причине конденсационные способы синтеза НЧ золота в настоящее время наиболее распространены.

Конденсационный синтез НЧ Au^0 основан на получении коллоидных частиц диаметром 5–20 нм из галогенидов золота, в частности из тетрахлороаурата водорода, образующегося при растворении золота в царской водке. В качестве химических восстановителей используют цитрат или боргидрид натрия, аскорбиновую или этилендиаминтетрауксусную кислоты, а также щелочной раствор перекиси водорода. Для получения ультрадисперсных золей (диаметр частиц 2–3 нм) используют тиоцианат натрия или калия.

Скорость образования НЧ зависит от концентрации реагирующих веществ и химической природы восстановителя. При низкой скорости возникновения зародышей и достаточно высокой скорости конденсации частиц образуется относительно малое количество сравнительно крупных частиц. При малой скорости конденсации увеличивается вероятность образования большого количества частиц относительно малого размера.

Для получения НЧ золота размерами 8–120 нм, которые преимущественно и используются для медицинских целей, наиболее распространен метод цитратного восстановления тетрахлороаурата водорода, разработанный для получения НЧ золота со средним диаметром 20 ± 1,5 нм [10]. Крупные НЧ золота диаметром более 80 нм можно синтезировать конденсационным методом с использованием в качестве восстановителя изоаскорбиновой кислоты в присутствии защитного коллоида гуммиарабика.

Для получения монодисперсных золей НЧ золота иногда используют метод двухфазного синтеза. На первой стадии металлсодержащие реагенты переводят из водной фазы в органическую (гексан, толуол), к которой затем добавляют растворы поверхностно-активных веществ и восстановителя. В качестве восстановителя можно использовать бутанол, а в качестве модификатора поверхности нанокластеров применяют гексадециламин, который координирует аминогруппа по поверхности металла, оставляя снаружи неполярные углеводородные радикалы. Использование двухфазных технологий позволяет получать монодисперсные золи золота [11].

Тип восстановителя влияет не только на размер, но и на форму частиц золота. Например, при использовании лимоннокислого натрия или пероксида водорода получаются сферические частицы, а при восстановлении гидроксиламином — хорошо ограненные кубические кристаллы с гранями [12].

Рис. 1. Рост числа научных публикаций по биомедицинскому использованию НЧ золота в период с 2002 по 2017 г., по данным сайта PubMed.com

Для стабилизации НЧ золота используют тиолы и дисульфиды. Высокое сродство серы к золоту служит причиной образования на поверхности НЧ монослоя тиолята золота. Кроме химических методов для восстановления галогенидов золота применяют и физические методы, основанные на использовании ультразвука, ультрафиолетового или инфракрасного (ИК) ионизирующих излучений, а также лазерного фотолиза и электрохимии. Преимущество этих методик состоит в том, что на поверхности образующихся НЧ отсутствуют примесные остатки химических реагентов.

Новым направлением в нанобиотехнологии стало использование для синтеза НЧ золота микроорганизмов, а также клеток растений, животных и человека. В его основе лежат принципы так называемой «зеленой химии» [13, 14]. На наш взгляд, методы «зеленой химии», применяемые для синтеза НЧ золота, — уникальная возможность использования этой прогрессивной технологии. Следует заметить, что подобные подходы практически не применяются для синтеза других типов наночастиц.

Недавно был опубликован обзор данных по синтезу металлических НЧ с использованием растительных экстрактов [15]. Растения содержат определенные биологически активные соединения, такие как флавоноиды, фенолы, лимонная и аскорбиновая кислоты, полифенолы, терпены, алкалоиды и редуктазы, которые играют роль восстановителей [16]. Биотехнологический синтез НЧ имеет определенные преимущества перед химическими методами, поскольку растительные экстракты выступают в роли не только восстановителя, но и в качестве стабилизирующих и изолирующих агентов (таблица).

Растения могут синтезировать НЧ как внутриклеточно, так и внеклеточно [23]. Внутриклеточные методы синтеза НЧ включают выращивание растения на богатых металлом органических средах (клеточная, тканевая инженерия, гидропоника) или почвах [24]. Внеклеточные методы синтеза НЧ основаны на использовании листового экстракта [25]. Синтезированные с помощью биотехнологических методик НЧ золота имеют различные размеры и формы: сферические, стержневые, кубические, треугольные.

Сообщается о простом, экономичном и воспроизводимом синтезе сферических и почти монодисперсных НЧ золота размером 20 нм с использованием экстракта свежих или сухих листьев манго (*Mangifera indica*). НЧ были получены в течение 2 мин добавления экстракта к раствору $HAuCl_4 \cdot 3H_2O$, при этом коллоидный раствор оставался стабильным более 5 месяцев. Меньшие по размеру и равномерно распределенные частицы могут быть получены с высушенным лиственным экстрактом [26].

Размер синтезируемых методами зеленой химии НЧ золота зависит от того, какой экстракт используется в качестве восстанавливающего и стабилизирующего агента. Так, например, экстракт из листьев оливкового дерева позволяет получить НЧ Au^0 размером 50–100 нм, экстракт герани образует частицы размером около 12 нм, а вытяжка из листьев белой ивы — 50–80 нм [26]. Экстракты, полученные из других органов (пыльцы, семян, соцветий, коры и корней) растений, также можно использовать для успешного синтеза НЧ золота [27]. Описан метод синтеза НЧ золота с использованием хитозана в качестве восстановителя и стабилизирующего агента. Положительно заряженные частицы, содержащие хитозан, были использованы для снижения побочных эффектов противоракового препарата 5-фторурацила [28].

Сферические НЧ Au^0 формируются из коллоидных растворов при восстановлении $HAuCl_4$. На первом этапе синтеза происходит быстрое восстановление части тетрахлороаурата водорода с образованием перенасыщенного раствора восстановленного золота. Затем восстановление резко замедляется и происходит конденсация новой фазы с образованием очень мелких зародышевых НЧ диаметром менее 2 нм. Скорость образования зародышей новой фазы зависит от степени насыщенности раствора, а также от концентрации и химической природы восстановителя. При низкой скорости возникновения зародышей и высокой скорости конденсации частиц образуется малое количество сравнительно крупных частиц. Более высокая скорость возникновения зародышей и малая степень конденсации частиц увеличивает вероятность образования большого количества НЧ малого размера.

Для целенаправленного получения несферических коллоидных НЧ золота необходимо создать искусственно анизотропные условия роста. Для этого НЧ синтезируют электрохимическим методом на жестких матрицах оксида кремния или алюминия [29]. Наностержни получают методом восстановления на мягких матрицах, представляющих собой мицелярный раствор поверхностно-активных веществ.

В последние годы активно развивается наномедицина ультрамалых НЧ размером менее 6 нм. Малые золотые наностержни (диаметр < 6 нм) обладают такими же оптическими и электронными свойствами, как и крупные наностержни, но лишены их недостатков при использовании в биомедицинских целях [30]. Нанонити золота могут быть получены после термообработки НЧ золота, адсорбированных на поверхности нанотрубок. Удалением остатков нанотрубок нагреванием могут быть изготовлены золотые трубчатые нити с внешним диаметром

Таблица. Растительные экстракты для синтеза НЧ золота

Традиционное название растения	Латинское название растения	Часть растения, которую использовали для приготовления экстракта	Диаметр НЧ золота, нм	Литература
Герань душистая	*Pelargonium graveolens*	Листья	45	[17]
Вербена лимонная	*Lippia citriodora*	Листья	36	[17]
Шалфей лекарственный	*Salvia officinalis*	Листья	29	[17]
Гранат обыкновенный	*Punica granatum*	Плоды	32	[17]
Змееголовник	*Dracocephalum kotschyi*	Листья	11	[18]
Корица	*Cinnamomum zeylanicum*	Листья	25	[19]
Помело	*Citrus maxima*	Плоды	15–35	[20]
Черемуха поздняя	*Prunus serotina*	Соцветия	10–20	[21]
Финиковая пальма	*Phoenix dactylifera*	Пыльца	20–50	[22]

порядка 10 нм. Молекулу ДНК также можно использовать как матрицу при синтезе нанонитей.

Сферические золотые нанооболочки представляют собой тонкий слой золота на диэлектрическом ядре диаметром до 100 нм. Оптические свойства таких частиц могут быть настроены путем варьирования диаметра ядер и толщины оболочки. Золотые нанооболочки весьма перспективны в качестве диагностических и терапевтических инструментов в медико-биологических исследованиях. Предложенный в одной из работ способ получения нанооболочек состоит из четырех основных этапов: сначала получают сферические силикатные ядра, затем их поверхность функционализуют аминогруппами, на которых адсорбируются частицы золота [31].

Для контроля над физико-химическими характеристиками синтезируемых НЧ, определения их среднего диаметра и формы традиционно используют электронную микроскопию и спектрофотометрию. Для определения размеров НЧ применяют также метод лазерной корреляционной спектроскопии (или метод динамического рассеяния света). Реже для характеристики частиц и конъюгатов используют дифференциальное центрифугирование, сканирующую и атомно-силовую микроскопию, угловое рентгеновское рассеяние, масс-спектроскопию, рентгеновскую дифракцию и другие методы.

Методы модификации поверхности НЧ золота

К основным способам модификации поверхности НЧ Au^0 относят адсорбционный и хемосорбционный. Стабилизация НЧ биомолекулами происходит при адсорбции полимера на поверхности НЧ за счет электростатических и гидрофобных взаимодействий. Сильный отрицательный заряд поверхности частиц золота обеспечивает их прочное адсорбционное взаимодействие со многими высокомолекулярными соединениями.

С целью повышения биосовместимости НЧ Au^0 или формирования на их основе специальных платформ для диагностики и терапии поверхность НЧ необходимо модифицировать (функционализировать) покрытиями, слоями или связками. Возможность модифицировать поверхность НЧ контролируемым образом на молекулярном уровне необходима для придания им специфичности, чувствительности и биологической совместимости.

НЧ золота могут взаимодействовать с иммуноглобулинами, лектинами, ферментами, гормонами, липопротеидами и т. д. Использование НЧ золота в качестве своеобразных транспортных средств имеет многочисленные преимущества. Повышается растворимость препаратов, лекарства защищены от деструкции во время переноса к месту назначения; НЧ могут активно или пассивно накапливаться в органе-мишени, и контролируемо высвобождать переносимые лекарства. Особые магнитные и фототермические свойства НЧ золота расширяют спектр терапевтических методик, снижают эффективную дозу препарата и его токсичность.

Методы модификации поверхности НЧ Au^0 могут быть ковалентными и нековалентными. Преимущество нековалентных взаимодействий состоит в том, что при создании таких НЧ не требуется структурных модификаций терапевтических препаратов, а легкое высвобождение лекарственных средств служит предпосылкой для эффективной терапии. Заряженные или гидрофильные группы, аккумулированные на поверхности наноструктур, повышают их растворимость и облегчают взаимодействие с биомолекулами. Покрытие НЧ Au^0 амфифильными полимерами повышает их растворимость и способствует неспецифическим взаимодействиям с биомакромолекулами, повышается совместимость наноструктур с белками и сродство к клеточной мембране. Применение полиэтиленгликоля для модификации поверхности НЧ золота значительно увеличивает эффективность клеточного поглощения в сравнении с немодифицированными НЧ, предотвращает агрегацию НЧ в среде с высокой ионной силой и поддерживает более длительную циркуляцию частиц в *in vivo*.

Модификация поверхности НЧ Au^0 увеличивает продолжительность их жизни в кровеносной системе и способствует лучшему проникновению через стенки сосудов в клетки мишени. Модифицированные НЧ взаимодействуют с молекулами лекарственного средства и снижают его цитотоксичность. Наиболее распространенный метод модификации поверхности НЧ золота — тиолирование. Это применение бифункциональных тиолов, дополнительная функциональная группа которых используется для конъюгации с биомолекулами. В качестве стабилизатора поверхности НЧ золота можно использовать модифицированный декстран. Подобные структуры очень привлекательны благодаря возможности обратимого изменения их свойств в зависимости от температуры или уровня pH.

Подробно изложена молекулярная модификация золотых наноматериалов с использованием самоорганизованных монослоев или сложных молекулярных агрегатов [32]. Известно еще множество функциональных молекулярных линков, которые могут быть использованы для модификации поверхности НЧ, например арилдиазониевые соли [33, 34].

Наночастицы золота для диагностики и терапии

Впервые ауротерапия артритов была применена еще в 1929 г. Механизм ее действия основан на способности соединений золота, введенных в организм, угнетать макрофаги, тормозя тем самым развитие последующих патологических иммунных реакций.

Золотые «наностержни» активно поглощают излучение в ближнем ИК-диапазоне, для которого человеческое тело относительно прозрачно. Это делает их оптимальными для фототермальной терапии — избирательного разрушения патогенных агентов нагреванием. Например, НЧ золота применяют для уничтожения внутриклеточных паразитов *Toxoplasma gondii*, вызывающих токсоплазмоз. Для этого используют НЧ золота в комплексе с антителами. Антитело позволяет НЧ селективно связываться с мишенью, а затем под воздействием лазерного ИК-излучения НЧ нагреваются, что и приводит к гибели до 83% токсоплазм.

НЧ золота начали применять в онкологии сравнительно недавно. Повышенный интерес исследователей к этим частицам связан с наличием у них уникальных оптических и электронных свойств (поверхностного плазмонного резонанса). Эти особые свойства, позволят осуществить революционный прорыв в диагностике и лечении онкологических заболеваний. Интегрирование в одну систему диагностических и терапевтических функций (терраностика) позволяет контролировать терапевтические реакции, что существенно облегчает как диагностику, так и терапию [35].

На поверхности многих раковых клеток экспрессирован специфический белок — рецептор эпидермального фактора роста (EFGR), который можно использовать

в качестве маркера для диагностики и терапии онкологических заболеваний. Селективность действия НЧ на опухолевые ткани может быть также связана с особенностями строения и роста клеток опухоли. Раковые клетки растут достаточно быстро, и между ними и в их оболочке образуются значительные полости (эффект повышенной проницаемости и удерживания, EPR-effect), что облегчает проникновение НЧ непосредственно в клетку. Повышенная кислотность внутри опухолевой клетки также способствует адресной и своевременной выгрузке лекарств внутри пораженного органа.

После связывания НЧ с опухолевыми клетками пораженный орган облучают ИК-лазером малой мощности. ИК-излучение лазера поглощается НЧ золота, которые в ответ генерируют ультразвуковые и тепловые волны. Ультразвуковое излучение используют для диагностики (фотоакустическое наблюдение), а тепловые волны — для фототермальной терапии. Локальный нагрев вызывает адресное высвобождение лекарственных препаратов, заключенных в золотую капсулу [36].

Золотые наностержни можно также использовать для фотоакустической диагностики, однако максимальный эффект в таргетной терапии рака обеспечивают звездообразные НЧ золота размером около 25 нм с 5–10 остроконечными лучами. Высокая площадь поверхности таких НЧ позволяет увеличить загрузки лекарственных средств, а их остроконечная форма способствует активному поглощению света, обеспечивая адресную выгрузку связанных терапевтических агентов.

Биосовместимые НЧ золота, модифицированные молекулами, которые способны селективно взаимодействовать с раковыми клетками, — идеальное средство для гипертертермического лечения опухолей [37].

Ингибирование наночастицами золота образования метастазов путем повышения жесткости ядерных мембран раковых клеток

По мере роста опухоли раковые клетки часто образуют метастазы и распространяются в близлежащие ткани и органы, поэтому для терапии онкологических заболеваний необходимо снизить миграцию и инвазию раковых клеток. Модификация НЧ Au^0 лигандами, состоящими из L-аргинина, глицина и L-аспарагиновой кислоты (RGD-пептид), и пептидами сигнала ядерной локализации (NLS-пептид) позволила получить препарат для увеличения жесткости ядерных оболочек раковых клеток. Препарат стимулировал избыточную экспрессию белков ламина A/C и снижал способность раковых клеток к метастазированию. Свободный RGD-пептид часто используют в клеточной биологии и биотехнологии благодаря его свойству ингибировать межклеточные связи [38]. Эффективное ограничение образования метастазов оставляет больше времени для борьбы с онкологическим заболеванием [39].

НЧ золота как платформы для молекулярной диагностики и лечения онкологических заболеваний

В клинической практике постановка диагноза и лечение обычно разделены. Тем не менее интеграция диагностики и лечения (тераностика), сочетающая в себе весь спектр медицинских услуг (от ранней диагностики заболеваний, до терапии и последующего мониторинга лечения), может быть чрезвычайно полезной при терапии онкологических заболеваний. Тераностика — это сочетание специфической целевой терапии и целевых диагностических тестов с использованием так называемых наноплатформ.

При конструировании таких платформ НЧ Au^0 по сравнению с другими носителями имеют существенные преимущества, связанные с их уникальными оптическими характеристиками, высокой эффективностью фототермической конверсии и значительным коэффициентом поглощения рентгеновских лучей. Поглощенная частицей золота энергия частично излучается в виде рассеянного света, а частично превращается в тепло. Таким образом, НЧ золота можно одновременно использовать как в аналитическом (диагностическом) варианте, так и для терапии опухолей методом оптической гипертермии. Изменение размера НЧ позволяет варьировать аналитический и терапевтический параметры.

В ряде работ показано, что оптимальными для этих целей является НЧ золота размером около 13 нм. Они имеют высокую контрастность в компьютерной томографии и рентгенографии и могут с успехом использоваться для создания тераностических платформ [40–42].

Фототермическая терапия

Традиционная химиотерапия — это системное лечение, влияющее на весь организм. Химиотерапевтические препараты влияют на организм в целом и вызывают серьезные неблагоприятные побочные эффекты. НЧ Au^0 прекрасно подходят для создания биосовместимых и высокоэффективных фототермических платформ, которые могут поглощать и эффективно преобразовывать ближний ИК-свет в тепло. Такие частицы вызывают локальное повышение температуры и фототермически разрушают опухолевые клетки (оптическая гипертермия) [43].

Китайскими учеными созданы комплексные тераностические наноплатформы, которые способны одновременно выполнять диагностику опухоли и ее уничтожение. Внутри полых золотых НЧ находится оксид железа, обладающий парамагнитными свойствами, а на их поверхности закреплены антитела для определенного вида раковых клеток. В организм пациента НЧ вводят путем инъекции. Их перемещение можно отслеживать с помощью компьютерной томографии в режиме реального времени благодаря оксиду железа, который введен в состав НЧ. Локализованные в опухоли НЧ под действием ИК-излучения нагреваются, уничтожая раковые клетки (оптическая гипертермия; см. выше) [44].

На основе известного противоракового препарата доксорубицина и НЧ золота, загруженных в термочувствительные липосомы, созданы наноплатформы, позволяющие уничтожать раковые клетки как термическим воздействием, так и за счет инкапсулированного доксорубицина, который высвобождается непосредственно в опухолевые клетки под действием ИК-излучения. При этом локальная концентрация препарата увеличивается вместе с распадом липосомной мембраны [45].

В настоящее время уже два лекарственных препарата с внутривенным способом введения (AurImmune™ и AuroLase™) прошли клиническую апробацию [46, 47].

Терапевтическое действие НЧ Au^0 основано на эффекте сужения кровеносных сосудов опухоли и остановке процесса образования новых кровеносных сосудов в пораженных органах или тканях (ангиогенеза). В норме в организме процессы ангиогенеза протекают с умеренной интенсивностью и активизируются только при регенерации поврежденных тканей, закупорке тромбов,

ликвидации очагов воспаления, образовании рубца и других процессах восстановления, а также при росте и развитии организма. В опухолевых же тканях, особенно в тканях злокачественных опухолей, ангиогенез протекает постоянно и очень интенсивно, при этом клетки хорошо снабжаются кровью, получают больше питательных веществ и быстро растут.

Большинство существующих ингибиторов ангиогенеза являются антителами к фактору роста эндотелия сосудов (VEGF). НЧ золота блокируют функцию VEGF, не оказывая токсического воздействия на клетки, что является неоспоримым преимуществом перед существующими ингибиторами ангиогенеза, у которых есть серьезные побочные эффекты [48].

Радиоактивное золото и его применение в онкологии

Для лечения онкологических заболеваний используют коллоидные растворы радиоактивного золота. В медицине применяют Au^0, обогащенное искусственным радиоактивным изотопом ^{198}Au, который получают при нейтронном облучении природного изотопа Au^0. Период полураспада ^{198}Au составляет менее трех дней. Наличие β- и γ-излучений позволяет создавать высокие тканевые дозы излучения и легко детектировать места локализации изотопа. Главной особенностью коллоидных растворов радиоактивного золота является их избирательное депонирование в клетках ретикулоэндотелиальной системы и на структурах соединительной ткани, что позволяет применять эти частицы и для диагностических, и для терапевтических целей. В радиоизотопной диагностике эффективны коллоидные растворы с концентрацией НЧ Au^0 3–6 мг/мл и размером 10–30 нм.

С лечебной целью применяют коллоидные растворы НЧ Au^0, как с однородной дисперсностью, так и полидисперсные. Радиоактивная концентрация вводимого препарата не должна превышать 4 мкюри/мл, что достигается разведением исходного препарата 0,25–0,5%-ми растворами новокаина или хлорида натрия.

ВЫВОДЫ

Благодаря бурному развитию технологий химического синтеза НЧ золота в распоряжении исследователей имеется огромное разнообразие частиц по размеру, форме, структуре и оптическим свойствам. Для применения в медицине важна разработка эффективных технологий модификации НЧ золота различными молекулами, которые обеспечивают стабилизацию НЧ в условиях *in vivo* и адресное взаимодействие с биологическими мишенями. На сегодняшний день лучшими стабилизаторами принято считать тиолированные производные полиэтиленгликоля и иных молекул. Модифицированные полиэтиленгликолем частицы дольше циркулируют в кровотоке и менее подвержены атаке клеточных компонентов иммунной системы. Сегодня уже общепризнано, что конъюгаты НЧ золота являются отличными метками для клинической диагностики рака, болезни Альцгеймера, СПИДа, гепатита, туберкулеза, сахарного диабета и других заболеваний. Плазмонная фототермическая лазерная терапия рака с помощью НЧ золота перешла в стадию клинической апробации. Реальные клинические успехи этой технологии будут зависеть от того, как быстро удастся разработать надежные методы адресной доставки НЧ к опухолям внутри организма и усовершенствовать методы контроля процесса фототермолиза *in situ*. Создание диагностических и терапевтических платформ для адресной доставки лекарственных средств на основе НЧ золота, особенно с учетом использования для их синтеза «зеленых» технологий, является, на наш взгляд, наиболее перспективным направлением нанобиомедицины.

Литература

1. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. Immunochemistry. 1971; 8 (11): 1081–3.
2. Dykman L, Khlebtsov N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications. CRS Press, 2018; 331 p.
3. Sukhorukov GB, Rogach AL, Zebli B, Liedl T, Skirtach AG, Köhler K et al. Nanoengineered polymer capsules: tools for detection, controlled delivery, and site-specific manipulation. Small. 2005; 1 (2): 194–200.
4. Xia Y, Li W, Cobley CM, Chen J, Xia X, Zhang Q et al. Gold nanocages: from synthesis to theranostic applications. Acc Chem Res. 2011; 44 (10): 914–24.
5. Zharov VP, Kim JW, Curiel DT, Everts M. Self-Assembling Nanoclusters in Living Systems: Application for Integrated Photothermal Nanodiagnostics and Nanotherapy. Nanomed Nanotechnol Biology and Medicine. 2005; 1 (4): 326–45.
6. Kang S, Ahn S, Lee J, Kim JY, Choi M, Gujrati V et al. Effects of gold nanoparticle-based vaccine size on lymph node delivery and cytotoxic T-lymphocyte responses. J Control Release. 2017; (256): 56–67.
7. Fan L, Fang L, Yongtao Y, Yu W, Weiqun T. Strategies on Nanodiagnostics and Nanotherapies of the Three Common Cancers. Nanomaterials. 2018; 8 (4): 202.
8. Antonio M, Nogueira J, Vitorino R, Daniel-da-Silva AL. Functionalized Gold Nanoparticles for the Detection of C-Reactive Protein. Nanomaterials. 2018; 8 (4): 200.
9. Шумков А. А., Супрун Е. В., Шумянцева В. В., Арчаков А. И. Сенсорный элемент на основе наночастиц золота для определения кардиомаркеров. Биомедицина. 2011; (3): 46–9.
10. Turkevich J, Stevenson PC, Hiller JA. Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc. 1951; (11): 55–75.
11. Hirai H, Aizawa H. Preparation of stable dispersions of colloidal gold in hexanes by phase transfer. J Colloid Interface Sci. 1993; (161): 471–4.
12. Михайлов М. Д. Химические методы получения наночастиц и наноматериалов. Санкт-Петербург, 2012; 260 с.
13. Anshup A, Venkataraman JS et al. Growth of gold nanoparticles in human cells. Langmuir. 2006; 21 (25): 11562–7.
14. Santhoshkumar J, Rajeshkumar S, Venkat KS. Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles. Biochemistry and Biophysics Reports. 2017; (11): 46–57.
15. Макаров В. В., Лав А., Синицына О. В., Макарова С. С., Яминский И. В. и др. «Зеленые» нанотехнологии: синтез металлических наночастиц с использованием растений. Acta Naturae. 2014; 6 (1): 37–47.
16. Курапов П. Б., Бахтенко Е. Ю. Многообразие вторичных метаболитов высших растений и их лечебные свойства. М.: Изд-во РНИМУ, 2012; 200 с.
17. Elia P, Zach R, Hazan S, Kolusheva S, Porat Z, Zeiri Y. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. Int J Nanomedicine. 2014; 9 (1): 4007–21.
18. Dorosti N, Jamshidi F. Plant-mediated gold nanoparticles by Dracocephalum kotschyi as anticholinesterase agent: Synthesis, characterization, and evaluation of anticancer and antibacterial

activity. Journal of Applied Biomedicine. 2016; 14 (3): 235–45.
19. Smitha SL, Philip D, Gopchandran KG Green synthesis of gold nanoparticles using Cinnamomum zeylanicum leaf broth. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. 2009; 74 (3): 735–9.
20. Yu J, Xu D, Guan HN, Wang C, Huang LK, Chi DF. Facile one-step green synthesis of gold nanoparticles using Citrus maxima aqueous extracts and its catalytic activity. Mater Lett. 2016; (166): 110–2.
21. Teimuri-Mofrad R, Hadi R, Tahmasebi B, Farhoudian S, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extract. Nanochem Res. 2017; 2 (1): 8–19.
22. Banu H, Renuka N, Faheem SM, Ismail R, Singh V et al. Gold and silver nanoparticles biomimetically synthesized using date palm pollen extract-induce apoptosis and regulate P53 and BCL-2 expression in human breast adenocarcinoma cells. Biol Trace Elem Res. 2018; 18 (3): 12011–8.
23. Rai M, Yadav A. Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles: progress and prospects. IET Nanobiotechnol. 2013; 7 (3): 117–24.
24. Masumeh N. Biosynthesis of gold nanoparticles using plant extracts. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2015; 38 (1): 1–14.
25. Ankamwar B. Biosynthesis of gold nanoparticles (Green-gold) using leaf extract of Terminalia catappa. E J Chem. 2010; 7 (4): 1334–9.
26. Philip D. Rapid green synthesis of spherical gold nanoparticles using Mangifera indica leaf. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. 2010; 77 (4): 807–10.
27. Vadlapudi V, Kaladhar DS. Review: green synthesis of silver and gold nanoparticles. Middle-East J Sci Res. 2014; 19 (6): 834–42.
28. Salem DS, Sliem MA, El-Sesy M, Shouman SA, Badr Y. Improved chemo-photothermal therapy of hepatocellular carcinoma using chitosan-coated goldnanoparticles. Journal of photochemistry and photobiology B Biology. 2018; 182 (5): 92–9.
29. Zhivkov A, van der Zande BMI., Stoylov S. Electro-optics of metal particles: electric birefringence of gold rods. Coll Surf A. 2002; 209 (2–3): 299–303.
30. Lu An, Yuanyuan W, Qiwei T, Shiping Y. Small gold nanorods: recent advances in synthesis, biological imaging, and cancer therapy. Materials. 2017; 10 (12): 1372.
31. Oldenburg SJ, Averitt RD, Westcott SL, Halas N. Nanoengineering of optical resonances. Chem Phys Lett. 1998; 288 (2): 243–7.
32. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, and Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. Chem Rev. 2005; 105 (4): 1103–69.
33. Марченков Н. С., Марченко Н. В. Наночастицы золота и их применение для тераностики заболеваний человека. Медицинская физика. 2014; 4 (64): 64–77.
34. Silva SM, Tavallaie R, Sandiford L, Tilley RD, Gooding J. Gold coated magnetic nanoparticles: from preparation to surface modification for analytical and biomedical applications. Chem Commun. 2016; 52 (48): 7528–40.
35. Guo J, Rahme K, He Y, Li LL, Holmes JD, O'Driscoll CM. Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. International Journal of Nanomedicine. 2017; 12: 6131–52.
36. Дыкман Л. А., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы в биологии и медицине: достижения последних лет и перспективы. Acta Naturae. 2011; 3 (2): 36–58.
37. Марченко Н. В., Марченков Н. С. Наночастицы золота — от церковных витражей к наномедицине. Успехи в химии и химической технологии. 2012; 26 (6): 104–9.
38. Ali MRK, Wu Y, Ghosh D, Do BH, Chen K, Dawson MR et al. Nuclear membrane-targeted gold nanoparticles inhibit cancer cell migration and invasion. ACS Nano. 2017; 11 (4): 3716–26.
39. Fan L, Fang L, Yongtao Y, Yu W, Weiqun T. Strategies on Nanodiagnostics and Nanotherapies of the Three Common Cancers. Nanomaterials. 2018; 8 (4): 202.
40. Garcia CP, Chambrier I, Cook MJ, Haines AH, Field RA, Russell DA. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles. J Colloid Interface Sci. 2018; 512: 249–59.
41. Chen Y, Xianyu Y, Jiang, X. Surface modification of gold nanoparticles with small molecules for biochemical analysis. Acc Chem Res. 2017; 50 (2): 310–9.
42. Deng H, Zhong Y, Du M, Liu Q, Fan Z, Dai F, et al. Theranostic self-assembly structure of gold nanoparticles for nir photothermal therapy and x-ray computed tomography imaging. Theranostics. 2014; 4 (9): 904–18.
43. Деев С. М., Лебеденко Е. Н. Супрамолекулярные агенты для тераностики. Биоорганическая химия. 2015; 41 (5): 539–52.
44. Hwang S, Nam J, Jung S, Song J, Doh H, Kim S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: current status and future perspective. Nanomedicine Lond. 2014; 9 (13): 2003–22.
45. Li Y, He D, Tu J, Wang R, Zu C, Chen Y et al. The comparative effect of wrapping solid gold nanoparticles and hollow gold nanoparticles with doxorubicin-loaded thermosensitive liposomes for cancer thermo-chemotherapy. Nanoscale. 2018; 10 (18): 8628–41.
46. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. Chem Rev. 2009; 38 (6): 1759–82.
47. Дыкман Л. А., Богатырев В. А., Щеголев С. Ю., Хлебцов Н. Г. Золотые наночастицы: синтез, свойства, биомедицинское применение. М.: Наука, 2008; 319 с.
48. Sumbayev VV, Yasinska IM, Gibbs BF. Biomedical Applications of Gold Nanoparticles Recent Advances in Circuits. Communications and Signal Processing. Athens: WSEAS Press, 2013; p. 342–48.

References

1. Faulk WP, Taylor GM. An immunocolloid method for the electron microscope. Immunochemistry. 1971; 8 (11): 1081–3.
2. Dykman L, Khlebtsov N. Gold Nanoparticles in Biomedical Applications. CRS Press, 2018; 331 p.
3. Sukhorukov GB, Rogach AL, Zebli B, Liedl T, Skirtach AG, Köhler K et al. Nanoengineered polymer capsules: tools for detection, controlled delivery, and site-specific manipulation. Small. 2005; 1 (2): 194–200.
4. Xia Y, Li W, Cobley CM, Chen J, Xia X, Zhang Q et al. Gold nanocages: from synthesis to theranostic applications. Acc Chem Res. 2011; 44 (10): 914–24.
5. Zharov VP, Kim JW, Curiel DT, Everts M. Self-Assembling Nanoclusters in Living Systems: Application for Integrated Photothermal Nanodiagnostics and Nanotherapy. Nanomed Nanotechnol Biology and Medicine. 2005; 1 (4): 326–45.
6. Kang S, Ahn S, Lee J, Kim JY, Choi M, Gujrati V et al. Effects of gold nanoparticle-based vaccine size on lymph node delivery and cytotoxic T-lymphocyte responses. J Control Release. 2017; (256): 56–67.
7. Fan L, Fang L, Yongtao Y, Yu W, Weiqun T. Strategies on Nanodiagnostics and Nanotherapies of the Three Common Cancers. Nanomaterials. 2018; 8 (4): 202.
8. Antonio M, Nogueira J, Vitorino R, Daniel-da-Silva AL. Functionalized Gold Nanoparticles for the Detection of C-Reactive Protein. Nanomaterials. 2018; 8 (4): 200.
9. Shumkov AA, Suprun EV, Shumyanceva VV, Archakov AI. Sensornyj ehlement na osnove nanochastic zolota dlya opredeleniya kardiomarkyorov. Biomedicina. 2011; (3): 46–9.
10. Turkevich J, Stevenson PC, Hiller JA. Study of the nucleation and growth processes in the synthesis of colloidal gold. Discuss Faraday Soc. 1951; (11): 55–75.
11. Hirai H, Aizawa H. Preparation of stable dispersions of colloidal gold in hexanes by phase transfer. J Colloid Interface Sci. 1993; (161): 471–4.
12. Mihajlov MD. Himicheskie metody polucheniya nanochastic i nanomaterialov. Sankt-Peterburg, 2012; 260 s.
13. Anshup A, Venkataraman JS et al. Growth of gold nanoparticles in human cells. Langmuir. 2006; 21 (25): 11562–7.

14. Santhoshkumar J, Rajeshkumar S, Venkat KS. Phyto-assisted synthesis, characterization and applications of gold nanoparticles. Biochemistry and Biophysics Reports. 2017; (11): 46–57.
15. Makarov VV, Lav A, Sinicyna OV, Makarova SS, Yaminskij IV i dr. «Zelenye» nanotexnologii: sintez metallicheskix nanochastic s ispol'zovaniem rastenij. Acta Naturae. 2014; 6 (1): 37–47.
16. Kurapov PB, Baxtenko EYu. Mnogoobrazie vtorichnyx metabolitov vysshix rastenij i ix lechebnye svojstva. M.: Izd-vo RNIMU, 2012; 200 s.
17. Elia P, Zach R, Hazan S, Kolusheva S, Porat Z, Zeiri Y. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extracts as reducing agents. Int J Nanomedicine. 2014; 9 (1): 4007–21.
18. Dorosti N, Jamshidi F. Plant-mediated gold nanoparticles by Dracocephalum kotschyi as anticholinesterase agent: Synthesis, characterization, and evaluation of anticancer and antibacterial activity. Journal of Applied Biomedicine. 2016; 14 (3): 235–45.
19. Smitha SL, Philip D, Gopchandran KG Green synthesis of gold nanoparticles using Cinnamomum zeylanicum leaf broth. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. 2009; 74 (3): 735–9.
20. Yu J, Xu D, Guan HN, Wang C, Huang LK, Chi DF. Facile one-step green synthesis of gold nanoparticles using Citrus maxima aqueous extracts and its catalytic activity. Mater Lett. 2016; (166): 110–2.
21. Teimuri-Mofrad R, Hadi R, Tahmasebi B, Farhoudian S, et al. Green synthesis of gold nanoparticles using plant extract. Nanochem Res. 2017; 2 (1): 8–19.
22. Banu H, Renuka N, Faheem SM, Ismail R, Singh V et al. Gold and silver nanoparticles biomimetically synthesized using date palm pollen extract-induce apoptosis and regulate P53 and BCL-2 expression in human breast adenocarcinoma cells. Biol Trace Elem Res. 2018; 18 (3): 12011–8.
23. Rai M, Yadav A. Plants as potential synthesiser of precious metal nanoparticles: progress and prospects. IET Nanobiotechnol. 2013; 7 (3): 117–24.
24. Masumeh N. Biosynthesis of gold nanoparticles using plant extracts. Bioprocess and Biosystems Engineering. 2015; 38 (1): 1–14.
25. Ankamwar B. Biosynthesis of gold nanoparticles (Green-gold) using leaf extract of Terminalia catappa. E J Chem. 2010; 7 (4): 1334–9.
26. Philip D. Rapid green synthesis of spherical gold nanoparticles using Mangifera indica leaf. Spectrochim Acta Part A Mol Biomol Spectrosc. 2010; 77 (4): 807–10.
27. Vadlapudi V, Kaladhar DS. Review: green synthesis of silver and gold nanoparticles. Middle-East J Sci Res. 2014; 19 (6): 834–42.
28. Salem DS, Sliem MA, El-Sesy M, Shouman SA, Badr Y. Improved chemo-photothermal therapy of hepatocellular carcinoma using chitosan-coated goldnanoparticles. Journal of photochemistry and photobiology B Biology. 2018; 182 (5): 92–9.
29. Zhivkov A, van der Zande BMI., Stoylov S. Electro-optics of metal particles: electric birefringence of gold rods. Coll Surf A. 2002; 209 (2–3): 299–303.
30. Lu An, Yuanyuan W, Qiwei T, Shiping Y. Small gold nanorods: recent advances in synthesis, biological imaging, and cancer therapy. Materials. 2017; 10 (12): 1372.
31. Oldenburg SJ, Averitt RD, Westcott SL, Halas N. Nanoengineering of optical resonances. Chem Phys Lett. 1998; 288 (2): 243–7.
32. Love JC, Estroff LA, Kriebel JK, Nuzzo RG, and Whitesides GM. Self-assembled monolayers of thiolates on metals as a form of nanotechnology. Chem Rev. 2005; 105 (4): 1103–69.
33. Marchenkov NS, Marchenko NV. Nanochasticy zolota i ix primenenie dlya teranostiki zabolevanij cheloveka. Medicinskaya fizika. 2014; 4 (64): 64–77.
34. Silva SM, Tavallaie R, Sandiford L, Tilley RD, Gooding J. Gold coated magnetic nanoparticles: from preparation to surface modification for analytical and biomedical applications. Chem Commun. 2016; 52 (48): 7528–40.
35. Guo J, Rahme K, He Y, Li LL, Holmes JD, O'Driscoll CM. Gold nanoparticles enlighten the future of cancer theranostics. International Journal of Nanomedicine. 2017; 12: 6131–52.
36. Dykman LA, Xlebcov NG. Zolotye nanochasticy v biologii i medicine: dostizheniya poslednix let i perspektivy. Acta Naturae. 2011; 3 (2): 36–58.
37. Marchenko NV, Marchenkov NS. Nanochasticy zolota — ot cerkovnyx vitrazhej k nanomedicine. Uspexi v ximii i ximicheskoj texnologii. 2012; 26 (6): 104–9.
38. Ali MRK, Wu Y, Ghosh D, Do BH, Chen K, Dawson MR et al. Nuclear membrane-targeted gold nanoparticles inhibit cancer cell migration and invasion. ACS Nano. 2017; 11 (4): 3716–26.
39. Fan L, Fang L, Yongtao Y, Yu W, Weiqun T. Strategies on Nanodiagnostics and Nanotherapies of the Three Common Cancers. Nanomaterials. 2018; 8 (4): 202.
40. Garcia CP, Chambrier I, Cook MJ, Haines AH, Field RA, Russell DA. Targeted photodynamic therapy of breast cancer cells using lactose-phthalocyanine functionalized gold nanoparticles. J Colloid Interface Sci. 2018; 512: 249–59.
41. Chen Y, Xianyu Y, Jiang, X. Surface modification of gold nanoparticles with small molecules for biochemical analysis. Acc Chem Res. 2017; 50 (2): 310–9.
42. Deng H, Zhong Y, Du M, Liu Q, Fan Z, Dai F, et al. Theranostic self-assembly structure of gold nanoparticles for nir photothermal therapy and x-ray computed tomography imaging. Theranostics. 2014; 4 (9): 904–18.
43. Deev SM, Lebedenko EN. Supramolekulyarnye agenty dlya teranostiki. Bioorganicheskaya ximiya. 2015; 41 (5): 539–52.
44. Hwang S, Nam J, Jung S, Song J, Doh H, Kim S. Gold nanoparticle-mediated photothermal therapy: current status and future perspective. Nanomedicine Lond. 2014; 9 (13): 2003–22.
45. Li Y, He D, Tu J, Wang R, Zu C, Chen Y et al. The comparative effect of wrapping solid gold nanoparticles and hollow gold nanoparticles with doxorubicin-loaded thermosensitive liposomes for cancer thermo-chemotherapy. Nanoscale. 2018; 10 (18): 8628–41.
46. Boisselier E, Astruc D. Gold nanoparticles in nanomedicine: preparations, imaging, diagnostics, therapies and toxicity. Chem Rev. 2009; 38 (6): 1759–82.
47. Dykman LA, Bogatyrev VA, Shhegolev SYu, Xlebcov NG. Zolotye nanochasticy: sintez, svojstva, biomedicinskoe primenenie. M.: Nauka, 2008; 319 c.
48. Sumbayev VV, Yasinska IM, Gibbs BF. Biomedical Applications of Gold Nanoparticles Recent Advances in Circuits. Communications and Signal Processing. Athens: WSEAS Press, 2013; p. 342–48.

НАНОЧАСТИЦЫ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА И ПОРФИРИНФУЛЛЕРЕНА ДЛЯ ДИАГНОСТИЧЕСКОГО И ТЕРАПЕВТИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ ПАРАМАГНИТНЫХ ИОНОВ И РАДИОНУКЛИДОВ

М. А. Орлова[1,2] ✉, А. Л. Николаев[1], Т. П. Трофимова[1,3], А. П. Орлов[1], А. В. Северин[1], С. Н. Калмыков[1]

[1] Химический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[2] Отдел биохимии и фармакологии,
Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Д. Рогачева, Москва

[3] Институт физиологически активных веществ РАН, Черноголовка

Использование наночастиц как носителей лекарственных средств широко изучается. Одним из важных вопросов остается изменение размеров и цитотоксических свойств частиц в процессе их получения и применения. Целью работы было исследовать возможную агрегацию [^{67}Zn]порфиринфуллерен-наночастиц (BFNP) в зависимости от времени и провести сравнительный анализ свойств наночастиц гидроксиапатита (HAP), полученных различными способами. Оказалось, что агрегация BFNP качественно не влияет на функцию наночастиц, но количественно уменьшает их воздействие на лейкемические клетки. Варьирование способов получения и обработки наночастиц HAP позволяет менять их форму, размеры и сорбционную способность по отношению к ионам металлов, а также лигандам и комплексам. Используя ферментативный метод, мы получили HAP с заранее заданными свойствами путем варьирования условий синтеза. Полученные наночастицы HAP представляют собой радиопрепараты, содержащие короткоживущие изотопы цинка и меди (в виде ионов и соединений — производных тиазина и пиримидина). Эти наноконструкции содержат два антиопухолевых компонента (радионуклид и лиганд или комплекс), что определяет их фармакологический потенциал для диагностики и лучевой терапии.

Ключевые слова: гидроксиапатит, порфиринфуллерен, производные тиазина и пиримидина, HL-60, K-562, MOLT-4, радионуклиды цинка и меди

✉ **Для корреспонденции:** Марина Алексеевна Орлова
Ленинские горы, д. 1, стр. 3, г. Москва, 119992; orlova.radiochem@mail.ru

Статья получена: 27.06.2018 **Статья принята к печати:** 20.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.075

HYDROXYAPATITE AND PORPHYRIN-FULLERENE NANOPARTICLES FOR DIAGNOSTIC AND THERAPEUTIC DELIVERY OF PARAMAGNETIC IONS AND RADIONUCLIDES

Orlova MA[1,2] ✉, Nikolaev AL[1], Trofimova TP[1,3], Orlov AP[1], Severin AV[1], Kalmykov SN[1]

[1] Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow

[2] Department of Biochemistry and Pharmacology,
Dmitry Rogachev National Medical Research Centre of Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

[3] Institute of Physiological Active Compounds of RAS, Chernogolovka

Nanoparticles for drug delivery are the subject of extensive research. Importantly, they can transform in size during synthesis or actual use, thereby changing their cytotoxic properties. The aim of the present work was to study the tendency of [^{67}Zn] porphyrin-fullerene nanoparticles (BFNP) to aggregate over time and to compare the properties of hydroxyapatite (HAP) nanoparticles obtained through 3 different techniques. We found that aggregation of BFNP nanoparticles does not affect their function but attenuates their cytotoxicity against leukemia cells. We were also able to obtain HAP nanoparticles with programmable properties (such as size, shape or the capacity to adsorb metal ions, ligands and chemical complexes) through enzymatic synthesis by varying its conditions. The synthesized HAP nanoparticles contain short-lived isotopes of zinc and copper (in the form of ions and complexes with pyrimidine or thiazine derivatives). These tumoricidal components (a radionuclide and a ligand or a complex) determine the diagnostic and therapeutic potential of the obtained radiopharmaceutical agents.

Keywords: hydroxyapatite, porphyrin-fullerene, thiazine and pyrimidine derivatives, HL-60, K-562, MOLT-4, zinc and copper radionuclides

✉ **Correspondence should be addressed:** Marina A. Orlova
Leninskie gory 1, bl. 3, Moscow, 119992; orlova.radiochem@mail.ru

Received: 27.06.2018 **Accepted:** 20.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.075

Современная медицина требует новых подходов к развитию и применению лекарственных препаратов, особенно высокотоксичных антиопухолевых лекарств, так как важна их целевая доставка к биологической мишени. В связи с этим все большее внимание уделяют использованию моноклональных антител [1], биологических транспортеров [2], различных наноструктур и наноплатформ. Среди наноносителей следует выделить фуллерены [3],

наноалмазы [4], неорганические наночастицы различной природы [5, 6], липосомы [7], пористый кремний [8], гидроксиапатиты (HAP) [9]. Разработка таких способов транспортировки лекарств преследует несколько целей: 1) снижение токсичности препарата, которая достаточно высока при прямом введении в организм. Хорошим примером понижения токсичности служит доксил — доксорубицин в липосомальном контейнере [10]; 2) повышение воздействия на опухоль за счет синергического воздействия препарата и его транспортера [11]. Например, наночастицы на основе порфиринфуллерена (бакминстерфуллерен(C_{60})-2-(бутадиен-1-ил)-тетра(о-γ-аминобутирил-*о*-фталил)порфирин, или BFNP) были получены и использованы в качестве носителей магнитных изотопов ^{25}Mg и ^{67}Zn, которые сами являются активными препаратами. Такая конструкция способна снижать индуцированный гипоксией ацидоз после химиотерапии [12]; 3) повышение биодоступности препарата (например, за счет связывания с альбумином), пролонгированности действия (нанофуллерены, HAP) и усиления воздействия на опухоль за счет целевого попадания в биомишень (моноклональные антитела); 4) создание конструкции, в которой и носитель, и препарат являются антиопухолевыми агентами различного действия. Например, дериватизированные фуллерены, обладающие собственным антиопухолевым действием, несут на себе магнитные изотопы или радионуклиды [13]. Этот случай реализуется при создании радиофармпрепаратов для лучевой терапии — неотъемлемой части антиопухолевой терапии.

Наночастицы HAP представляют интерес в качестве транспортеров как лекарств, так и радионуклидов, благодаря биодеградируемости, биосовместимости и оседанию (встраиванию) в костную ткань. Эти качества обусловлены их кальцийфосфатным происхождением, сходным с химическим составом минеральной части кости человека [14, 15].

Целью работы было исследование свойств HAP разного способа получения (и, соответственно, обладающих различными свойствами) и BFNP как потенциальных носителей ионов биологически активных металлов (в том числе радионуклидов) и лигандов, проявляющих антиопухолевую активность.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Соединения

Хелатор N(5,6-дигидро-4*H*-1,3-тиазин-2-ил)бензамид (L^1) в форме гидробромида (L^1HBr) синтезировали по методике, описанной ранее [16]. Для получения комплекса с цинком L^1ZnCl_2 (C^1) лиганд L^1HBr в водном растворе переводили в форму основания (рис. 1). К основанию L^1 в диэтиловом эфире постепенно добавляли раствор хлорида цинка в диэтиловом эфире (в отношении 1 : 1) и перемешивали 0,5 ч. После выпадения белого осадка его выделяли в виде белого кристаллического вещества (выход 64%). Комплекс идентифицировали методами ^{1}H-ЯМР на спектрометре Bruker CXP-200 (Bruker; Германия) и элементным анализом. L^2 — 2-аминопиримидин (Sigma; США), L^3 — 2-аминопиримидинсалицилат. Их комплексы с цинком $Zn(L^2)_2Cl_2$ (C^2) и $Zn(L^3)_2$ (C^3) получали, как описано ранее [17].

Спектрофотометрия

Измерения проводили на спектрофотометре UV-1280 (Shimadzu; Япония). Калибровку по лиганду и по комплексу делали в водном, физиологическом и спиртовом растворах.

Константы протонирования и устойчивости

Константы определяли потенциометрически с помощью автотитратора Metrohm 848 Titrino plus (Metrohm AG; Швейцария). При определении константы устойчивости комплекса титрование проводили на автотитраторе со стеклянным индикаторным электродом. При расчете использовали программу Hyperquad 2013.

Синтез HAP

Метод соосаждения. Описаны способы синтеза HAP [18–20], различающиеся параметрами конечного продукта.

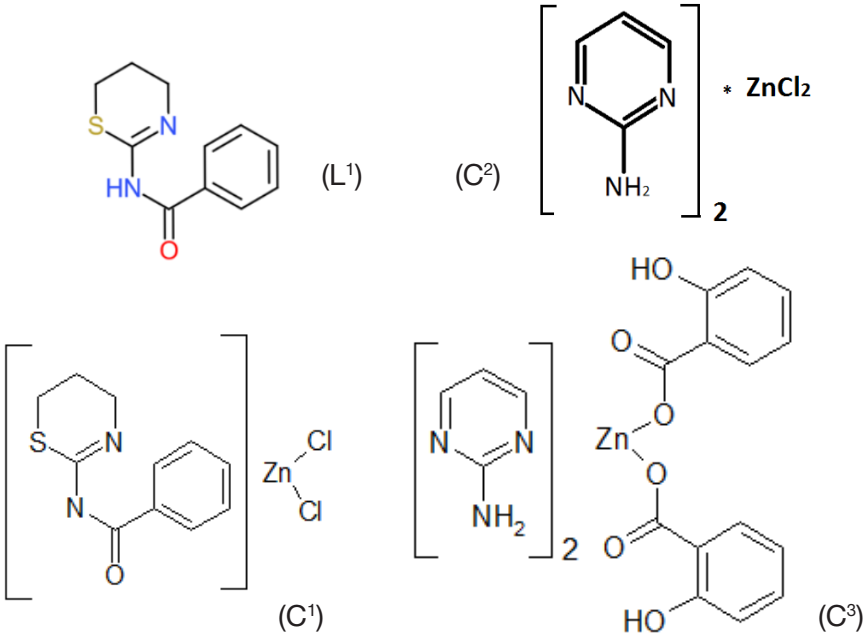


Рис. 1. Структурные формулы соединений, используемых в работе

HAP_1 синтезировали при комнатной температуре и при мольном соотношении Ca/P, равном 1,67, которое соответствует стехиометрии HAP [21]. Количества всех реагентов подбирали таким образом, чтобы в итоге образовалась 5%-я (по массе твердой фазы) суспензия продукта [22]. Остаточное содержание кальция и цинка в маточном растворе анализировали с помощью метода ICP-AES (атомно-эмиссионная спектроскопия с индуктивно связанной плазмой) на приборе Optima 2100 DV (Perkin Elmer; США). Для получения образца HAP_2 по окончании синтеза суспензию нагревали до температуры 90 °C без кипячения и выдерживали в таком режиме 4 ч.

Ферментативный метод. Синтез HAP_E проводили ферментативным гидролизом глицерофосфата кальция в присутствии щелочной фосфатазы (Merk; Германия). При этом варьировали концентрацию фермента, состав среды (водная, глициновый буфер, трис-буфер), pH (7–10), концентрацию кальция и время реакции. Реакцию гидролиза глицерофосфата запускали добавлением раствора фермента к раствору глицерофосфата кальция, взятого в концентрации 0,02 моль/л. Рабочие концентрации фермента находились в интервале 0,02–0,4 мкг/мл. В зависимости от условий, реакцию проводили от нескольких часов до нескольких суток.

Введение ионов цинка и меди при синтезе HAP. При введении ионов металлов растворяли в H_3PO_4 навеску оксида цинка или меди (химически чистого, х. ч.), соответствующую расчетному мольному отношению Zn(Cu)/Ca, равному 5 (15 мол.%). Полученный раствор вносили по каплям в суспензию $Ca(OH)_2$ при постоянном перемешивании. Продолжали синтез и получали образцы HAP_{Zn1}, HAP_{Zn2}, HAP_{Cu}. Небольшую часть высушенных препаратов отжигали в муфельной печи на воздухе при температуре 900 °C в течение 3 ч и исследовали методом RPA (*см*. ниже).

Электронно-микроскопическое исследование образцов HAP

Небольшую часть образца обрабатывали ультразвуком в ультразвуковой ванне 30 с (при частоте ультразвука 22 кГц, мощности 50 Вт). После стандартной подготовки образца использовали микроскоп JSM-6380LA (JEOL; Япония) при ускоряющем напряжении 20 кВ.

Нуклиды металлов

^{69m}Zn ($T_{1/2}$ = 13,7 ч; E_γ = 438,7 кэВ) получали по реакции $^{71}Ga(\gamma, np)^{69m}Zn$, как описано ранее [21]. Для получения меченого соединения проводили изотопный обмен в течение 30 мин комплекса C^1 в физиологическом растворе и этиловом спирте в соотношении 1 : 1 с предварительно упаренным раствором, содержащим ^{69m}Zn без носителя, полученным с хроматографической колонки. Для получения меченых комплексов C^2 и C^3 лиганды в форме оснований обрабатывали раствором $^{69m}ZnCl_2$ при перемешивании и нагревании.

$^{64,67}Cu$ ($T_{1/2}$ = 12,7 ч и 61,8 ч соответственно; $E_\gamma(^{64}Cu)$ = 1345,8 кэВ, $E_\gamma(^{67}Cu)$ = 184,5 кэВ) получали по реакции $^{nat}Zn(_\gamma,np)^{64}Cu$; $^{nat}Zn(n,\beta)^{67}Cu$. Медь отделяли от цинка экстракцией раствором 0,001% дитизона в CCl_4, реэкстракцией в 6M HCl и ионно-обменной хроматографией на колонке с сорбентом Cu-Resin (Triskem; Франция). Измерение радиоактивности продуктов проводили на гамма-спектрометре с полупроводниковым детектором GC 3020 (Canberra; США). ^{67}Zn и ^{25}Mg — стабильные изотопы со значениями s, равными –5/2 и +5/2 соответственно (^{67}Zn обогащение 94,5%, изотопная чистота ^{25}Mg 99,9%) («Изотоп»; Россия).

Определение размера наночастиц

Размер наночастиц определяли по методу динамического рассеяния света.

Тонкослойная хроматография (TLC)

Использовали пластины Silufol с разными элюентами. Проявление неактивной хроматограммы осуществляли парами йода.

Авторадиография (ARG)

Пластину после TLC с радиоактивными веществами характеризовали с помощью цифровой ARG, используя запасающие пластины (Storage phosphor system), покрытые BaFBr:Eu (Perkin Elmer; США), и прибор для сканирования Cyclone Plus (Perkin Elmer; США).

Рентгенографический фазовый анализ (RPA)

Дифрактограммы получали на автоматизированном рентгеновском дифрактометре ДРОН-3 («Инноскоп»; Россия) с прилагаемыми программами обработки результатов. Измерения проводили на Cu-K_α. Размеры кристаллитов (блоков) *D* оценивали по формуле Шеррера:

$$D_{HKL} = \frac{\lambda}{\beta\cos\theta}.$$

Адсорбционные измерения

Адсорбционные измерения проводили на автоматическом сорбтометре ASAP 2000 (Micromeritics; США). Расчет удельной поверхности проводили с помощью пакета программ фирмы Micromeritics, входящего в комплектацию прибора.

MTT-тест

Подробное описание процедуры представлено ранее [13]. Использовали линии клеток HL-60, K-562, MOLT-4 и MOLT-4 (res) (res — линия клеток, резистентных к аспарагиназе, одному из основных препаратов для лечения острых лейкозов у детей), культивированные стандартным способом. Статистический анализ проводили с помощью критерия Манна–Уитни. Количество экспериментов в каждом случае было не менее пяти (с трехкратным повтором).

Выделение мононуклеарных клеток из костного мозга и периферической крови

Клетки костного мозга (КМ) пациентов с диагностированным острым В-лимфобластным лейкозом (В-ОЛЛ), острым миелоидным лейкозом (ОМЛ) или острым Т-лимфобластным лейкозом (Т-ОЛЛ) были любезно предоставлены в НМИЦ ДГОИ им. Д. Рогачева. Процедура отбора подробно описана [13]. Содержание бластных клеток в мононуклеарной фракции периферической крови составляло не менее 80% по результатам гематологического исследования.

Морфологические исследования производили на флуоресцентном микроскопе LEICA DM6000B (Leica Microsystems; Германия) или на лазерном сканирующем конфокальном микроскопе LSM 710 (Carl Zeiss; Германия). Изображение фиксировали с помощью видеосистемы на основе цифровой камеры.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние размеров наночастиц порфиринфуллеренов на их цитотоксичность

Результаты ряда исследований позволяют предполагать, что усиление агрегации наночастиц (фуллереновых, в частности) увеличивает величину выживаемости (LC_{50}), т. е. уменьшает цитотоксичность препарата [23–26]. Однако имеются и противоположные данные, в основном, для наноC_{60}. Мы рассмотрели влияние этого параметра на примере наночастиц BFNP.

В табл. 1 представлены данные по выживаемости линий лейкемических клеток и клеток КМ нелеченых пациентов с острыми лейкозами под действием ионов цинка (природного изотопного состава и обогащенных магнитным ^{67}Zn), связанных с BFNP. Получена зависимость величины LC_{50} от размера наночастиц. Во всех случаях выживаемость клеток увеличивается с ростом агрегатов, однако направленность действия препаратов не меняется.

Обработка ультразвуком приводила к уменьшению среднего размера наночастиц до 15–20 нм, однако, как показали эксперименты, через неделю средний размер составлял 20–30 нм, через 2 недели — 30–40 нм, через месяц — 50–60 нм.

Морфологические исследования показали, что не только наночастицы, но и клетки, обработанные BFNP с магнитным изотопом цинка, подвержены усиленной агрегации (данные не представлены).

Воздействие на клетки лигандов, потенциально перспективных для нанесения на НАР

Потенциальными хелаторами (антиопухолевыми агентами), предлагаемыми для нанесения на наночастицы НАР, могут быть как лиганды, так и их комплексы с ионами металлов, в частности с ионами цинка и меди (которые в перспективе могут быть заменены или обменены на короткоживущие радионуклиды с получением радиофармпрепаратов). Вещества могут наноситься на НАР как в виде комплекса, так и по отдельности в виде ионов металла и лиганда-хелатора. В обоих случаях комплекс или его компоненты будут действовать либо синергически, либо по отдельности.

В табл. 2 представлены результаты выживаемости клеток линии K-562 под действием лиганда L^1 и комплексов в сравнении с клетками нормальных лимфоцитов здоровых доноров (ЗД). На нормальных лимфоцитах и линиях клеток MOLT-4 и MOLT-4 (res) показана очень высокая выживаемость клеток под действием различных образцов НАР, в том числе содержащих ионы металлов цинка и меди.

Для исследованных хелаторов и комплексов характерны тенденции к увеличению (уменьшению) цитотоксичности по

Таблица 1. Значения выживаемости (LC_{50}) лейкемических клеток различной природы в сравнении с нормальными лимфоцитами под действием Zn-BFNP и ^{67}Zn-BFNP и в зависимости от размера наночастиц

Препарат	LC_{50}, мкг/мл		
	В-ОЛЛ	ОМЛ	ЗД*
Zn- BFNP	60 ± 8	64 ± 3	81 ± 9
^{67}Zn- BFNP	16 ± 3	63 ± 8	79 ± 9
Средний размер наночастиц и LC_{50}			
Zn- BFNP	25 нм	55 нм	
^{67}Zn- BFNP	37 ± 3 мкг/мл	78 ± 6, мкг/мл	
Средний размер наночастиц и LC_{50}			
Zn- BFNP	50 нм	80 нм	
^{67}Zn- BFNP	10 ± 2 мкг/мл	23 ± 3 мкг/мл	

Примечание: *ЗД — нормальные лимфоциты здоровых доноров.

Таблица 2. Зависимость выживаемости (LC_{50}) различных клеток под действием солей цинка, хелаторов и НАР различной структуры

Препараты	LC_{50}, мкмоль/мл					
	Клетки ЗД	K-562	MOLT-4	MOLT-4 (res)	HL-60	В-ОЛЛ*
$ZnCl_2$ **	1,6 ± 0,3	0,52 ± 0,05				
$ZnSal_2(H_2O)_2$ **	0,68 ± 0,06	0,41 ± 0,05				
C^3	1,0 ± 0,2	0,25 ± 0,04				
L^1	10,6 ± 0,5	1,0 ± 0,3				
C^1	4,5 ± 0,4	1,1 ± 0,2				
C^2	0,24 ± 0,04	0,12 ± 0,02	0,062 ± 0,008	0,040 ± 0,009	0,039 ± 0,009	0,061 ± 0,007
HAP_1	>> 5 • 10^{-3} моль/л		3,5 • 10^{-3} моль/л	> 5 • 10^{-3} моль/л		
HAP_2	>> 5 • 10^{-3} моль/л		4 • 10^{-3} моль/л	> 5 • 10^{-3} моль/л		
$HAPZn_1$	>> 5 • 10^{-3} моль/л		>> 5 • 10^{-3} моль/л	> 5 • 10^{-3} моль/л		
$HAPZn_2$	>> 5 • 10^{-3} моль/л		>> 5 • 10^{-3} моль/л	6,5 • 10^{-3} моль/л		
HAP_{Cu}	>> 5 • 10^{-3} моль/л		>> 5 • 10^{-3} моль/л	5 •10^{-3} моль/л		

Примечание: * — В-ОЛЛ — клетки КМ пациентов с диагнозом острый В-лимфобластный лейкоз; ** — по данным [17].

отношению к нормальным лимфоцитам и раковым клеткам. Среди клеток здоровых доноров выживаемость снижается в следующей последовательности: $L^1 > C^1 > ZnCl_2 > C^3 > ZnSal_2(H_2O)_2 > C^2$. По отношению к линии хронического миелолейкоза K-562 эта последовательность изменяется: $C^1 > L^1 > ZnCl_2 > ZnSal_2(H_2O)_2 > C^3 > C^2$. Величина терапевтического окна, или терапевтического индекса (ТИ = LC_{50} (ЗД)/LC_{50} (лейкемические клетки)), уменьшается в ряду: $L^1 > C^3 \sim C^1 > ZnCl_2 > C^2 > ZnSal_2(H_2O)_2$. Таким образом, все три комплекса представляют интерес в качестве антиопухолевых агентов.

При сравнении воздействия комплекса C^2 на различные линии клеток и клетки КМ пациентов с В-ОЛЛ получили следующую последовательность: клетки ЗД > K-562 > HL-60 ~ MOLT-4 (res) > MOLT-4 ~ КМ (В-ОЛЛ). Важно, что C^2 более цитотоксичен по отношению к клеткам MOLT-4 (res), по сравнению с линией обычных клеток MOLT-4. Таким образом, наблюдается специфичность к клеткам, вызывающим наибольшие осложнения при химиотерапии (рис. 2).

Важной характеристикой лигандов и комплексов является их устойчивость, особенно в водном/физиологическом растворе. К сожалению, чаще встречаются биологически активные лиганды-хелаторы и комплексы, плохо растворимые в воде. Для них требуется обязательный носитель или специальная упаковка при введении в организм. Частично эту функцию может выполнять НАР.

Спектрофотометрические исследования устойчивости комплексов в водных, спиртовых и физиологичесих растворах показали, что наименее устойчив комплекс C^1: через некоторое время он гидролизуется с образованием тиазина (который, однако, также проявляет слабые антиопухолевые и высокие радиопротекторные свойства). Остальные комплексы были достаточно устойчивы в течение времени после разведения, необходимого для применения в медицинских целях.

Метод потенциометрического титрования лиганда L^1, проведенный в водном и физиологическом растворах в зависимости от pH (при C (L^1) = $1 \cdot 10^{-3}$ моль/л, I = 0,15 NaCl (0,1 моль/л KNO_3)), показал, что константы протонирования равны log K = 5,1 ± 0,1 (водный раствор) и logK = 5,3 ± 0,2 (физиологический раствор). Попытка потенциометрически определить константу устойчивости комплекса C^1 не принесла успеха. Это может быть связано с образованием гидроксида цинка, мешающим проведению титрования. Для комплекса C^2 константа устойчивости составляла logK (C^2) =10,4 ± 0,5.

Поведение наноНАР, несущих лиганды, ионы металлов и/или комплексы

На рис. 3 (А, Б) показано поведение (сорбция) лиганда L^1 на НАР1 и НАР2. Изменения наблюдаются только в первый момент сорбции, вероятно, за счет взаимодействия с некоторым количеством кальция в суспензии, появляющимся за счет растворения наноНАР. Это значит, что лиганд L^1 не связывается с гидроксиапатитом. Аналогичную картину можно наблюдать и для L^2 и L^3.

Метод электронной микроскопии дает возможность представить морфологию нанокристаллов, а рентгеновские дифрактограммы позволяют оценить состав твердой фазы, соответствующий биогидроксиапатиту. Для $НАР_1$ эти результаты представлены на рис. 4. Средние размеры для цинк-содержащих и «чистых» наночастиц показывают уменьшение размеров в случае термообработки, которое значительно для «чистых» и практически незначимо для цинк-содержащих наночастиц (табл. 3).

Для $НАР_E$ (рис. 5А) показано образование гидроксиапатита в качестве основной фазы (рис. 5Б) и наблюдается сферическая форма наночастиц, образующих микроагрегаты. Удельная поверхность образца, определенная по адсорбции азота, составляла 300 м²/г. При этом наблюдалось широкое распределение пор по размерам (2–300 нм). Размеры кристаллитов в образцах, имеющих кристаллическую структуру, оценивали по формуле Шеррера. Их размер составил 12–14 нм. Наблюдали большую разницу в размерах кристаллитов и агрегатов, средние размеры которых показаны на рис. 6.

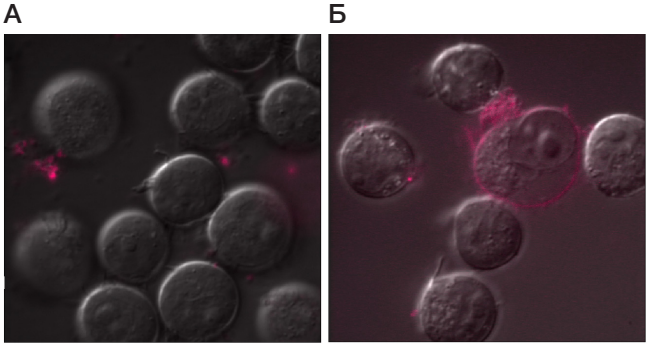


Рис. 2. Клетки MOLT-4 под действием соединений L^3 (**А**) и C^3 (**Б**). Снимки сделаны на конфокальном микроскопе

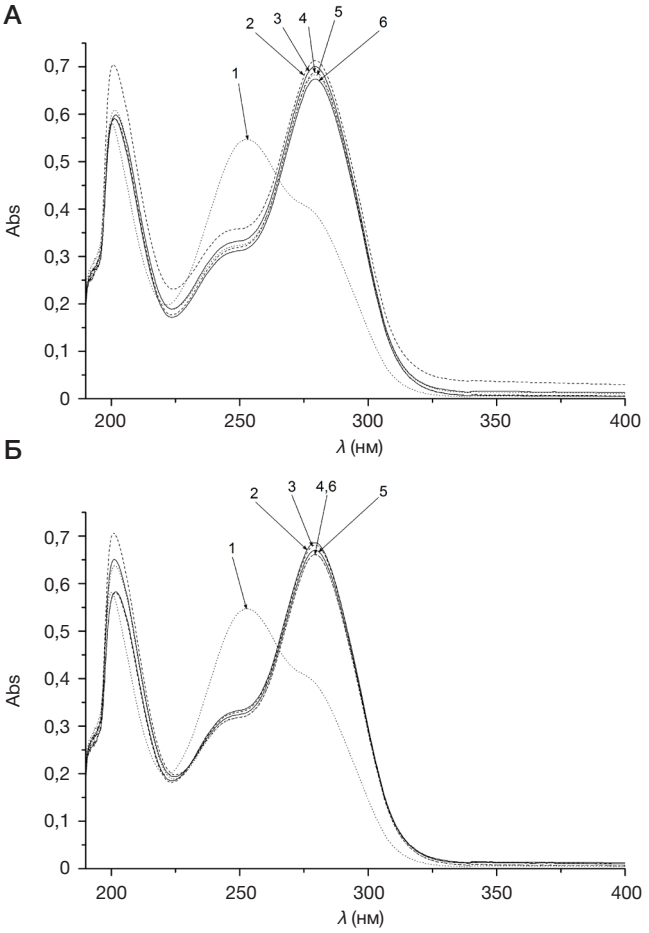


Рис. 3. Спектры поглощения, полученные для 10^{-2} мг/мл раствора L^1, находящегося в контакте с $НАР_2$ (**А**) и $НАР_1$ (**Б**) в течение 0 мин (1), 5 мин (2), 10 мин (3), 15 мин (4), 30 мин (5), 60 мин (6)

В работе использовали шесть различных форм НАР: не содержащие ионы металлов $НАР_1$, $НАР_2$, $НАР_E$, а также $НАР_{Zn1}$, $НАР_{Zn2}$, $НАР_{Cu}$. НАРЕ отличался сферической формой (сферы полые), бо́льшими размерами и увеличенными сорбционными свойствами. Средние размеры остальных располагаются в следующем ряду: $НАР_1 > НАР_{Zn1} > НАР_{Zn2} \sim НАР_{Cu} > НАР_2$.

Были получены величины удельной адсорбции ионов цинка и меди на $НАР_1$ и $НАР_E$, а также изотермы адсорбции по Ленгмюру и Фрейндлиху. Сорбция ионов меди полностью соответствует модели Ленгмюра, а ионов цинка с равными коэффициентами корреляции соответствует моделям и Ленгмюра, и Фрейдлиха.

Сорбционная емкость НАР по отношению к ионам меди оказалась значительно выше, чем к ионам цинка. Введение цинка мало влияет на размеры частиц. Однако средние размеры термически обработанного $НАР_2$ меньше, чем у $НАР_1$. Частицы $НАР_2$ приобретают более правильную изометрическую форму (увеличивается их толщина) по сравнению с $НАР_1$, что приводит к уменьшению их удельной поверхности. Как результат, максимальная сорбционная емкость для $НАР_2$ уменьшается.

Комплексы с радионуклидами цинка и меди

С помощью изотопного обмена были получены $^{69m}ZnC^1$ (I), $^{69m}ZnC^3$ (II) и $[(L^2)_2{}^{64,67}CuCl_4]$ (III) и охарактеризованы методами TLC, ARG и γ-спектрометрией. Время изотопного обмена подбирали экспериментально, чтобы величины R_f радиопрепаратов совпадали с таковыми для препаратов без радионуклида и не образовывалось побочных продуктов. После этого полученные соединения сорбировали на НАР и проводили повторно физико-химические измерения. Готовые радиопрепараты имели аналогичные свойства, однако комплекс с медью при «посадке» на $НАР_1$ разлагался. В этом случае наноНАР сорбировал только ионы меди. Возможно, эту проблему можно будет решить введением комплекса в НАР непосредственно в процессе его синтеза.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что магнитный изотоп ^{25}Mg (доля в природной смеси изотопов равна 11%) является гиперактивирующим элементом магний-зависимого контроля синтеза АТФ, что делает направленную доставку этого изотопа к пораженным гипоксией клеткам/тканям перспективной фармакологической задачей [12]. Наночастицы BFNP, способные к пролонгированному выпуску ионов Mg^{2+} и Zn^{2+}, могут служить средством такой доставки. Однако основным сдерживающим фактором для клинического применения любых фуллереновых производных является возможная неконтролируемая агрегация наночастиц с изменением их первоначальных цитотоксических и физиологических свойств. Приведенные в нашей работе данные показывают, что происходящие изменения размеров не ведут к принципиальным изменениям свойств частиц, хотя и уменьшают степень их воздействия на опухолевые клетки. Таким результатом является уменьшение примерно в 6–7 раз выживаемости клеток КМ нелеченых пациентов с диагнозом В-ОЛЛ в присутствии ^{67}Zn-BFNP по сравнению с ^{nat}Zn-BFNP. Использование предварительной ультразвуковой обработки способно замедлить агрегацию.

Наночастицы НАР имеют богатую перспективу применения для *drug delivery*, так как могут быть синтезированы различными способами, что дает в результате частицы с разными характеристиками по размерам, форме и их сорбционным свойствам. Кроме того, они обладают очень низкой цитотоксичностью. Введение лигандов и комплексов непосредственно в процесс синтеза, вероятно, является более удачным приемом, сохраняющим свойства всех компонентов соединения. Особенно перспективным выглядит ферментативный способ получения носителя, так как в этом случае возможны вариации условий, приводящие к сильно различающимся параметрам частиц. Это расширяет возможности их применения.

Микроэлементы имеют большое значение для нормального функционирования организма. Среди них

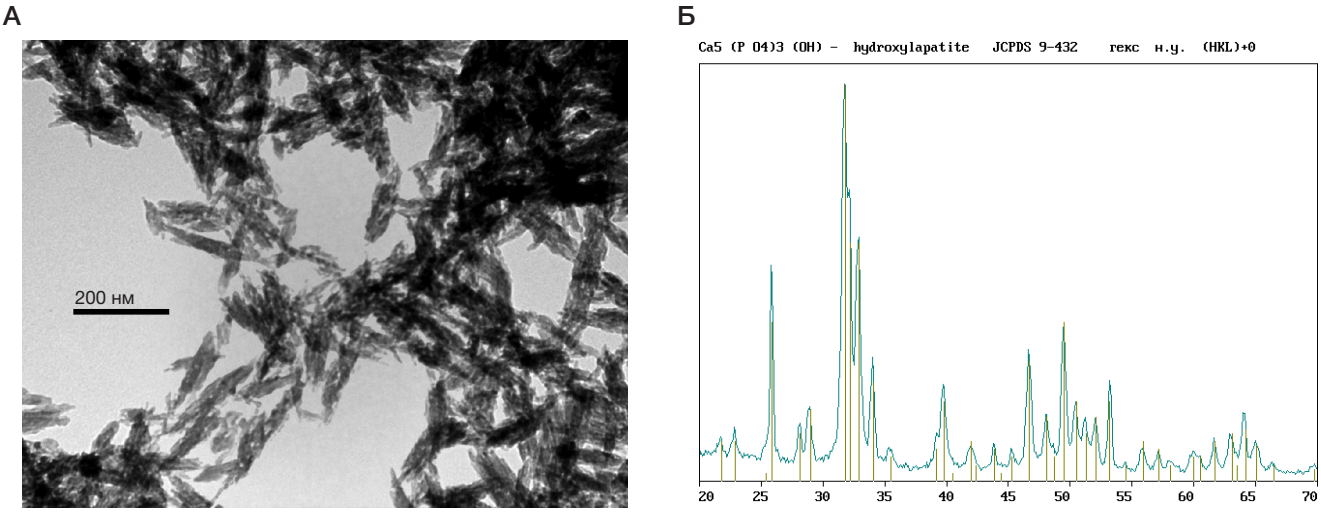


Рис. 4. Электронная микрофотография (**А**) и рентгеновская дифрактограмма (**Б**) образца НАР1, синтезированного из суспензии оксида кальция и фосфорной кислоты

Таблица 3. Средние размеры наночастиц неферментативного НАР и НАР, допированного цинком

Параметр	$НАР_1$	$НАР_{Zn1}$	$НАР_{Zn2}$	$НАР_2$
Длина, нм	120 ± 5	110 ± 5	98 ± 4	56 ± 2
Ширина, нм	36 ± 3	23 ± 2	26 ± 2	19 ± 1

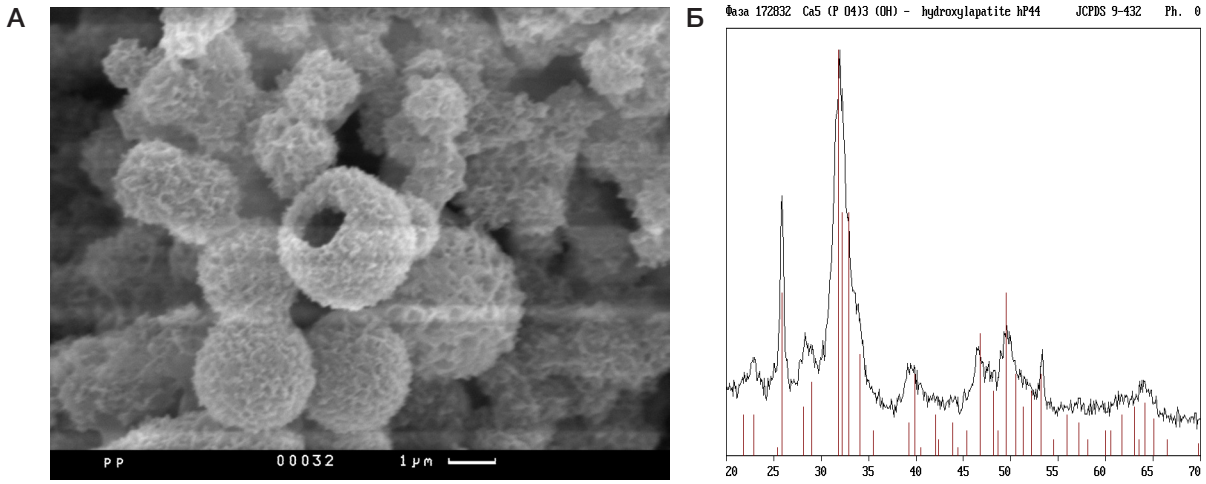


Рис. 5. Данные сканирующей электронной микроскопии (**А**) и рентгенофазового анализа (**Б**) образца (HAP_E), синтезированного из водного раствора глицерофосфата кальция (0,2 моль/л) при концентрации щелочной фосфатазы 0,1 мкг/мл

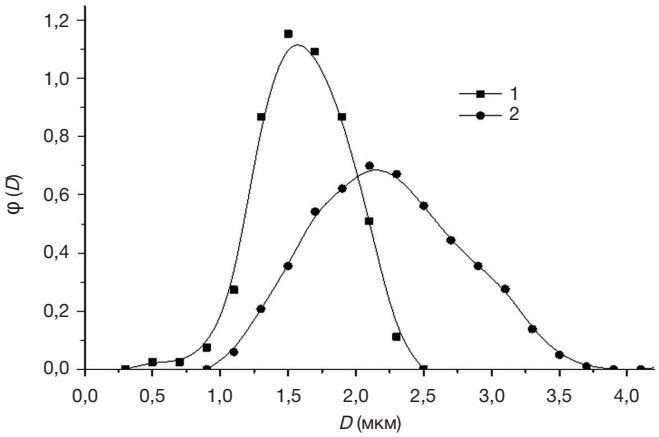


Рис. 6. Дифференциальная функция распределения по диаметру микрочастиц образца, синтезированного в трис-буфере (pH = 9,2) при добавлении щелочной фосфатазы в концентрации: 1) 0,02 мкг/мл (средний размер частиц 1,57 мкм); 2) 0,1 мкг/мл (средний размер частиц 2,22 мкм)

важнейшая роль принадлежит цинку и меди [27, 28]. Они являются кофакторами большинства регуляторных и антиоксидантных ферментов, включены в работу репаративной системы и транскрипционных факторов. Поэтому появление комплексов, содержащих короткоживущие радионуклиды этих микроэлементов, позволяет решать задачи по диагностике и терапии по отдельности и совместно. HAP может служить подложкой, обеспечивающей совместное пролонгированное действие конструкции. Как правило, для этого требуется вектор, в качестве которого оптимальны моноклональные антитела. Однако HAP сам может встраиваться в кость и костную ткань, и тогда выступает вектором доставки радиофармпрепарата. Этот процесс может иметь значение при лечении онкологических заболеваний костной ткани и злокачественных нарушениях кроветворения на уровне стволовых раковых клеток.

Удельная активность радиопрепаратов в данной работе была невысокой, поскольку эксперименты имели предварительный характер и должны были показать возможность создания и использования таких комплексов в разумный для применения в медицинских целях период времени. Имеются резервы для создания соединений большей удельной радиоактивности.

ВЫВОДЫ

Изменение размеров ^{67}Zn-BFNP вследствие агрегации качественно не влияло на функцию наночастиц, но количественно уменьшало воздействие на лейкемические клетки. Варьирование способов получения и обработки наночастиц HAP позволяет менять их сорбционную способность по отношению к ионам металлов и к лигандам и комплексам. HAP_E может быть получен с заранее заданными свойствами путем варьирования условий синтеза. Получены наночастицы HAP, представляющие собой радиопрепараты, содержащие короткоживущие изотопы цинка и меди (в виде ионов и соединений). Эти наноконструкции представляют интерес для применения при решении задач диагностики и лучевой терапии.

Литература

1. Karachunskie AI, Rumyantseva YuV, fon Shtakelberg A. Anti-CD19 monoclonal antibody in acute lymphoblastic leukemia in children. Russ J Pediatric Hematol Oncol. 2016; 3 (4): 60–72. DOI: 10.21682/2311-1267-2016-3-4-60-72.
2. Lee Y, Lin Y, Lima C. Factors Controlling the Role of Zn and Reactivity of Zn-bound Cysteines in Proteins: Application to Drug Target Discovery. J Chin Chem Soc. 2014; 61 (1): 142–50. DOI: 10.1002/jccs.201300392.
3. Chen Z, Ma L, Liu Y, Chen C. Applications of Functionalized Fullerenes in Tumor Theranostics. Theranostics. 2012; 2 (3): 238–50. DOI: 10.7150/thno.3509.
4. Mochalin VN, Shenderova O, Ho D, Gogotsi Y. The properties and applications of nanodiamonds. Nature Nanotechnol. 2011; 7 (1): 11–23. DOI: 10.1038/nnano.2011.209.
5. Meshalkin YP, Bgatova NP. Prospects and problems of using inorganic nanoparticles in oncology. J Siber Fed Univ Biol. 2008; 3 (1): 248–68.
6. Nunes C, Estevez SV, Chantada MP. Inorganic nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. J Biol Inorg Chem. 2018; (23): 331–45. DOI: org/10.1007/s00775-018-1542-z.
7. Lasis DD, Papahadjopoulos D, editors. Medical Applications of Liposomes. USA: Elsevier Sci, 2007; 779 p. DOI: 1016/B978-0-444-82917-7.X5000-5.
8. Haidary SM, Corcoles EP, Ali NK. Nanoporous Silicon as Drug Delivery Systems for Cancer Therapies. J Nanomater. 2012; ID 830503:15. DOI: 10.1155/2012/830503.
9. Ferraz MP, Monteiro FJ, Manuel CM. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. J Appl Biomater Biomechanics. 2004; 2 (2): 74–80.
10. Zhao Y, Alakhova DY, Kim JO, Bronich TK, Kabanov AV. A simple way to enhance Doxil therapy: Drug release from liposomes at the tumor site by amphiphilic block copolymer. J Control Release. 2013; 168 (1): 61–9. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.02.026.
11. Liu JH, Cao L, Luo PG et al. Fullerene-conjugated doxorubicin in cells. Acs Appl Mater Interf. 2010; (2): 1384–9.
12. Buchachenko AL, Kouznetsov DA, Breslavskaya NN, Orlova MA. Magnesium Isotope Effect in Enzymatic Phosphorylation. J Phys Chem. 2008; (112): 2548–56.
13. Orlova MA, Osipova EY, Roumiantsev SA. Effect of 67Zn-Nanoparticles on Leukemic Cells and Normal Lymphocytes. Br J Med Med Res. 2012; 2 (1): 21–30. DOI: 10.9734/BJMMR/2012/783.
14. Sun F, Zhou H, Lee J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. Acta Biomaterialia. 2011; 7 (11): 3813–28. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.07.002.
15. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. J Tissue Eng Regenerative Med. 2007; 1 (4): 245–60. DOI: 10.1002/term.24.
16. Orlova MA, Trofimova TP, Aliev RA, Orlov AP, Nikulin SV, Kalmykov SN et al. 69mZn-containing radiopharmaceuticals. A novel approach to molecular design. J Radioanal Nucl Chem. 2017; 311 (2): 1177–83. DOI: 10.1007/s10967-016-5076-y.
17. Орлов А. П., Орлова М. А., Трифонова Т. П., Осипова Е. Ю., Прошин А. Н. Действие салицилатов и солей цинка на лейкемические клетки. Известия АН, Серия химия. 2016; 65 (7): 1879–81. DOI: 10.1007/s11172-016-1525-6.
18. Safronova EV, Putlyaev VI, Sergeeva AI, Kunenkov EV, Tretyakov YD. Synthesis of Nanocrystalline Calcium Hydroxyapatite from Calcium Saccharates and Ammonium Hydrogen Phosphate. Doklady Chem. 2009; 426 (2): 118–23. DOI: 10.1134/S0012500809060020.
19. Thian ES, Konishi T, Kawanobe Y, Lim PN, Choong C, Ho B, Aizawa M. Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties. J Mater Sci: Mater Med. 2013; 24 (2): 437–45. DOI: 10.1007/s10856-012-4817-x.
20. Tang Y, Chappell HF, Dove MT, Reeder RJ, Lee YJ. Zinc incorporation into hydroxylapatite. Biomaterials. 2009; 30 (15): 2864–2872. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.043.
21. Severin AV, Pankratov DA. Synthesis of nanohydroxyapatite in the presence of iron (III) ions. Russ J Inorg Chem. 2016; 61 (1): 265–72.
22. Xu Y, Schwartz FW, Traina SJ. Sorption of Zn2+ and Cd2+ on Hydroxyapatite Surfaces. Envir Sci Technol. 1994; 28 (8): 1472–80.
23. Markovic Z, Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60). Biomaterials, 2008; (29): 3561–73.
24. Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM et al. C-60 in water: nanocrystal formation and microbial response. Environ Sci Technol. 2005; (39): 4307–16.
25. Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. Nat Biotechnol. 2003; (21): 1166–70.
26. Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West J, Colvin VL. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. Biomaterials. 2005; (26): 7587–95.
27. Colvin RA, Holmes WR, Fontainea CP, Maret W. Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. Metallomics. 2010; 2 (2): 306–17.
28. Du Y, Guo D, Wu Q, Liu D, Bi H. Zinc Chloride Inhibits Human Lens Epithelial Cell Migration and Proliferation Involved in TGF-β1 and TNF-α Signaling Pathways in HLE B-3 Cells. Biol Trace Elem Res. 2014; 159 (4): 425–43. DOI: 10.1007/s12011-014-9979-6.

References

1. Karachunskie AI, Rumyantseva YuV, fon Shtakelberg A. Anti-CD19 monoclonal antibody in acute lymphoblastic leukemia in children. Russ J Pediatric Hematol Oncol. 2016; 3 (4): 60–72. DOI: 10.21682/2311-1267-2016-3-4-60-72.
2. Lee Y, Lin Y, Lima C. Factors Controlling the Role of Zn and Reactivity of Zn-bound Cysteines in Proteins: Application to Drug Target Discovery. J Chin Chem Soc. 2014; 61 (1): 142–50. DOI: 10.1002/jccs.201300392.
3. Chen Z, Ma L, Liu Y, Chen C. Applications of Functionalized Fullerenes in Tumor Theranostics. Theranostics. 2012; 2 (3): 238–50. DOI: 10.7150/thno.3509.
4. Mochalin VN, Shenderova O, Ho D, Gogotsi Y. The properties and applications of nanodiamonds. Nature Nanotechnol. 2011; 7 (1): 11–23. DOI: 10.1038/nnano.2011.209.
5. Meshalkin YP, Bgatova NP. Prospects and problems of using inorganic nanoparticles in oncology. J Siber Fed Univ Biol. 2008; 3 (1): 248–68.
6. Nunes C, Estevez SV, Chantada MP. Inorganic nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. J Biol Inorg Chem. 2018; (23): 331–45. DOI: org/10.1007/s00775-018-1542-z.
7. Lasis DD, Papahadjopoulos D, editors. Medical Applications of Liposomes. USA: Elsevier Sci, 2007; 779 p. DOI: 1016/B978-0-444-82917-7.X5000-5.
8. Haidary SM, Corcoles EP, Ali NK. Nanoporous Silicon as Drug Delivery Systems for Cancer Therapies. J Nanomater. 2012; ID 830503:15. DOI: 10.1155/2012/830503.
9. Ferraz MP, Monteiro FJ, Manuel CM. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. J Appl Biomater Biomechanics. 2004; 2 (2): 74–80.
10. Zhao Y, Alakhova DY, Kim JO, Bronich TK, Kabanov AV. A simple way to enhance Doxil therapy: Drug release from liposomes at the tumor site by amphiphilic block copolymer. J Control Release. 2013; 168 (1): 61–9. DOI: 10.1016/j.jconrel.2013.02.026.
11. Liu JH, Cao L, Luo PG et al. Fullerene-conjugated doxorubicin in cells. Acs Appl Mater Interf. 2010; (2): 1384–9.
12. Buchachenko AL, Kouznetsov DA, Breslavskaya NN, Orlova MA. Magnesium Isotope Effect in Enzymatic Phosphorylation. J Phys Chem. 2008; (112): 2548–56.

13. Orlova MA, Osipova EY, Roumiantsev SA. Effect of 67Zn-Nanoparticles on Leukemic Cells and Normal Lymphocytes. Br J Med Med Res. 2012; 2 (1): 21–30. DOI: 10.9734/BJMMR/2012/783.
14. Sun F, Zhou H, Lee J. Various preparation methods of highly porous hydroxyapatite/polymer nanoscale biocomposites for bone regeneration. Acta Biomaterialia. 2011; 7 (11): 3813–28. DOI: 10.1016/j.actbio.2011.07.002.
15. Hutmacher DW, Schantz JT, Lam CXF, Tan KC, Lim TC. State of the art and future directions of scaffold-based bone engineering from a biomaterials perspective. J Tissue Eng Regenerative Med. 2007; 1 (4): 245–60. DOI: 10.1002/term.24.
16. Orlova MA, Trofimova TP, Aliev RA, Orlov AP, Nikulin SV, Kalmykov SN et al. 69mZn-containing radiopharmaceuticals. A novel approach to molecular design. J Radioanal Nucl Chem. 2017; 311 (2): 1177–83. DOI: 10.1007/s10967-016-5076-y.
17. Orlov AP, Orlova MA, Trofimova TP, Osipova EY, Proshin AN. Effect of salicylates and zinc salts on leukemic cells. Russ Chem Bull. 2016; 65 (7): 1879–81. DOI: 10.1007/s11172-016-1525-6.
18. Safronova EV, Putlyaev VI, Sergeeva AI, Kunenkov EV, Tretyakov YD. Synthesis of Nanocrystalline Calcium Hydroxyapatite from Calcium Saccharates and Ammonium Hydrogen Phosphate. Doklady Chem. 2009; 426 (2): 118–23. DOI: 10.1134/S0012500809060020.
19. Thian ES, Konishi T, Kawanobe Y, Lim PN, Choong C, Ho B, Aizawa M. Zinc-substituted hydroxyapatite: a biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties. J Mater Sci: Mater Med. 2013; 24 (2): 437–45. DOI: 10.1007/s10856-012-4817-x.
20. Tang Y, Chappell HF, Dove MT, Reeder RJ, Lee YJ. Zinc incorporation into hydroxylapatite. Biomaterials. 2009; 30 (15): 2864–2872. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.043.
21. Severin AV, Pankratov DA. Synthesis of nanohydroxyapatite in the presence of iron (III) ions. Russ J Inorg Chem. 2016; 61 (1): 265–72.
22. Xu Y, Schwartz FW, Traina SJ. Sorption of Zn2+ and Cd2+ on Hydroxyapatite Surfaces. Envir Sci Technol. 1994; 28 (8): 1472–80.
23. Markovic Z, Trajkovic V. Biomedical potential of the reactive oxygen species generation and quenching by fullerenes (C60). Biomaterials, 2008; (29): 3561–73.
24. Fortner JD, Lyon DY, Sayes CM, Boyd AM, Falkner JC, Hotze EM et al. C-60 in water: nanocrystal formation and microbial response. Environ Sci Technol. 2005; (39): 4307–16.
25. Colvin VL. The potential environmental impact of engineered nanomaterials. Nat Biotechnol. 2003; (21): 1166–70.
26. Sayes CM, Gobin AM, Ausman KD, Mendez J, West J, Colvin VL. Nano-C60 cytotoxicity is due to lipid peroxidation. Biomaterials. 2005; (26): 7587–95.
27. Colvin RA, Holmes WR, Fontainea CP, Maret W. Cytosolic zinc buffering and muffling: their role in intracellular zinc homeostasis. Metallomics. 2010; 2 (2): 306–17.
28. Du Y, Guo D, Wu Q, Liu D, Bi H. Zinc Chloride Inhibits Human Lens Epithelial Cell Migration and Proliferation Involved in TGF-β1 and TNF-α Signaling Pathways in HLE B-3 Cells. Biol Trace Elem Res. 2014; 159 (4): 425–43. DOI: 10.1007/s12011-014-9979-6.

ИССЛЕДОВАНИЕ КОЛЛОИДНЫХ КВАНТОВЫХ ТОЧЕК $AGINS_2$/ZNS В КАЧЕСТВЕ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫХ МЕТОК ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ: ФИЗИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА, БИОРАСПРЕДЕЛЕНИЕ И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ

М. С. Истомина[1,2] ✉, Н. А. Печникова[1,3,4], Д. В. Королев[1], Е. И. Почкаева[1], Д. С. Мазинг[2], М. М. Галагудза[1,5], В. А. Мошников[2], Е. В. Шляхто[1]

[1] Институт экспериментальной медицины ФГБУ «НМИЦ имени В. А. Алмазова», Санкт-Петербург

[2] Санкт-Петербургский государственный электротехнический университет «ЛЭТИ» имени В. И. Ульянова (Ленина), Санкт-Петербург

[3] Центр экспериментальной фармакологии, Санкт-Петербургский государственный химико-фармацевтический университет, Санкт-Петербург

[4] Зоологический институт РАН, Санкт-Петербург

[5] Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет имени И. П. Павлова, Санкт-Петербург

В последние годы отмечается повышение интереса к использованию коллоидных квантовых точек (КТ) в биологии и медицине. В частности, КТ могут представлять собой перспективные наноразмерные объекты для тераностики, при которой за счет специфического накопления нагруженных лекарственным соединением КТ в патологическом очаге происходят одновременно его визуализация и таргетное терапевтическое воздействие. Одним из ограничений использования КТ в медицине является их потенциальная токсичность, особенно если материал нанокристалла содержит такие элементы, как кадмий и свинец. В связи с этим перспективной представляется разработка меток на основе КТ относительно менее токсичных полупроводников группы I-III-VI, таких как $CuInS_2$ и $AgInS_2$. Целью работы было исследование биораспределения и биосовместимости КТ на основе соединения $AgInS_2$ в оболочке ZnS. Для этого проводили синтез КТ инжекционным методом, изучали размеры получаемых КТ, их спектры поглощения и фотолюминисценции. Методом флуоресцентного имиджинга исследовали *in vivo* биораспределение КТ. Биосовместимость образцов определяли *in vivo* по динамике изменения массы тела животных и при помощи гематологических исследований. При изучении биораспределения было выявлено накопление КТ в таких органах, как печень, легкие, сердце и почки. Показано, что КТ в диапазоне доз от $2 \cdot 10^{-7}$ до $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л при внутривенном введении крысам не оказывают значимого влияния на динамику массы тела и основные гематологические показатели на протяжении 30 дней. Таким образом, КТ на основе соединения $AgInS_2$ в оболочке ZnS могут быть использованы для визуализации тканей и органов при различных патологических процессах, а возможность иммобилизации на их поверхности лекарственных средств позволит рекомендовать их к применению для тераностики.

Ключевые слова: коллоидные квантовые точки, $AgInS_2$/ZnS, тераностика, биораспределение, биосовместимость

✉ **Для корреспонденции:** Мария Сергеевна Истомина
пр. Пархоменко, д. 15 «Б», г. Санкт-Петербург, 194156; istomina_ms@almazovcentre.ru

Статья получена: 28.07.2018 **Статья принята к печати:** 23.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.073

ZAIS-BASED COLLOIDAL QDS AS FLUORESCENT LABELS FOR THERANOSTICS: PHYSICAL PROPERTIES, BIODISTRIBUTION AND BIOCOMPATIBILITY

Istomina MS[1,2] ✉, Pechnikova NA[1,3,4], Korolev DV[1], Pochkayeva EI[1], Mazing DS[2], Galagudza MM[1,5], Moshnikov VA[2], Shlyakhto EV[1]

[1] Institute of Experimental Medicine, Almazov National Medical Research Centre, St. Petersburg

[2] Department of Micro- and Nanoelectronics, St. Petersburg State Electrotechnical University "LETI", St. Petersburg

[3] Center of Experimental Pharmacology, St. Petersburg State Chemical Pharmaceutical Academy, St. Petersburg

[4] Laboratory of Parasitic Arthropods, Zoological Institute of Russian Academy of Sciences, St. Petersburg

[5] Department of Pathophysiology, Pavlov First St. Petersburg State Medical University, St. Petersburg

In recent years there has been an increase in interest in the use of colloidal quantum dots (QDs) in biology and medicine. In particular, QDs can be a perspective nanoscale object for theranostics, in which due to the specific accumulation of drug-loaded QDs in the pathological focus, its simultaneous visualization and targeted therapeutic influence occur. One of the serious limitations of the use of QDs in medicine is their potential toxicity, especially when the nanocrystal material contains elements such as cadmium or plumbum. Therefore, it is promising to develop labels based on QDs of relatively less toxic semiconductors of group I-III-VI, such as $CuInS_2$ and $AgInS_2$. In this study, biodistribution and biocompatibility of QDs based on the $AgInS_2$ compound with a ZnS shell (ZAIS) are considered. In the study of biodistribution, the accumulation of QDs in organs such as liver, lungs, heart and kidneys was revealed. It was shown that QDs in the dose range from $2 \cdot 10^{-7}$ to $4 \cdot 10^{-6}$ M/L at intravenous administration in rats does not have a significant effect on body mass dynamics and basic hematological parameters for 30 days. Thus, ZAIS QDs can be used to visualize tissues and organs in various pathological processes, and immobilization of the drugs on their surface will allow to approach their application for theranostics.

Keywords: colloidal quantum dots, QDs, ZnS-$AgInS_2$, ZAIS, theranostics, biodistribution, biocompatibility

✉ **Correspondence should be addressed:** Maria S. Istomina
Parkhomenko 15 B, St. Petersburg, 194156; istominams1993@mail.ru

Received: 28.07.2018 **Accepted:** 23.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.073

В последнее время активно развивается новый подход к разработке фармацевтических композиций, заключающийся в попытке одновременно решить терапевтические и диагностические задачи [1]. Для этого в качестве диагностических маркеров можно использовать различные флуорофоры [2]. В настоящее время лишь два флуорофора разрешены для клинического применения: индоцианин зеленый и различные комбинации флуоресцеина [3]. При этом флуоресцентные красители имеют существенный недостаток — они выгорают со временем. Материалом, лишенным такого недостатка, являются коллоидные квантовые точки (КТ) [4]. При этом многие КТ обладают токсическими свойствами [5]: кристаллические ядра материалов токсичны при использовании в биомедицине. Нередко в структурах типа «ядро/оболочка» ядром является соединение с тяжелым металлом, а оболочка не полностью покрывает ядро или может быть разрушена, что приводит к высвобождению ионов тяжелых металлов в организм. Было высказано предположение, что токсичность КТ может быть также связана с физико-химическими свойствами оболочек, природой поверхностных «лигандов» (обеспечивающих коллоидную стабильность), наличием других модификаций поверхности и взаимодействием с различными молекулами (например, белками), присутствующими в биологических средах [6–11]. Поэтому важной практической задачей является разработка нетоксичных КТ и изучение их биосовместимости. Результаты исследований, проведенных в последние годы, показывают, что модификация поверхности КТ либо использование КТ определенного состава сопровождаются значительным повышением биосовместимости данных объектов. Так, КТ на основе CdSe/ZnS, конъюгированные с трипептидом аргинин — глицин — аспарагиновая кислота (RGD), при системном введении мышам не показали токсических свойств, подтверждаемых гистологическим исследованием, а анализ образцов тканей при помощи масс-спектрометрии не выявил Cd^{2+} [12]. В другой работе оболочку из биосовместимых сополимеров на основе 2-(2-метоксиэтокси)этилметакрилата и олиго(этиленгликоль)метакрилата выращивали на поверхности квантовых точек ZnO путем поверхностной инициированной радикальной полимеризации [13]. При оценке цитотоксичности по отношению к клеткам HT29 рака толстой кишки человека было показано, что КТ с полимерным покрытием практически не проявляли токсичности при концентрациях до 12,5 мкг/мл, тогда как при загрузке доксорубицином наблюдались высокая цитотоксичность и снижение жизнеспособности раковых клеток HT29. Получены и детально охарактеризованы нанокомпозиты, содержащие КТ селенида серебра со средним размером 11,4–12,7 нм, люминесцирующие в области прозрачности биологических тканей (705 нм) [14]. Отсутствия токсических свойств материалов достигали использованием стабилизирующего потенциала природного полисахарида галактоманнана, а также простым экологичным способом генерирования высокореакционноспособных селенид-анионов, выступающих в качестве селенирующего агента. Нетоксичны также углеродные квантовые точки и их сочетания с различными наночастицами, например, на основе железа [15].

Особый интерес представляют КТ, не содержащие потенциально токсичных элементов в своем составе. К таким КТ относятся, в частности, КТ на основе соединения $AgInS_2$ в оболочке ZnS. Целью настоящей работы было изучить физические свойства, биораспределение и биосовместимость КТ на основе $AgInS_2$/ZnS.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез коллоидных КТ

Химический синтез коллоидных КТ $AgInS_2$/ZnS осуществляли инжекционным методом в водной среде. Для достижения баланса реакционной способности катионов индия и серебра в синтезе применяли такие лиганды, как L-глутатион и цитрат натрия. Прекурсоры нитрата серебра — $AgNO_3$ (0,005 ммоль) и нитрата индия — $In(NO_3)_3 \cdot 4{,}5H_2O$ (0,02 ммоль) помещали и растворяли в 5 мл дистиллированной воды в колбе объемом 10 мл. Последовательно в данный раствор добавляли 0,01 ммоль L-глутатиона и 0,08 ммоль цитрата натрия (200 мкл водного раствора). Анионный прекурсорный раствор представлял собой 0,04 ммоль $Na_2S \cdot 9H_2O$ в 500 мкл дистиллированной воды. В исходный раствор инжектировали прекурсорный раствор серы при комнатной температуре, затем с помощью колбонагревателя производили нагрев до 95 °C в течение 40 мин. Для создания оболочки, состоящей из сульфида цинка, в 200 мкл дистиллированной воды растворяли 0,02 ммоль нитрата цинка ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) и 0,02 ммоль сульфида натрия ($Na_2S \cdot 9H_2O$). После охлаждения исходного раствора ядер нанокристаллов до комнатной температуры в него вводили одновременно прекурсорный раствор нитрата цинка и сульфида натрия (покапельно), затем нагревали до 95 °C в течение 40 мин. Для выделения частиц из исходного раствора добавляли изопропиловый спирт с последующим центрифугированием.

Оценка физических свойств КТ

Оценку размеров КТ осуществляли методом динамического рассеяния света с помощью лазерного анализатора размера частиц SZ100 (Horiba Jobin Yvon, Kyoto; Japan) с диапазоном измерения диаметров наночастиц 0,3–8 мкм. Оптические спектры (поглощения) образцов измеряли с использованием спектрофотометра PE-5400UV (ECROSKHIM

Таблица. Группы животных и концентрации вводимых веществ для исследования биосовместимости КТ

Обозначение группы	Вводимое вещество	Концентрация вводимого вещества, моль/л	Доза действующего вещества, мл	Время проведения эксперимента, дни	Количествово животных в группе
КТ-L(15)	КТ	$4 \cdot 10^{-6}$	1	15	5
КТ-M(15)	КТ	$2 \cdot 10^{-6}$	1	15	5
КТ-S(15)	КТ	$2 \cdot 10^{-7}$	1	15	5
Контроль	NaCl	–	1	30	5
КТ-L(30)	КТ	$4 \cdot 10^{-6}$	1	30	5
КТ-M(30)	КТ	$2 \cdot 10^{-6}$	1	30	5
КТ-S(30)	КТ	$2 \cdot 10^{-7}$	1	30	5

Co., Ltd; Russia), а спектры фотолюминесценции получали с использованием специально разработанного спектрофлуориметра на основе монохроматора МДР-206 (Lomo Fotonika; Russia).

Оценка биораспределения КТ

Флуоресцентный имиджинг образцов органов животных, полученных через 1 и 24 ч после внутривенного введения КТ, проводили на приборе IVIS Lumina LT Series III (Perkin Elmer; США). Для квантовых точек $AgInS_2/ZnS$ после предварительного исследования спектров поглощения и фотолюминесценции подбирали оптимальные фильтры на флуоресцентном имиджере. Длина волны возбуждения данных КТ составила 535 ± 20 нм, эмиссии — 655 ± 20 нм.

Исследование биосовместимости КТ

Оценку биосовместимости проводили на крысах-самцах стока Wistar SPF-категории (питомник лабораторных животных «Пущино»; Россия). Масса тела животных составляла 235 ± 23 г. Исследуемые КТ вводили в течение 3 мин в латеральную хвостовую вену. Формирование групп животных и их краткая характеристика представлены в таблице. Для идентификации квантовых точек и их концентраций вводили следующие обозначения: концентрация КТ 3,7 • 10^{-9} моль/кг — L (large), 1,85 • 10^{-9} моль/к — M (medium), 1,85 • 10^{-10} моль/кг — S (small). Через 15 и 30 дней после внутривенного введения КТ у животных регистрировали гематологические показатели, динамику массы тела, а также вели учет погибших животных.

Гематологические исследования

Гематологические исследования проводили на гематологическом анализаторе URIT-3000 Vet Plus (URIT Medical Electronic; China). Для оценки воздействия КТ на организм обращали внимание на следующие гематологические показатели: эритроциты (RBC), средний объем эритроцитов (MCV), лейкоциты (WBC), гемоглобин (HBG), среднее содержание гемоглобина в эритроцитах (MCHC), средний объем эритроцита (MCH), средний объем тромбоцитов (MPV), гематокрит (HCT), абсолютное содержание тромбоцитов (PLT).

Статистический анализ

Методами дисперсионного анализа для повторных измерений была проведена проверка гипотезы о равенстве средневыборочных величин в нескольких зависимых выборках, значения динамики массы и гематологических показателей в группах — методами непараметрической статистики с указанием медианы, 25-го и 75-го процентилей (Me (25%–75%)). Проверку гипотезы о равенстве средневыборочных величин в независимых выборках проводили с использованием критерия Манна–Уитни. Статистически значимыми считали различия при уровне значимости $p < 0,05$. Вычисления

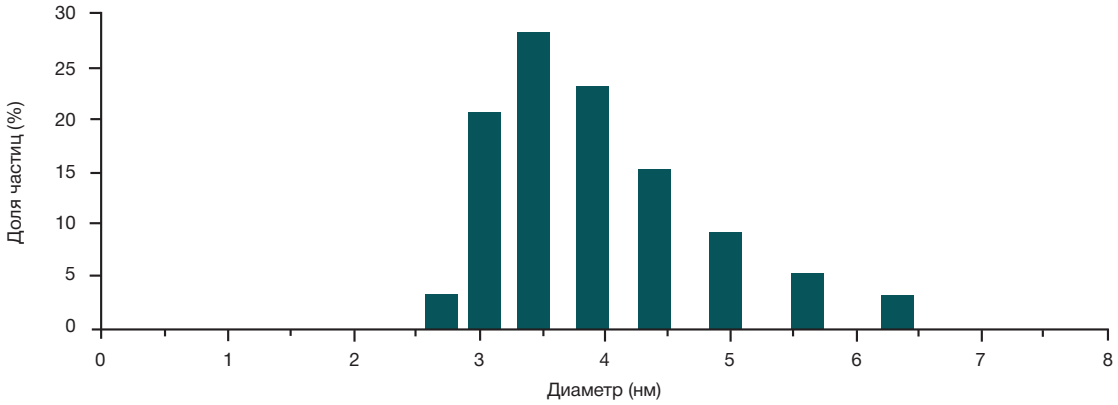


Рис. 1. Гистограмма распределения диаметров КТ $AgInS_2/ZnS$ при исследовании методом динамического светорассеяния

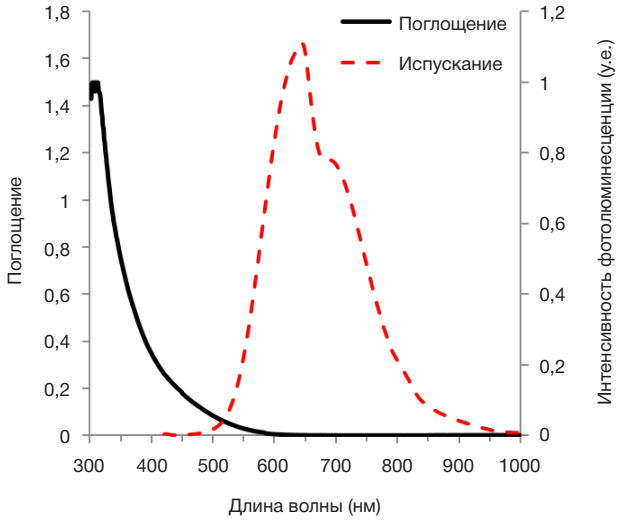


Рис. 2. Спектры поглощения и фотолюминесценции нанокристаллов $AgInS_2/ZnS$ в дистиллированной воде

производили в программе GraphPad Prism 7.04 (GraphPad Software Inc; США).

Работа выполнена с применением оборудования ресурсных центров «Оптические и лазерные методы исследования вещества» и «Инновационные технологии композитных наноматериалов» Санкт-Петербургского государственного университета.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Характеристика КТ $AgInS_2$/ZnS

Результаты исследования КТ методом динамического светорассеяния показано на рис. 1. Наибольшая доля КТ имела средний радиус от 3,0 до 4,5 нм.

На рис. 2 представлены спектры экстинкции и фотолюминесценции водной дисперсии квантовых точек $AgInS_2$/ZnS. Дисперсия КТ показала пик эмиссии при 627 нм.

Спектр фотолюминесценции отличают заметная несимметричность и достаточно большое значение полуширины на полувысоте. Вместе с большим стоксовым сдвигом это свидетельствует о механизме фотолюминесценции за счет дефектов — внутренних и, возможно, поверхностных [16–19]. В этом случае полуширина спектра может зависеть не только от распределения частиц по размерам, но и от распределения и природы дефектов в нанокристаллах [20]. Спектр поглощения не содержит ярко выраженных точек перегиба или максимумов, что в целом характерно для нанокристаллов тройных халькогенидов металлов [16, 21].

Биораспределение КТ

С помощью флуоресцентного визуализатора IVIS Lumina LT Series III была проведена предварительная оценка биораспределения КТ в органах *ex vivo* через 1 и 24 ч после внутривенного введения КТ в дозе 4 • 10^{-6} моль/л (рис. 3).

При исследовании биораспределения КТ на основе $AgInS_2$/ZnS было отмечено накопление наночастиц с течением времени в таких органах, как печень, почки, легкие и сердце. Интенсивность флуоресценции печени через 24 ч после введения КТ была значимо выше, чем через 1 ч после введения, что свидетельствует о накоплении КТ в печени в течение первых суток после введения, тогда как значимых различий уровня флуоресценции в других органах в точках 1 ч и 24 ч отмечено не было.

Масса тела животных

Динамика массы тела у животных всех опытных групп представлена на рис. 4.

Статистический анализ данных показал отсутствие значимых различий массы тела животных подопытных групп в сравнении с контролем в течение всего эксперимента ($p > 0,05$).

Гематологическое исследование

Основные гематологические параметры, измеренные на 15-й и 30-й день после введения КТ, представлены на рис. 5.

Изменения гематологических показателей подопытных групп не показали достоверной разницы в сравнении с контрольной группой ($p > 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

КТ представляют собой отличную альтернативу традиционным органическим флуорофорам, поскольку их размер, химические характеристики поверхности,

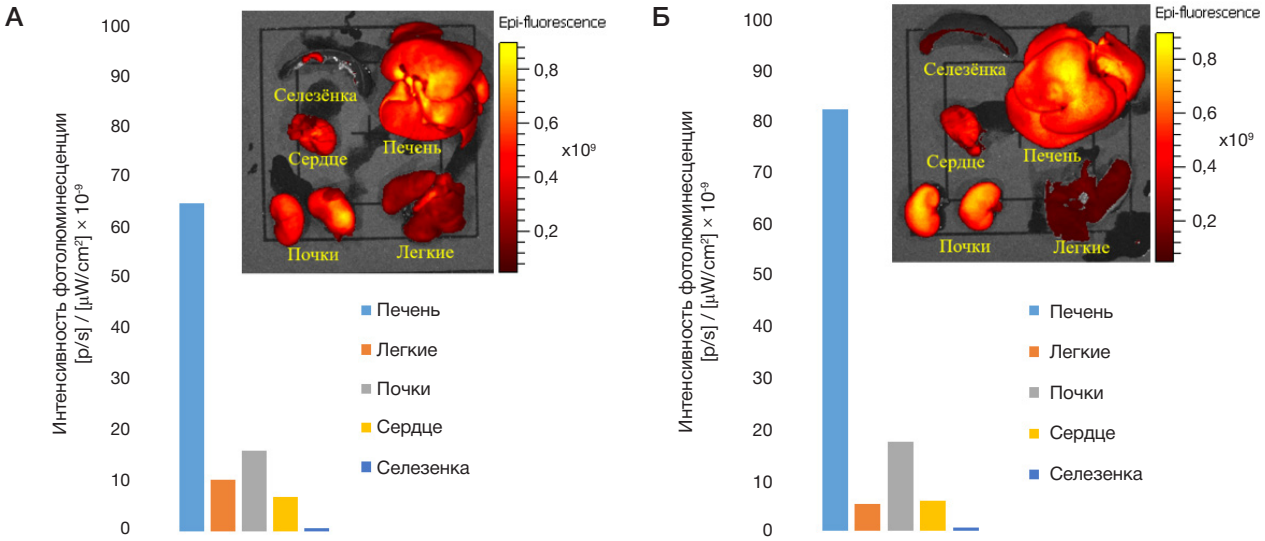


Рис. 3. Визуализация интенсивности флуоресцентного излучения в органах крысы через 1 ч (**А**) и через 24 ч (**Б**) после введения КТ $AgInS_2$/ZnS

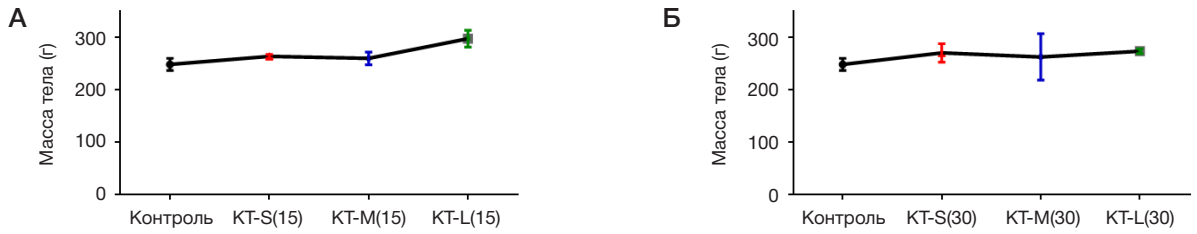


Рис. 4. Динамика массы тела животных

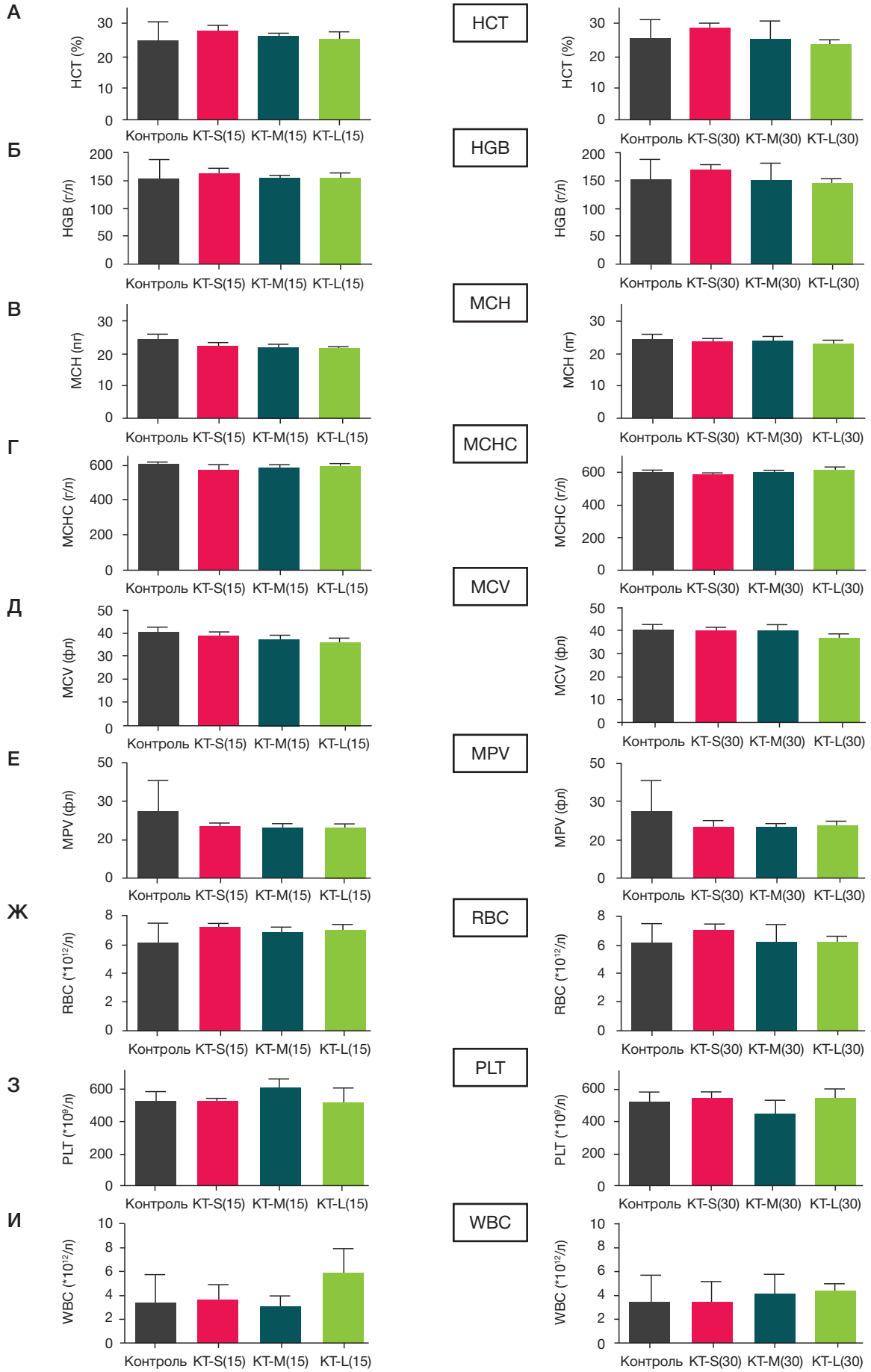


Рис. 5. Результаты исследования гематологических показателей в контроле и через 15 и 30 дней после внутривенного введения КТ в различных дозах

спектральные свойства и стабильность могут быть легко настроены для оптимизации визуализации *in vivo/in vitro*. На данный момент в биомедицине КТ разрабатывают и применяют для различных целей, таких как доставка лекарств, диагностические процедуры, визуализация опухолей [21–30]. Следует отметить, что проблемы биораспределения квантовых точек в настоящее время широко исследуют: по данным ряда авторов, их применение в качестве маркеров клеток для визуализации опухолей разных тканей имеет положительные результаты [31–36]. Основными органами-мишенями, в которых происходит накопление квантовых точек, являются печень, почки и селезенка [37–39], легкие [40], кожа, желудочно-кишечный тракт и мочевой пузырь [41], помимо этого, квантовые точки обнаруживаются в лимфатических узлах [42]. В настоящей работе синтезированные инжекционным методом в водной среде коллоидные КТ были использованы для *ex vivo* визуализации биологического распределения. Полученные нами данные позволяют предположить, что КТ на основе $AgInS_2$/ZnS обладают существенной тропностью к печени, о чем свидетельствует повышение интенсивности флуоресценции с 1 до 24 ч после внутривенного введения. КТ в диапазоне доз от $2 \cdot 10^{-7}$ до $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л не обладали системной токсичностью, что подтверждается отсутствием существенных изменений в динамике массы тела и достоверных различий по гематологическим показателям, а также отсутствием гибели животных в течение 30 дней после введения. Учитывая тот момент, что в большинстве случаев экспериментальные образцы КТ на основе Cd/Se-ZnS [43] обладают выраженной системной токсичностью, что сказывается, в частности, на гематологических показателях [44], можно предположить, что КТ $AgInS_2$/ZnS после дополнительного тестирования на животных могут быть применены в качестве флоурофоров в медицинской практике, а возможность иммобилизации на их поверхности лекарственных средств позволит использовать их для тераностики.

ВЫВОДЫ

Коллоидные КТ $AgInS_2$/ZnS, полученные инжекционным методом в водной среде, при исследовании биолюминесценции, проявили себя как стабильные структуры, которые могут быть использованы в продолжительных исследованиях. Оценка биораспределения КТ показала, что они имеют свойство накапливаться в таких органах, как печень, легкие, сердце и почки. Исследование биологической совместимости КТ показало, что в диапазоне доз от $2 \cdot 10^{-7}$ до $4 \cdot 10^{-6}$ моль/л при внутривенном введении крысам КТ не оказывают значимого влияния на динамику массы тела и основные гематологические показатели на протяжении 30 дней.

Литература

1. Мелерзанов А., Москалев А., Жаров В. Прецизионная медицина и молекулярная тераностика. Врач. 2016; (12): 11–14.
2. Гареев К. Г., Бабикова К. Ю., Наумышева Е. Б., Постнов В. Н., Королев Д. В. Синтез наноматериалов с флуоресцентной меткой для медицинского назначения. Биотехносфера. 2017; 3 (51): 61–8.
3. Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. Chem Rev. 2010; 110 (5): 2620–40.
4. Истомина М. С., Королев Д. В., Почкаева Е. И., Мазинг Д. С., Мошников В. А., Гареев К. Г., Бабикова К. Ю., Постнов В. Н. исследование возможности использования коллоидных квантовых точек на основе AgInS2/ZnS для флуоресцентного имиджинга в сравнении с флуорофорами, закрепленными на поверхности наночастиц. Трансляционная медицина. 2017; 4 (4): 56–65.
5. Oh E, Liu R, Nel A, Gemill KB, Bilal M, Cohen Y, Medintz IL. Meta-analysis of cellular toxicity for cadmium-containing quantum dots. Nature nanotechnology. 2016; (11): 479–86.
6. Tsoi KM, Dai Q, Alman BA, Chan WCW. Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. Acc Chem Res. 2013; (46): 662–71.
7. Ye L, Yong KT, Liu L et al. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. Nature Nanotech. 2012; (7): 453–8.
8. Winnik FM, Maysinger D. Quantum dot cytotoxicity and ways to reduce it. Acc Chem Res. 2013; (46): 672–80.
9. Ding Ya et al. Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. Molecular therapy. 2014; 22 (6): 1075–83.
10. Fitzpatrick JA. Andreko SK, Ernst LA, Waggoner AS, Ballou B, Bruchez MP. Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots in vivo. Nano Lett. 2009; (9): 2736–41.
11. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. Nature Mater. 2009; 8 (7): 543–57.
12. Li MM, Cao J, Yang JC, Shen YJ, Cai XL, Chen YW et al. Biodistribution and toxicity assessment of intratumorally injected arginine-glycine-aspartic acid peptide conjugated to CdSe/ZnS quantum dots in mice bearing pancreatic neoplasm. Chem Biol Interact. 2018; (291): 103–10.
13. Dine EJ, Marchal S, Schneider R, Hamie B, Ghanbaja J, Roques-Carmes T et al. A facile approach for doxorubicine delivery in cancer cells by responsive and fluorescent core/shell quantum dots. Bioconjug Chem. 2018; 29 (7): 2248–56.
14. Лесничая М. В., Сухов Б. Г., Шендрик Р. Ю., Сапожников А. Н., Трофимов Б. А. Синтез водорастворимых квантовых точек селенида серебра, люминесцирующих в окне прозрачности биологических тканей. Журнал общей химии. 2018; 88 (2): 307–10.
15. Huang Y, Gao Y, Zhang Q, Zhang Y, Cao JJ, Ho W et al. Biocompatible FeOOH-Carbon quantum dots nanocomposites for gaseous NOx removal under visible light: Improved charge separation and High selectivity. J Hazard Mater. 2018; (354): 54–62.
16. Drobintseva A, Polyakova V, Matyushkin L, Krylova Y, Masing D, Aleksandrova OA et al. Characterization of ZnSe/ZnS QD Conjugated with Antibody Labeling Kisspeptins. In 3-rd Int. Conf. of BioPhotonics, Florence, Italy. 2015.
17. Alivisatos AP, Gu W, Larabell C. Quantum dots as cellular probes. Annu Rev Biomed Eng. 2005; (7): 55–76.
18. Somers RC, Bawendi MG, Nocera DG. CdSe nanocrystal based chem-/bio-sensors. Chemical Society Reviews. 2007; 36 (4): 579–91.
19. Shamirian A, Appelbe O, Zhang Q, Ganesh B, Kron SJ, Snee PT. A toolkit for bioimaging using near-infrared AgInS2/ZnS quantum dots. Journal of Materials Chemistry B. 2015; 3 (41): 8188–96.
20. Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. Science. 1998; 281 (5385): 2013–6.
21. Chan WCW, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. Science. 1998; 281 (5385): 2016–8.
22. Tyrakowski CM, Snee PT. A primer on the synthesis, water-solubilization, and functionalization of quantum dots, their use as biological sensing agents, and present status Physical Chemistry Chemical Physics. 2014; 16 (3): 837–55.
23. Yaghini E, Turner HD, Le Marois AM, Suhling K, Naasani I, MacRobert AJ. In vivo biodistribution studies and ex vivo lymph

node imaging using heavy metal-free quantum dots. Biomaterials. 2016; (104): 182–91.
24. Matea CT, Mocan T, Tabaran F, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. International Journal of Nanomedicine. 2017; (12): 5421–31.
25. Wang L-W, Peng C-W, Chen C, Li Y. Quantum dots-based tissue and in vivo imaging in breast cancer researches: current status and future perspectives. Breast Cancer Research and Treatment. 2015; 151 (1): 7–17.
26. Wegner KD, Hildebrandt N. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. Chemical Society Reviews. 2015; 44 (14): 4792–834.
27. Walling MA, Novak JA, Shepard JRE. Quantum Dots for live cell and in vivo imaging. International Journal of Molecular Sciences. 2009; 10 (2): 441–91.
28. Kang Yan-Fei et al. Carbon quantum dots for zebrafish fluorescence imaging. Scientific reports. 2005; (5): 11835.
29. Xu G, Lin G, Lin S, Wu N, Deng Y, Feng G et al. The Reproductive Toxicity of CdSe/ZnS Quantum Dots on the in vivo Ovarian Function and in vitro Fertilization. Scientific reports. 2016; (6): 37677.
30. Tang H, Yang ST, Yang YF, Ke DM, Liu JH, Chen X et al. Blood clearance, distribution, transformation, excretion, and toxicity of near-infrared quantum dots Ag2Se in mice. ACS applied materials & interfaces. 2018; 8 (28): 17859–69.
31. Wang C, Gao X, Su X. In vitro and in vivo imaging with quantum dots. Analytical and bioanalytical chemistry. 2010; 397 (4): 1397–415.
32. Gao J, Chen K, Xie R et al. In Vivo Tumor-targeted fluorescence imaging using near-infrared non-cadmium quantum dots. Bioconjugate chemistry. 2010; 21 (4): 604–9.
33. Liu X, Zhou P, Zhan H, Liu H, Zhang J et al. Synthesis and characterization of near–infrared-emitting CdHgTe/CdS/ZnS quantum dots capped by N-acetyl-L-cysteine for in vitro and in vivo imaging. RSC Advances. 2017; 7 (48): 29998–30007.
34. Lin G et al. Passive tumor targeting and imaging by using mercaptosuccinic acid-coated near-infrared quantum dots. International journal of nanomedicine. 2015; (10): 335.
35. Singh SK et al. Drug delivery approaches for breast cancer. International journal of nanomedicine. 2017; (12): 6205.
36. Han X, Wang Y, Shi D. Preparation of QDs@ SiO2/polystyrene composite particles for cancer cells detection. Nano LIFE. 2018.
37. Jain S et al. Applications of Fluorescent Quantum Dots for Reproductive Medicine and Disease Detection. In: Park SB, editor. Rijeka: IntechOpen, 2018; 6.
38. Schipper ML, Iyer G, Koh AL, Cheng Z, Ebenstein Y, Aharoni A et al. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. Small. 2009; 5 (1): 126–34.
39. Yang L, Kuang H, Zhang W, Wei H, Xu H. Quantum dots cause acute systemic toxicity in lactating rats and growth restriction of offspring. Nanoscale. 2018; 10 (24): 11564–77.
40. Roberts JR, Antonini JM, Porter DW et al. Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. Particle and Fibre Toxicology. 2013; (10): 5.
41. Park Y, Ryu YM, Jung Y et al. Spraying quantum dot conjugates in the colon of live animals enabled rapid and multiplex cancer diagnosis using endoscopy. ACS nano. 2014; 8 (9): 8896–910.
42. Salykina YF, Zherdeva VV, Dezhurov SV et al. Biodistribution and clearance of quantum dots in small animals. Saratov Fall Meeting 2010: Optical Technologies in Biophysics and Medicine. 2011; (12): 7999.
43. Roberts JR, Antonini JM, Porter DW et al. Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. Particle and Fibre Toxicology. 2013; 10 (5).
44. Park Y, Ryu YM, Jung Y et al. Spraying quantum dot conjugates in the colon of live animals enabled rapid and multiplex cancer diagnosis using endoscopy. ACS Nano. 2014; 7 (1): 9309.

References

1. Melerzanov A, Moskalev A, Zharov V. Precizionnaja medicina i molekuljarnaja teranostika. Vrach. 2016; (12): 11–14.
2. Gareev KG, Babikova KJu, Naumysheva EB, Postnov VN, Korolev DV. Sintez nanomaterialov s fluorescentnoj metkoj dlja medicinskogo naznachenija. Biotehnosfera. 2017; 3 (51): 61–8.
3. Kobayashi H, Ogawa M, Alford R, Choyke PL, Urano Y. New Strategies for Fluorescent Probe Design in Medical Diagnostic Imaging. Chem Rev. 2010; 110 (5): 2620–40.
4. Istomina MS, Korolev DV, Pochkaeva EI, Mazing DS, Moshnikov VA, Gareev KG, Babikova KJu, Postnov VN. issledovanie vozmozhnosti ispol'zovanija kolloidnyh kvantovyh tochek na osnove AgInS2/ZnS dlja fluorescentnogo imidzhinga v sravnenii s fluoroforami, zakreplennymi na poverhnosti nanochastic. Transljacionnaja medicina. 2017; 4 (4): 56–65.
5. Oh E, Liu R, Nel A, Gemill KB, Bilal M, Cohen Y, Medintz IL. Meta-analysis of cellular toxicity for cadmium-containing quantum dots. Nature nanotechnology. 2016; (11): 479–86.
6. Tsoi KM, Dai Q, Alman BA, Chan WCW. Are quantum dots toxic? Exploring the discrepancy between cell culture and animal studies. Acc Chem Res. 2013; (46): 662–71.
7. Ye L, Yong KT, Liu L et al. A pilot study in non-human primates shows no adverse response to intravenous injection of quantum dots. Nature Nanotech. 2012; (7): 453–8.
8. Winnik FM, Maysinger D. Quantum dot cytotoxicity and ways to reduce it. Acc Chem Res. 2013; (46): 672–80.
9. Ding Ya et al. Gold nanoparticles for nucleic acid delivery. Molecular therapy. 2014; 22 (6): 1075–83.
10. Fitzpatrick JA. Andreko SK, Ernst LA, Waggoner AS, Ballou B, Bruchez MP. Long-term persistence and spectral blue shifting of quantum dots in vivo. Nano Lett. 2009; (9): 2736–41.
11. Nel AE, Mädler L, Velegol D, Xia T, Hoek EM, Somasundaran P et al. Understanding biophysicochemical interactions at the nano–bio interface. Nature Mater. 2009; 8 (7): 543–57.
12. Li MM, Cao J, Yang JC, Shen YJ, Cai XL, Chen YW et al. Biodistribution and toxicity assessment of intratumorally injected arginine-glycine-aspartic acid peptide conjugated to CdSe/ZnS quantum dots in mice bearing pancreatic neoplasm. Chem Biol Interact. 2018; (291): 103–10.
13. Dine EJ, Marchal S, Schneider R, Hamie B, Ghanbaja J, Roques-Carmes T et al. A facile approach for doxorubicine delivery in cancer cells by responsive and fluorescent core/shell quantum dots. Bioconjug Chem. 2018; 29 (7): 2248–56.
14. Lesnichaja MV, Suhov BG, Shendrik RJu, Sapozhnikov AN, Trofimov BA. Sintez vodorastvorimyh kvantovyh tochek selenida serebra, ljuminescirujushhih v okne prozrachnosti biologicheskih tkanej. Zhurnal obshhej himii. 2018; 88 (2): 307–10.
15. Huang Y, Gao Y, Zhang Q, Zhang Y, Cao JJ, Ho W et al. Biocompatible FeOOH-Carbon quantum dots nanocomposites for gaseous NOx removal under visible light: Improved charge separation and High selectivity. J Hazard Mater. 2018; (354): 54–62.
16. Drobintseva A, Polyakova V, Matyushkin L, Krylova Y, Masing D, Aleksandrova OA et al. Characterization of ZnSe/ZnS QD Conjugated with Antibody Labeling Kisspeptins. In 3-rd Int. Conf. of BioPhotonics, Florence, Italy. 2015.
17. Alivisatos AP, Gu W, Larabell C. Quantum dots as cellular probes. Annu Rev Biomed Eng. 2005; (7): 55–76.
18. Somers RC, Bawendi MG, Nocera DG. CdSe nanocrystal based chem-/bio-sensors. Chemical Society Reviews. 2007; 36 (4): 579–91.
19. Shamirian A, Appelbe O, Zhang Q, Ganesh B, Kron SJ, Snee PT. A toolkit for bioimaging using near-infrared AgInS2/ZnS quantum dots. Journal of Materials Chemistry B. 2015; 3 (41): 8188–96.
20. Bruchez M, Moronne M, Gin P, Weiss S, Alivisatos AP. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. Science. 1998; 281 (5385): 2013–6.
21. Chan WCW, Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. Science. 1998; 281 (5385): 2016–8.

22. Tyrakowski CM, Snee PT. A primer on the synthesis, water-solubilization, and functionalization of quantum dots, their use as biological sensing agents, and present status Physical Chemistry Chemical Physics. 2014; 16 (3): 837–55.
23. Yaghini E, Turner HD, Le Marois AM, Suhling K, Naasani I, MacRobert AJ. In vivo biodistribution studies and ex vivo lymph node imaging using heavy metal-free quantum dots. Biomaterials. 2016; (104): 182–91.
24. Matea CT, Mocan T, Tabaran F, et al. Quantum dots in imaging, drug delivery and sensor applications. International Journal of Nanomedicine. 2017; (12): 5421–31.
25. Wang L-W, Peng C-W, Chen C, Li Y. Quantum dots-based tissue and in vivo imaging in breast cancer researches: current status and future perspectives. Breast Cancer Research and Treatment. 2015; 151 (1): 7–17.
26. Wegner KD, Hildebrandt N. Quantum dots: bright and versatile in vitro and in vivo fluorescence imaging biosensors. Chemical Society Reviews. 2015; 44 (14): 4792–834.
27. Walling MA, Novak JA, Shepard JRE. Quantum Dots for live cell and in vivo imaging. International Journal of Molecular Sciences. 2009; 10 (2): 441–91.
28. Kang Yan-Fei et al. Carbon quantum dots for zebrafish fluorescence imaging. Scientific reports. 2005; (5): 11835.
29. Xu G, Lin G, Lin S, Wu N, Deng Y, Feng G et al. The Reproductive Toxicity of CdSe/ZnS Quantum Dots on the in vivo Ovarian Function and in vitro Fertilization. Scientific reports. 2016; (6): 37677.
30. Tang H, Yang ST, Yang YF, Ke DM, Liu JH, Chen X et al. Blood clearance, distribution, transformation, excretion, and toxicity of near-infrared quantum dots Ag2Se in mice. ACS applied materials & interfaces. 2018; 8 (28): 17859–69.
31. Wang C, Gao X, Su X. In vitro and in vivo imaging with quantum dots. Analytical and bioanalytical chemistry. 2010; 397 (4): 1397–415.
32. Gao J, Chen K, Xie R et al. In Vivo Tumor-targeted fluorescence imaging using near-infrared non-cadmium quantum dots. Bioconjugate chemistry. 2010; 21 (4): 604–9.
33. Liu X, Zhou P, Zhan H, Liu H, Zhang J et al. Synthesis and characterization of near–infrared-emitting CdHgTe/CdS/ZnS quantum dots capped by N-acetyl-L-cysteine for in vitro and in vivo imaging. RSC Advances. 2017; 7 (48): 29998–30007.
34. Lin G et al. Passive tumor targeting and imaging by using mercaptosuccinic acid-coated near-infrared quantum dots. International journal of nanomedicine. 2015; (10): 335.
35. Singh SK et al. Drug delivery approaches for breast cancer. International journal of nanomedicine. 2017; (12): 6205.
36. Han X, Wang Y, Shi D. Preparation of QDs@ SiO2/polystyrene composite particles for cancer cells detection. Nano LIFE. 2018.
37. Jain S et al. Applications of Fluorescent Quantum Dots for Reproductive Medicine and Disease Detection. In: Park SB, editor. Rijeka: IntechOpen, 2018; 6.
38. Schipper ML, Iyer G, Koh AL, Cheng Z, Ebenstein Y, Aharoni A et al. Particle size, surface coating, and PEGylation influence the biodistribution of quantum dots in living mice. Small. 2009; 5 (1): 126–34.
39. Yang L, Kuang H, Zhang W, Wei H, Xu H. Quantum dots cause acute systemic toxicity in lactating rats and growth restriction of offspring. Nanoscale. 2018; 10 (24): 11564–77.
40. Roberts JR, Antonini JM, Porter DW et al. Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. Particle and Fibre Toxicology. 2013; (10): 5.
41. Park Y, Ryu YM, Jung Y et al. Spraying quantum dot conjugates in the colon of live animals enabled rapid and multiplex cancer diagnosis using endoscopy. ACS nano. 2014; 8 (9): 8896–910.
42. Salykina YF, Zherdeva VV, Dezhurov SV et al. Biodistribution and clearance of quantum dots in small animals. Saratov Fall Meeting 2010: Optical Technologies in Biophysics and Medicine. 2011; (12): 7999.
43. Roberts JR, Antonini JM, Porter DW et al. Lung toxicity and biodistribution of Cd/Se-ZnS quantum dots with different surface functional groups after pulmonary exposure in rats. Particle and Fibre Toxicology. 2013; 10 (5).
44. Park Y, Ryu YM, Jung Y et al. Spraying quantum dot conjugates in the colon of live animals enabled rapid and multiplex cancer diagnosis using endoscopy. ACS Nano. 2014; 7 (1): 9309.

ПРИМЕНЕНИЕ В НАНОМЕДИЦИНЕ И ФАРМАКОЛОГИИ НАНОЧАСТИЦ МЕТАЛЛОВ И ИХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ СОЕДИНЕНИЙ, ПОЛУЧЕННЫХ МЕЖФАЗНЫМ И КОНТАКТНЫМ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ

С. А. Воробьева[1]✉, С. Э. Ржеусский[2]

[1] Научно-исследовательский институт физико-химических проблем Белорусского государственного университета, Минск, Беларусь

[2] Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, Беларусь

Одной из актуальных проблем современной препаративной неорганической химии являются получение и исследование наночастиц металлов и их соединений с заданными морфологией и дисперсностью для использования в медицине, фармакологии, микроэлектронике. Наряду с традиционным осаждением из водных растворов перспективны, но менее изучены межфазный синтез и контактное восстановление. В работе представлены результаты физико-химического исследования наночастиц металлов и их соединений, полученных химическим осаждением из водных растворов, межфазным и контактным взаимодействием. Для иллюстрации использования синтезированных наночастиц в фармакологии и медицине приведены данные по влиянию фазового состава и дисперсности наночастиц меди и оксида меди (II) на их противомикробные свойства и результаты исследования возможности применения магнетитовых магнитных жидкостей для маркирования мезенхимальных стволовых клеток.

Ключевые слова: наномедицина, фармакология, нанометаллы, оксиды, сульфиды, магнитные жидкости, стволовые клетки, антимикробные средства

Финансирование: экспериментальные исследования проводились при поддержке Белорусского республиканского фонда фундаментальных исследований (гранты X96-157, X04-073, X09-025, X11MC-034).

Благодарности: авторы благодарят Дражину Н. П и Петрову Е. А. за проведение исследований маркированных мезенхимальных стволовых клеток, а также сотрудников лаборатории химии конденсированных сред НИИ физико-химических проблем Белгосуниверситета, принимавших участие в синтезе и исследовании наноразмерных металлов и их соединений.

✉ **Для корреспонденции:** Светлана Александровна Воробьева
ул. Ленинградская, д. 14, г. Минск, Беларусь, 220030; vorobyova@bsu.by

Статья получена: 27.06.2018 **Статья принята к печати:** 28.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.076

NANOPRTICLES OF METALS AND THEIR INORGANIC COMPOUNDS OBTAINED THROUGH INTERPHASE AND REDOX-TRANSMETALATION INTERACTION: APPLICATION IN MEDICINE AND PHARMACOLOGY

Vorobyova SA[1]✉, Rzheussky SE[2]

[1] Research Institute for Physical Chemical Problems of the Belarusian State University, Minsk, Belarus

[2] Vitebsk State Order Of Peoples' Friendship Medical University, Vitebsk, Belarus

Synthesis of nanoparticles of metals and their compounds with given morphology and dispersity for use in medicine, pharmacology, microelectronics, as well as subsequent research of their properties, is one of the current problems in the field of preparative inorganic chemistry. Interphase synthesis and redox-transmetalation interaction are as promising as the traditional precipitation from aqueous solutions, but not as researched. This study presents the results of a physicochemical analysis of nanoparticles of metals and their compounds obtained through chemical precipitation from aqueous solutions, interphase and redox-transmetalation interactions. Data describing the influence of phase composition and dispersity of copper and copper oxide (II) nanoparticles on their antimicrobial properties, as well as the results of researching the possibility to use magnetite magnetic fluids for mesenchymal stem cells marking, illustrate the application options synthesized nanoparticles find in pharmacology and medicine.

Keywords: nanomedicine, pharmacology, nanometals, oxides, sulfides, magnetic fluids, stem cells, antimicrobial agents

Funding: experimental stages of the study were supported by the Belarusian Republican Foundation for Fundamental Research (grants X96-157, X04-073, X09-025, X11MS-034).

Acknowledgments: the authors would like to thank N. P. Drazhina and E. A. Petrova for researching the marked mesenchymal stem cells, and fellows of the Laboratory of Condensed Matter Chemistry at the Research Institute for Chemical Physical Problems of the Belarusian State University who participated in the synthesis and research of nanoparticles of metals and their compounds.

✉ **Correspondence should be addressed:** Svetlana A. Vorobyova
Leningradskaya 14, Minsk, Belarus, 220030; vorobyova@bsu.by

Received: 27.06.2018 **Accepted:** 28.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.076

В препаративной неорганической нанохимии интересной в научном и важной в практическом отношении является проблема получения наночастиц металлов и их неорганических соединений с заданной морфологией и дисперсностью, которые в значительной степени определяют свойства и качество разрабатываемых перспективных материалов различного назначения. В связи с этим поиск новых и совершенствование известных

способов получения наночастиц металлов и их соединений с требуемыми свойствами являются неизменно актуальной научной и технологической задачей.

Применительно к получению наноразмерных металлов и их неорганических соединений наряду с традиционным осаждением из водных растворов, всесторонне и детально исследованным и активно применяющимся химиками, перспективны, но менее изучены межфазный синтез и контактное восстановление, которые мы использовали для получения гидро- и органозолей некоторых металлов, оксидов и солей.

Для иллюстрации применения синтезированных наночастиц в фармакологии и медицине в работе представлены данные по влиянию фазового состава и дисперсности наночастиц меди и оксида меди (II) на их противомикробные свойства, а также результаты исследования возможности применения магнетитовых магнитных жидкостей в маркировании мезенхимальных стволовых клеток (МСК).

Межфазный синтез наноразмерных металлов и их неорганических соединений

Суть межфазного синтеза заключается в получении металлов и их соединений в результате взаимодействия реагентов, растворенных в различных фазах водно-органических систем, смешивание которых не допускается, в отличие от реакций в микроэмульсиях. Особенность этих реакций в том, что они могут протекать в одной из фаз или на границе их раздела. При этом условия протекания реакции в каждой фазе двухфазной системы существенно различаются, что служит предпосылкой получения неорганических веществ со свойствами, отличными от свойств неорганических веществ, осаждаемых из гомогенных, в частности, водных растворов [1–8].

Результаты физико-химического исследования полученных нами органо- и гидрозолей металлов и их соединений представлены в таблице и работах [2–8].

Анализ препаративных возможностей межфазного синтеза свидетельствует о том, что состояние (осадок, пленка, коллоидный раствор) и область локализации (органическая или водная фаза, граница раздела фаз) продуктов реакции зависят от многих факторов (природы, концентрации и соотношения реагентов, температуры реакции, объема фаз и площади поверхности раздела), что не позволяет в настоящее время сформулировать закономерности межфазного синтеза, общие для соединений различных классов.

Вместе с тем, полученные данные позволяют отметить некоторые особенности межфазного синтеза. К первой особенности можно отнести возможность получения коллоидных растворов без введения в их состав дополнительных поверхностно-активных веществ и стабилизирующих добавок. Частицы дисперсной фазы коллоидных растворов в условиях межфазного синтеза образуются одновременно с образованием поверхностно-активных веществ (олеиновой кислоты или олеата натрия) и стабилизирующих добавок (четвертичных аммониевых соединений), и с этой точки зрения процесс получения коллоидного раствора при межфазном взаимодействии можно рассматривать как самоорганизующийся, когда концентрация поверхностно-активного вещества, необходимая и достаточная для получения коллоидного раствора, создается в процессе синтеза, а не подбирается эмпирическим путем, как, например, при получении ферромагнитных жидкостей.

Другая особенность межфазного синтеза заключается в том, что данный метод позволяет получать неорганические вещества в условиях, существенно более мягких по сравнению с теми, которые используются при синтезе тех же веществ химическим осаждением их водных растворов. В результате, при изменении состава двухфазной системы, например, замене водной фазы на спиртовую и соблюдении всех прочих параметров неизменными, наблюдается образование наночастиц различной морфологии и дисперсности, что было продемонстрировано нами на примере оксида цинка [5].

Таблица. Результаты исследования наночастиц металлов и их соединений, полученных межфазным синтезом в двухфазной системе неполярный растворитель/вода

Коллоидная дисперсия	Фаза локализации продуктов реакции	Средний размер частиц, нм	Максимум полосы оптического поглощения λ_{max}, nm	Ссылка на литературу
Au	Органическая, водная или граница раздела фаз в зависимости от условий синтеза	2,6	514	2
Ag	Органическая	10,0	440	3
Pd	Органическая	1,4	440	–
Ag/Pd	Органическая	2,1	430	–
Ag/Au	Органическая, водная или граница раздела фаз в зависимости от условий синтеза	4,2	470	–
Cu	Органическая или водная в зависимости от условий синтеза	10,0	575	–
CuO	Органическая	3,2	–	4
ZnO	Органическая или водная в зависимости от условий синтеза	Форма и размер частиц зависят от условий синтеза	–	5
CdS	Органическая	2,0	311	7
CuS	Органическая	Форма и размер частиц зависят от условий синтеза	–	–
ZnS	Органическая	Форма и размер частиц зависят от условий синтеза	–	–
Fe_3O_4/Au	Органическая	12.8	590	6
Fe_3O_4/CdS	Органическая	10,3	311	7

Кроме того, при введении в одну из фаз полимерного вещества возможно получение практически в одну стадию нанокомпозитов, содержащих наноразмерные частицы, образующиеся непосредственно в полимерной матрице, что предотвращает их агрегирование и, как следствие, позволяет сохранять высокую дисперсность сформировавшихся наночастиц.

Другая интересная особенность межфазного синтеза заключается в возможности его использования для получения бифункциональных магнитных наночастиц Fe_3O_4/Au и Fe_3O_4/CdS, сочетающих свойства магнитного ядра (Fe_3O_4) и оптически активных оболочек (Au, CdS) [6–8]. Так, при восстановлении золотохлористоводородной кислоты в двухфазной системе, одна из фаз которой образована коллоидным раствором магнетита, удалось получить нанокомпозиционные системы Fe_3O_4/Au со структурой «ядро–оболочка» [8].

Получение би- и триметаллических наночастиц контактным взаимодействием

Другим методом, который использовался нами для получения би- и триметаллических наночастиц, в том числе со структурой «ядро–оболочка» был метод контактного взаимодействия, заключающийся в восстановлении солей металлов металлическими наночастицами, образующими ядро [9]. В отличие от методов получения композитов со структурой «ядро–оболочка» с использованием линкеров, данный способ экспериментально достаточно прост и не требует использования дорогостоящих реактивов для поверхностной функционализации.

В настоящее время нами получены контактным восстановлением и всесторонне исследованы би- и триметаллические наночастицы с использованием в качестве ядра (восстановителя) металлической меди и магнитных наночастиц Fe и FeCo. Полученные результаты показали, что при контактном восстановлении соединений золота и серебра наночастицами FeCo образуются магнитные наночастицы FeCoAu и FeCoAg со структурой «ядро–оболочка» [10]. Формирование оболочек драгоценных металлов на поверхности легко окисляющихся магнитных ядер позволяет предотвратить или уменьшить их окисление и, кроме того, расширяет возможности направленной функционализации образующихся нанокомпозитов, в том числе и для биомедицинских приложений.

Влияние дисперсности и фазового состава на антимикробные свойства медьсодержащих антимикробных средств

Одним из перспективных направлений создания новых лекарственных средств, обладающих антимикробным действием, является использование в их составе малотоксичных и не вызывающих резистентности наночастиц металлов с выраженной бактерицидной, противовирусной, фунгицидной и иммуномодулирующей активностью.

Как правило, при использовании нанометаллов в качестве фармацевтической субстанции разработчики стремятся к использованию возможно более дисперсных наночастиц, не оценивая при этом затраты на разработку и технологическую адаптацию методов получения сверхдисперсных частиц, которые потенциально могут существенно превышать положительный эффект от их использования. В связи с этим мы исследовали влияние на антимикробную активность фазового состава, морфологии и дисперсности наночастиц металлической меди и оксида меди (II), полученных химическим осаждением из водных растворов в присутствии полиэтиленгликоля [11].

Методика пробоподготовки и результаты исследования антимикробной активности и спектра действия полученных наночастиц детально описаны ранее [12]. В качестве тест-культур использовали грамотрицательные (*Escherichia coli*), грамположительные (*Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*), в том числе спорообразующие (*Bacillus subtilis*), бактерии и микроскопические грибы (*Candida albicans*). В качестве лекарственных средств сравнения изучали мази, содержащие хлорамфеникол, хлоргексидин и комбинацию холина салицилата и цеталкония хлорида.

В результате исследования было установлено, что наночастицы меди обладают широким спектром антимикробного действия по отношению к грамположительным и грамотрицательным бактериям, однако оно менее выражено, чем у мази, содержащей хлорамфеникол. При этом противогрибковые свойства наночастиц меди лишь незначительно уступают таковым лекарственных средств, содержащих хлоргексидин, холина салицилат и цеталкония хлорид.

Анализ зависимости антимикробного эффекта от размеров наночастиц металлической меди, изменяющихся в пределах 14–37 нм, показал, что линейный рост антимикробной активности при уменьшении размера наночастиц меди до 14 нм характерен для образцов с концентрацией медьсодержащей суспензии, не превышающей 0,5 масс.%. При использовании более концентрированных суспензий (0,75 масс.%) уменьшение размера частиц с 37 до 14 нм не приводит к увеличению антимикробного эффекта.

Применение магнитных наночастиц для маркирования МСК

Одним из направлений исследований магнетитовых магнитных жидкостей, синтезируемых в НИИ физико-химических проблем Белорусского госуниверситета, явилось изучение возможности применения магнитных наночастиц для маркирования мезенхимальных стволовых клеток (МСК), которое проводилось совместно с сотрудниками Белорусского государственного медицинского университета (Минск, Беларусь). Среди магнитных наночастиц наиболее перспективными материалами для наномедицины являются наноразмерные оксиды железа (II, III) благодаря относительной простоте их получения, а также низкой цитотоксичности [13]. Известно, что магнитные наночастицы можно использовать для маркировки как мезенхимальных, так и нейронных стволовых клеток с целью их выделения из клеточной суспензии [14–16], концентрирования [17], а также для визуализации и мониторинга методом МРТ [18], что имеет исключительное значение в случае трансплантации стволовых клеток [19].

Детали синтеза магнитных наночастиц, маркирования мезенхимальных стволовых клеток и исследования их свойств подробно описаны в [20, 21]. Для маркирования МСК использовали культуры МСК, выделенные из костного мозга половозрелых белых аутбредных крыс. Магнитные наночастицы оксида железа (II, III) получали химическим осаждением из водных растворов с последующей стабилизацией поверхностно-активными веществами.

В результате проведенных исследований показано, что синтезированные магнитные наночастицы в концентрации 0,0069 масс.% характеризуются низкой цитотоксичностью и эффективно маркируют МСК при инкубации в течение 24 ч. Полученные данные свидетельствуют о том, что магнитные наночастицы локализуются в везикулах в цитоплазме клеток и сохраняются в них при пересеве, не оказывая негативного влияния на способность клеток к адгезии, распластыванию и пролиферации, причем магнитные наночастицы при делении клеток распределяются между дочерними клетками. Экспериментально подтверждено, что маркированные магнитными наночастицами стволовые клетки могут быть детектированы *in vivo* с помощью МРТ.

Следует также отметить, что полученные магнитные наночастицы, стабилизированные олеиновой кислотой и триэтаноламином, обладают рядом преимуществ по сравнению с известными материалами на основе наноразмерных оксидов железа, требующими длительной инкубации со стволовыми клетками или дополнительного использования транспортных агентов, например протаминсульфата, а также отрицательно влияющими на способность стволовых клеток к дифференцировке.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Необходимо отметить, что, несмотря на значительные успехи в разработке и исследовании химических основ получения наноразмерных металлов, оксидов и солей, возможность дальнейшего их использования в составе нанокомпозиционных материалов различного назначения зависит от коллективных усилий ученых различных специальностей. Применительно к наномедицине и фармакологии принципиально важно научиться управлять морфологией, дисперсностью и фазовым составом используемых наночастиц с учетом требований к разрабатываемым материалам медицинского назначения и оценить риски их практического использования.

Литература

1. Xinkui Yangying, Chen Wang. A new two-phase system for the preparation of nearly monodisperse silver nanoparticles Materials Letters. 2008; (62): 4366–8. DOI: 10.1016/j.matlet.2008.07.034.
2. Vorobyova SA, Sobal NS, Lesnikovich AI. Colloidal gold, prepared by interphase reduction. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects. 2001; (176): 273–7.
3. Lesnikovich AI, Vorobyova SA, Sobal NS. Preparation of silver nanoparticles by interphase reduction. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects. 1999; (152): 375–9.
4. Vorobyova SA, Lesnikovich AI, Mushinskii VV. Interphase synthesis and characterization of CuO in octane. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects. 1999; (150): 297–300.
5. Vorobyova SA, Lesnikovich AI, Mushinskii VV. Interphase synthesis and characterization of zinc oxide. Materials Letters. 2004; (58): 863–6. DOI: 10.1016/j.matlet.2003.08.008.
6. Semenova EM, Vorobyova SA, Lesnikovich AI, Fedotova JA, Bayev VG. Fabrication and investigation of magnetite nanoparticles with gold shell. Journal of Alloys and Compounds. 2012; (530): 97–101. DOI: 10.1016/j.jallcom.2012.03.090.
7. Semenova EM, Vorobyova SA, Lesnikovich AI. Synthesis of cadmium sulfide coated magnetic nanoparticles. Physics, Chemistry and Application of Nanostructures: Proceeding of the International Conference. Nanomeeting–2011; 2011 May; Minsk, Belarus. 333–336.
8. Semenova EM, Vorobyova SA, Lesnikovich AI. Interphase synthesis of Fe_3O_4/CdS core-shell nanoparticles. Optical Materials. 2011; (34): 99–102. DOI: 10.1016/j.optmat.07.008.
9. Lee W, Kim M, Choi J, Park J. Redox-transmetalation process as a generalized strategy for core-shell magnetic nanoparticles. J Amer Chem Soc. 2005; (127): 16090–7. DOI: 10.1021/ja053659j.
10. Bayev VG, Fedotova JA, Vorobyova SA, Svito IA, Ivashkevich OA, Tyutyunnikov SI, Kolobylina NN, Guryeva PV. Mössbauer spectroscopy and magnetometry of FeCo-Ag and FeCo-Au nanocomposites synthesized by a redox-transmetalation method. Materials Chemistry and Physics 2018; (216): 349–53. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2018.06.031.
11. Auchynnikava AA, Vorobyova SA, Rzheussky SE. Antimicrobial activity of copper nanoparticles depending on the particles size. Physics, Chemistry and Application of Nanostructures: Proceeding of the International Conference. Nanomeeting–2015; 2015 May; Minsk, Belarus. 480–3.
12. Ржеусский С. Э., Авчинникова Е. А., Воробьева С. А. Нанодиагностика и антимикробные свойства наночастиц меди. Вестник фармации. 2014; (3): 62–8.
13. Cen L, Neoh KG, Sun J, Hu F et al. Labeling of Adipose Derived Stem Cells by Oleic Acid Modified Magnetic Nanoparticles. Adv Funct Mater. 2009; (8): 1158–66. DOI: 10.1002/adfm.200801670.
14. Wang L, Neoh K-G, Kang E-T et al. Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/poly(DL-lactic acid-co-α, β-malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling. Biomaterials. 2010; (13): 3502–11. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.081.
15. Song M, Moon WK, Kim Y et al. Labeling Efficacy of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to Human Neural Stem Cells: Comparison of Ferumoxides, Monocrystalline Iron Oxide, Cross-linked Iron Oxide (CLIO)-NH_2 and tat-CLIO. Korean J Radiol. 2007; (5): 365–71. DOI: 10.3348/kjr.2007.8.5.365.
16. Odabaş S, Sayar F, Güven G et al. Separation of mesenchymal stem cells with magnetic nanosorbents carrying CD105 and CD73 antibodies in flow-through and batch systems. J Chromatogr B. 2008; 861 (1): 74–80. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.11.017.
17. Ito A, Hibino E, Honda H et al. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticle. Biochem Eng J. 2004; 20 (2–3): 119–25. DOI: 10.1016/j.bej.2003.09.018.
18. Hsiao JK, Tai M-F, Chu H-H et al. Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level. Magnet Reson Med. 2007: 717–24. DOI: 10.1002/mrm.21377.
19. Zhu J, Wu X, Zhang HL. Adult Neural Stem Cell Therapy: Expansion In Vitro, Tracking In Vivo and Clinical Transplantation. Curr Drug Targets. 2005; 6 (1): 97–110. DOI: 10.2174/1389450053345055.
20. Петрова Е. А., Дражина Н. П., Семенова Е. М., Воробьева С. А. Применение магнитных наночастиц для маркирования мезенхимальных стволовых клеток. Вестник БГУ. Серия 2. 2012; (3): 54–9.
21. Дражина Н. П., Петрова Е. А., Семенова Е. М., Воробьева С. А., авторы. Учреждение образования «Белорусский государственный медицинский университет», Учреждение Белорусского государственного университета «Научно-исследовательский институт физико-химических проблем», патентообладатели. Концентрат для получения средства витальной маркировки мезенхимальных стволовых клеток. Патент РБ 17804. 15.02.2012.

References

1. Xinkui Yangying, Chen Wang. A new two-phase system for the preparation of nearly monodisperse silver nanoparticles Materials Letters. 2008; (62): 4366–8. DOI: 10.1016/j.matlet.2008.07.034.
2. Vorobyova SA, Sobal NS, Lesnikovich AI. Colloidal gold, prepared by interphase reduction. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects. 2001; (176): 273–7.
3. Lesnikovich AI, Vorobyova SA, Sobal NS. Preparation of silver nanoparticles by interphase reduction. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects. 1999; (152): 375–9.
4. Vorobyova SA, Lesnikovich AI, Mushinskii VV. Interphase synthesis and characterization of CuO in octane. Colloids and Surfaces A: Physicochem Eng Aspects. 1999; (150): 297–300.
5. Vorobyova SA, Lesnikovich AI, Mushinskii VV. Interphase synthesis and characterization of zinc oxide. Materials Letters. 2004; (58): 863–6. DOI: 10.1016/j.matlet.2003.08.008.
6. Semenova EM, Vorobyova SA, Lesnikovich AI, Fedotova JA, Bayev VG. Fabrication and investigation of magnetite nanoparticles with gold shell. Journal of Alloys and Compounds. 2012; (530): 97–101. DOI: 10.1016/j.jallcom.2012.03.090.
7. Semenova EM, Vorobyova SA, Lesnikovich AI. Synthesis of cadmium sulfide coated magnetic nanoparticles. Physics, Chemistry and Application of Nanostructures: Proceeding of the International Conference. Nanomeeting–2011; 2011 May; Minsk, Belarus. 333–336.
8. Semenova EM, Vorobyova SA, Lesnikovich AI. Interphase synthesis of Fe_3O_4/CdS core-shell nanoparticles. Optical Materials. 2011; (34): 99–102. DOI: 10.1016/j.optmat.07.008.
9. Lee W, Kim M, Choi J, Park J. Redox-transmetalation process as a generalized strategy for core-shell magnetic nanoparticles. J Amer Chem Soc. 2005; (127): 16090–7. DOI: 10.1021/ja053659j.
10. Bayev VG, Fedotova JA, Vorobyova SA, Svito IA, Ivashkevich OA, Tyutyunnikov SI, Kolobylina NN, Guryeva PV. Mössbauer spectroscopy and magnetometry of FeCo-Ag and FeCo-Au nanocomposites synthesized by a redox-transmetalation method. Materials Chemistry and Physics. 2018; (216): 349–53. DOI: 10.1016/j.matchemphys.2018.06.031.
11. Auchynnikava AA, Vorobyova SA, Rzheussky SE. Antimicrobial activity of copper nanoparticles depending on the particles size. Physics, Chemistry and Application of Nanostructures: Proceeding of the International Conference. Nanomeeting–2015; 2015 May; Minsk, Belarus. 480–3.
12. Rzheusskij SJe, Avchinnikova EA, Vorobyova SA. Nanodiagnostika i antimikrobnye svojstva nanochastic medi. Vestnik farmacii. 2014; (3): 62–8.
13. Cen L, Neoh KG, Sun J, Hu F et al. Labeling of Adipose Derived Stem Cells by Oleic Acid Modified Magnetic Nanoparticles. Adv Funct Mater. 2009; (8): 1158–66. DOI: 10.1002/adfm.200801670.
14. Wang L, Neoh K-G, Kang E-T et al. Biodegradable magnetic-fluorescent magnetite/poly(DL-lactic acid-co-α, β-malic acid) composite nanoparticles for stem cell labeling. Biomaterials. 2010; (13): 3502–11. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.081.
15. Song M, Moon WK, Kim Y et al. Labeling Efficacy of Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles to Human Neural Stem Cells: Comparison of Ferumoxides, Monocrystalline Iron Oxide, Cross-linked Iron Oxide (CLIO)-NH_2 and tat-CLIO. Korean J Radiol. 2007; (5): 365–71. DOI: 10.3348/kjr.2007.8.5.365.
16. Odabaş S, Sayar F, Güven G et al. Separation of mesenchymal stem cells with magnetic nanosorbents carrying CD105 and CD73 antibodies in flow-through and batch systems. J Chromatogr B. 2008; 861 (1): 74–80. DOI: 10.1016/j.jchromb.2007.11.017.
17. Ito A, Hibino E, Honda H et al. A new methodology of mesenchymal stem cell expansion using magnetic nanoparticle. Biochem Eng J. 2004; 20 (2–3): 119–25. DOI: 10.1016/j.bej.2003.09.018.
18. Hsiao JK, Tai M-F, Chu H-H et al. Magnetic nanoparticle labeling of mesenchymal stem cells without transfection agent: cellular behavior and capability of detection with clinical 1.5 T magnetic resonance at the single cell level. Magnet Reson Med. 2007: 717–24. DOI: 10.1002/mrm.21377.
19. Zhu J, Wu X, Zhang HL. Adult Neural Stem Cell Therapy: Expansion In Vitro, Tracking In Vivo and Clinical Transplantation. Curr Drug Targets. 2005; 6 (1): 97–110. DOI: 10.2174/1389450053345055.
20. Petrova EA, Drazhina NP, Semenova EM, Vorobyova SA. Primenenie magnitnyh nanochastic dlja markirovanija mezenhimal'nyh stvolovyh kletok. Vestnik BGU. Serija 2. 2012; (3): 54–9.
21. Drazhina NP, Petrova EA, Semenova EM, Vorobyova SA, avtory. Uchrezhdenie obrazovanija «Belorusskij gosudarstvennyj medicinskij universitet», Uchrezhdenie Belorusskogo gosudarstvennogo universiteta «Nauchno-issledovatel'skij institut fiziko-himicheskih problem», patentoobladateli. Koncentrat dlja poluchenija sredstva vital'noj markirovki mezenhimal'nyh stvolovyh kletok. Patent RB 17804. 15.02.2012.

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИМЕРНЫХ КОЛЛОИДНЫХ НОСИТЕЛЕЙ ДЛЯ ТАРГЕТНОЙ ДОСТАВКИ МОЗГОВОГО ТРОФИЧЕСКОГО ФАКТОРА ЧЕРЕЗ ГЕМАТО-ЭНЦЕФАЛИЧЕСКИЙ БАРЬЕР ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ПАРКИНСОНИЗМЕ

М. Ю. Капитонова[1], Р. Н. Аляутдин[2]✉, Р. В. А. Л. Ван Шазли[3], М. Н. К. Нор-Ашикин[3], А. Ахмад[3], С. Норита[3], С. С. Дыдыкин[4]

[1] Факультет медицины и здравоохранения, Университет Малайзии Саравак (ЮНИМАС), Кота-Самарахан, Саравак, Малайзия

[2] Управление экспертизы безопасности лекарственных средств, Научный центр экспертизы средств медицинского применения, Москва

[3] Медицинский факультет, Университет технологии МАРА, Сунгай Було, Селангор, Малайзия

[4] Кафедра оперативной хирургии и топографической анатомии, Сеченовский Первый Московский государственный медицинский университет, Москва

Болезнь Паркинсона — одно из распространенных возрастных моторных нейродегенеративных заболеваний, при котором дегенерация дофаминергических нейронов считается патогномоничной для развития моторной дисфункции. Мозговой трофический фактор (БДНФ) считается ключевым регулятором нейронной пластичности и, являясь крупной молекулой, не проходит через гемато-энцефалический барьер (ГЭБ). Синтетические полимерные наночастицы (НЧ), покрытые сурфактантом, обеспечивают феномен «троянского коня» и позволяют доставлять БДНФ в ткани головного мозга. Целью работы было оценить нейропротективное действие БДНФ, сорбированного на полилактидных НЧ, в общепринятой модели паркинсонизма, вызванного применением МФТП. Для моделирования синдрома паркинсонизма использовали нейротоксин 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП), который внутрибрюшинно вводили мышам линии C57BL/6 с последующим внутривенным введением физраствора (1-я группа мышей), раствора БДНФ (2-я группа), БДНФ, сорбированного на полилактидных НЧ (3-я группа), и БДНФ, сорбированного на полилактидных НЧ, покрытых сурфактантом (4-я группа). Через 90 мин, 24 ч, 72 ч и 7 суток оценивали проявления паркинсонизма в поведенческих тестах открытого поля, на рота-роде, по интенсивности тремора, изменению длины тела и шага животных. По окончании эксперимента головной мозг извлекали для гистологической оценки изменений в стриа-паллидарной системе и среднем мозге, а также для определения концентрации БДНФ в тканях головного мозга. Результаты показали, что БДНФ, сорбированный на полилактидных НЧ, покрытых сурфактаном, существенно уменьшал ригидность скелетных мышц, олигокинезию и тремор, а также достоверно повышал концентрацию БДНФ в тканях головного мозга.

Ключевые слова: мозговой трофический фактор, паркинсонизм, наночастицы, гемато-энцефалический барьер, иммуноферментый анализ

Финансирование: исследование выполнено в рамках гранта 600-RMI/RAGS 5/3 (92/2013) Университета технологии МАРА, Селангор, Малайзия.

✉ **Для корреспонденции:** Ренад Николаевич Аляутдин
1-й Волоколамский проезд, д. 10, корп. 4, г. Москва, 119876; alyautdun@mail.ru

Статья получена: 09.07.18 **Статья принята к печати:** 20.08.18

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.072

APPLICATION OF NANOSCALE POLYMER COLLOID CARRIERS FOR TARGETED DELIVERY OF THE BRAIN-DERIVED NEUROTROPHIC FACTOR THROUGH THE BLOOD-BRAIN BARRIER IN EXPERIMENTAL PARKINSONISM

Kapitonova MYu[1], Alyautdin RN[2]✉, Wan-Syazli RWAL[3], Nor-Ashikin MNK[3], Ahmad A[3], Norita S[3], Dydykin SS[4]

[1] Faculty of Medicine and Health Sciences, University Malaysia Sarawak (UNIMAS), Kota Samarahan, Sarawak, Malaysia

[2] Department for Expertise of Medicinal Products safety, Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products, Moscow

[3] Faculty of Medicine, University Teknologi MARA, Sungai Buloh, Selangor, Malaysia

[4] Department of Operative Surgery and Topographic Anatomy, Sechenov First Moscow State Medical University, Moscow

Parkinson disease is one of the common age-related motor neurodegenerative diseases, in which dopamine neurons degeneration is considered to be pathognomic for the development of motor disfunction. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) is a member of the neurotrophin family, which is considered to be a key regulator of neuronal plasticity. BDNF, being a large molecule, does not pass through the blood-brain barrier (BBB). Synthetic polymer nanoparticles (NP), covered by surfactant, provide the phenomenon of “Trojan hoarse” and enable BDNF to penetrate into the brain tissue. For modelling of parkinsonism we used an intraperitoneal (i.p.) injection of neurotoxin 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP) which was injected to the C57BL/6 mice with subsequest treatment with normal saline (group 1), BDNF (group 2), nanoparticulate BDNF (group 3) and surfactant-coated nanoparticulate BDNF (group 4). After 90 min, 24 hours, 72 hours and 7 days manifestations of parkinsonism were evaluated using behavioural tests of open field, rota-rod, assessment of the tremor, length of the body and pace. At the end of experiment the brain was sampled for histological evaluation of changes in the striatum and midbrain and concentration of BDNF in the brain tissues. The results of the experiments demonstrated that nanoparticulate BDNF covered with surfactant significanltly reduced rigidity of the skeletal muscles, oligokinesia and tremor, and also significantly increased BDNF concentration in the brain tissues.

Keywords: brain-derived neurotrophic factor, parkinsonism, nanoparticles, blood-brain barrier, ELISA

Funding: this work was supported by the grant 600-RMI/RAGS 5/3 (92/2013) of the Universiti Teknologi MARA (UiTM), Selangor, Malaysia.

✉ **Correspondence should be addressed:** Renad N. Alayutdin
1 Volokolamskiy Proezd 10, bl. 4, Moscow, 119876; alyautdun@mail.ru

Received: 09.07.18 **Accepted:** 20.08.18

DOI: 10.24075/brsmu.2018.072

Повышение эффективности действия лекарственных веществ при снижении их токсичности и выраженности побочных эффектов является основным направлением современной фармакологии. Анализ современной литературы позволил выделить два способа решения поставленной задачи: 1) увеличение избирательности действия лекарственных веществ; 2) создание более высокой концентрации препаратов в области структур-мишеней, в частности в центральной нервной системе (ЦНС), за счет направленного транспорта лекарств с помощью специфических носителей [1, 2]. Если для применения первого способа основным ограничением является присутствие одинаковых по чувствительности мишеней в различных структурах организма (вследствие чего искомая избирательность не достижима), то при применении второго ограничением будет токсичность компонентов системы дистанционной доставки лекарств, но при этом большим преимуществом окажется высокая избирательность. Кроме того, имеется ряд потенциально важных препаратов, дистанционная и избирательная доставка которых просто необходимы (например, фактор некроза опухоли). Существенным препятствием для проникновения в мозг многих лекарственных веществ является наличие гемато-энцефалического барьера (ГЭБ). Плотные контакты между эндотелиоцитами капилляров головного мозга служат препятствием для проникновения в мозг многих высокомолекулярных и гидрофильных веществ, а наличие Р-гликопротеина затрудняет проникновение ряда липофильных соединений [3, 4]. Таким образом, наличие ГЭБ ограничивает возможности медикаментозной коррекции нейродегенеративных заболеваний, опухолей мозга и других нарушений ЦНС.

Многие пептиды и белки служат регуляторами различных функций ЦНС, в связи с чем они потенциально могут быть использованы при состояниях, сопровождающихся нейродегенерацией [5, 6]. Существенным фактором, лимитирующим клиническое применение веществ пептидной природы, являются низкая способность проникать через ГЭБ и подверженность ферментативной инактивации. Полимерные коллоидные системы способны обеспечивать транспорт лекарственных препаратов в мозг, в том числе соединений белковой структуры [7].

Для создания модели паркинсонизма был использован МФТП — соединение, проникающее через ГЭБ и образующее в головном мозге метаболит, который блокирует тирозингидроксилазу, что в итоге приводит к дефициту дофамина в черной субстанции [8]. В нашей работе с целью оценки возможности доставки и получения нейропротекторного действия в модели паркинсонизма для таргетной доставки БДНФ были использованы биодеградируемые полилактидные наночастицы (НЧ), покрытые сурфактантом.

Целью настоящего исследования было оценить нейропротективное действие БДНФ, сорбированного на полилактидных НЧ, в общепринятой модели паркинсонизма, вызванного применением МФТП.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводили на мышах линии C57BL/6 — самцах массой 20–25 г (виварий «LACU» Института медицинской молекулярной биотехнологии (IMMB), Университета технологии МАРА; Малайзия). Протокол исследования прошел экспертизу этического комитета «UiTM Care» при Университете технологии МАРА (протокол № 122/2015 от 6 ноября 2015).

Все животные проходили период предварительной адаптации к условиям лаборатории в течение одной недели до начала эксперимента. Каждую мышь использовали только один раз. Животных содержали в клетках из нержавеющей стали по 4 мыши в каждой клетке в условиях свободного доступа к корму и воде при температуре 20–22 °С и влажности 50–60%, при следующем световом режиме: 12 ч свет/12 ч темнота. Для минимизации возможных сбоев циркадианных ритмов и исключения хронофармакологических влияний введение лекарственных препаратов проводили в утренние часы. Все эксперименты проводили в первую половину дня. Каждая экспериментальная группа составляла 6–8 мышей.

Паркинсонизм моделировали введением нейротоксина МФТП внутрибрюшинно [9]. Оценку основных экстрапирамидных нарушений проводили согласно методикам, описанным ниже, сразу после введения МФТП на протяжении первых 45 мин, после чего животным, предварительно разделенным на 4 группы, внутривенно вводили в латеральную хвостовую вену 0,2 мл лекарственной смеси одного из составов: 1-я группа — физраствор; 2-я группа — БДНФ; 3-я группа — БДНФ + НЧ; 4-я группа — БДНФ + НЧ + сурфактант (полоксамер 188). Наблюдения и поведенческие тесты проводили через 90 мин, 24 ч, 72 ч и 7 дней после введения нейротоксина.

По окончании последнего теста на 8-й день эксперимента животных выводили из эксперимента путем декапитациии. Головной мозг извлекали, левое полушарие фиксировали в 10%-м формалине для последующего гистологического исследования, а правое полушарие замораживали жидким азотом при –70 °С для последующего определения содержания БДНФ в тканях головного мозга методом иммуноферментного анализа.

Вещества и материалы

Для моделирования паркинсонизма использовали: официнальный физиологический раствор (0,9%-й раствор хлорида натрия) (Sigma-Aldrich; США); 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (1-Methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetra hydropyridine hydrochloride powder, Sigma-Aldrich; США).

При развитии паркинсонизма использовали: официнальный физиологический раствор (0,9%-й раствор хлорида натрия) (Sigma-Aldrich; США); 10%-й раствор полоксамера 188 (Poloxamer 188) (Sigma-Aldrich; США), рекомбинантный человеческий БДНФ (Recombinant human BDNF) (Raybiotech; США); полилактидные НЧ среднего диаметра 200 нм (Degradex TM PLGA (MW 45-75 KD) nanospheres) (Phosphorex, Inc.; США).

Для проведения иммуноферментного анализа использовали: набор реактивов для иммуноферментного анализа БДНФ у мышей и крыс (Total BDNF Immunoassay; Catalog Number DBNT00) (Quantikine®ELISA, R&D Systems; США), фосфатный буфер (Sigma- Aldrich; США) и лизис-буфер 17 (Lysis Buffer 17, catalog #895943) (R&D system, Abingdon; UK).

Моделирование паркинсонизма

Раствор МФТП в физиологическом растворе вводили экспериментальным животным внутрибрюшинно в дозе 30 мг/кг.

Получение БДНФ, сорбированного на наночастицах

Лиофилизированный порошок БДНФ (50 мкг) растворяли в 1 мл изотонического раствора натрия хлорида. Раствор БДНФ объединяли с суспензией НЧ (40 мг НЧ в 1 мл физраствора) и инкубировали при пониженной температуре (0–4 °С) в течение 3 ч, проводили сонификацию на ультразвуковом дезинтеграторе 15 мин при мощности 60 Вт с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 3 ч при скорости 300 об./мин.

Приготовление суспензии наночастиц

Лиофилизированный порошок (40 мг) НЧ, содержащий 23,53 мг полимера, диспергировали в 1 мл изотонического раствора хлорида натрия до получения однородной суспензии молочно-белого цвета. Проводили сонификацию на ультразвуковом дезинтеграторе 15 мин при мощности 60 Вт с последующим перемешиванием на магнитной мешалке в течение 3 ч при скорости 300 об./мин.

Приготовление суспензии наночастиц с БДНФ и сурфактантом

Для приготовления суспензии НЧ с БДНФ и сурфактантом к суспензии БДНФ, сорбированного на полилактидных НЧ, добавляли 0,2 мл 10%-го раствора полоксамера 188 и перемешивали на магнитной мешалке. В результате получали 2 мл 1,18%-й суспензии НЧ, покрытых полоксамером и содержащих 50 мкг БДНФ (5 мкг БДНФ в 0,2 мл суспензии). В этом случае для сохранения общего объема раствора 2 мл НЧ и БДНФ растворяли не в 1 мл, а в 0,9 мл физраствора.

Физраствор или БДНФ, или БДНФ, сорбированный на полилактидных НЧ, или БДНФ, сорбированный на полилактидных НЧ с полоксамером, в объеме 0,2 мл вводили животным с 1-й по 4-ю группу соответственно в латеральную хвостовую вену через 45 мин после введения нейротоксина.

Эффективность исследуемых веществ оценивали по их способности ослаблять основные проявления паркинсонизма, вызываемого введением МФТП (олигокинезии, ригидности и тремора), а также регистрировали наличие и выраженность слюнотечения, пилоэрекции, ретропульсии, нарушений дыхания.

Методика оценки ригидности

Для количественной оценки ригидности мышц туловища использовали симптом «горбатости», выраженность которого зависит от мышечной ригидности и определяется по укорочению расстояния от шеи до основания хвоста за счет сгорбленности животного. Длину тела от основания ушей до основания хвоста измеряли линейкой по видеоизображению в открытом поле. Передние и задние лапки животных окрашивали различными специальными красителями. Определяли расстояние между следами от передних и задних лапок, оставшимися на ленте. Ротарод-тест проводили на ротароде марки ENV-576 (Med Associates; США) в ускоряющемся режиме N5 (220 об./мин).

Методика регистрации тремора

Тремор оценивали по его выраженности в баллах, а также по количеству в процентах животных с тремором в группе. По локализации и амплитуде тремор оценивали в баллах: 0 — отсутствие, 1 — локальный мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 — локальный среднеамплитудный тремор, 3 — генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела [10].

Методика оценки олигокинезии в тесте открытого поля

При паркинсонизме, вызываемом нейротоксином, наблюдается не только уменьшение количества движений, но и нарушение их качественной структуры. Понятие «олигокинезия» включает уменьшение количества и качества локомоторной активности. «Открытое поле» представляло собой белую квадратную арену с белыми бортами высотой 50 см. Все пространство арены равномерно разделили на 64 одинаковых квадратов размером 10 × 10 см. Арену протирали влажной губкой после тестирования каждого животного.

Животное помещали в центр арены сразу после введения МФТП и затем через 90 мин, 24 ч, 72 ч и 7 дней после введения нейротоксина регистрировали в течение 3 мин число горизонтальных и вертикальных движений (стоек). За единицу перемещения при визуальной регистрации поведения был принят один пересеченный квадрат. Вертикальную двигательную активность животных в открытом поле определяли двумя видами стоек: задние лапы животного остаются на полу арены, а передние или упираются в стенку поля, или остаются на весу. Обсчет результатов вели по общей вертикальной двигательной активности.

Иммуноферментный анализ

Для проведения иммуноферментного анализа использовали приборы: микроплатовый ридер Victor™ X, способный измерять поглощение при 450 нм (Perkin Elmer; США); тканевой гомогенизатор Omni-Ruptor 4000 (OMNI International Inc.; США); горизонтальный орбитальный шейкер со скоростью 500+/–50 об./мин (VISION Scientific Co. Ltd; Южная Корея).

Левое полушарие головного мозга промывали фосфатным буфером и гомогенизировали с помощью тканевого гомогенизатора в 500 мкл фосфатного буфера. Такое же количество лизис-буфера 17 добавляли к тканям и оставляли лизироваться на 30 мин при комнатной температуре при легком встряхивании. Детрит удаляли центрифугированием при 10 000 g, при температуре 4 °С, надосадочную жидкость отделяли и оставляли при температуре –80 °С до проведения анализа. Уровень содержания БДНФ определяли с помощью набора для иммуноферментного анализа (R&D Systems, Abingdon; UK) в соответствии с протоколом производителя с использованием микроплатового ридера Victor™ X (Perkin Elmer; США) при длине волны 450 нм. Оптическую плотность образца при 450 нм соотносили с длиной волны 570 нм во избежание погрешности платы. Результаты выражали в пг/мг общего белка.

Статистическая обработка результатов

Полученные данные обрабатывали с помощью программы Excel с вычислением средней арифметической, среднеквадратического отклонения, ошибки репрезентативности, *t*-критерия Стьюдента. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Уже через 2 мин после введения МПТФ у мышей всех четырех групп появлялись симптомы паркинсонизма: вначале генерализованный тремор, мелко- или среднеамплитудный; в течение последующих 3–5 мин — ретропульсия и пилоэрекция. Пилоэрекция была настолько выраженной, что у большинства мышей между волосками черного покрова начинала просвечивать белая кожа, особенно заметная в области задней поверхности шеи. В течение последующих 10–15 мин на первый план выходили признаки ригидности мышц: походка становилась неустойчивой, уменьшалась длина шага, появлялись ротационные движения, укорачивалась длина тела и появлялся характерный горб в торако-люмбарном отделе позвоночника. Через 1,5 ч от начала эксперимента (45 мин после введения исследуемых веществ) у мышей 1-й группы сохранялся тремор и полностью отсутствовали задние стойки, в то время как во 2-й и 3-й группах тремор уменьшался и появлялись единичные задние стойки, а в 4-й группе тремор практически исчезал и задние стойки появлялись значительно чаще. У животных 4-й группы восстанавливались длина шага и способность вращаться на ротароде, а также возрастало количество пересеченных квадратов. У животных 1–3-й групп длина шага и способность вращаться на ротароде практически не изменялись; количество пересеченных квадратов и длина тела мало изменялись в 1-й и 2-й группах, но намечалась тенденция к их увеличению в 3-й группе. Статистический анализ показал, что по всем перечисленным показателям достоверная положительная динамика отмечалась только у мышей 4-й группы, причем при сравнении с каждой из остальных групп, в то время как 1-я, 2-я и 3-я группы различались между собой по данным параметрам недостоверно (рис. 1–3).

Через 24 и 72 ч от начала эксперимента у животных по количеству пересеченных квадратов, длине тела и шага, и интенсивности тремора, восстановлению длины тела и способности вращаться на ротароде тенденции, отмеченные на предыдущем сроке наблюдения, сохранялись, различаясь лишь уровнем достоверности (от $p < 0{,}05$ до $p < 0{,}01$). Через 7 дней у животных 3-й и 4-й групп наблюдали полное отсутствие тремора, и хотя у животных 1-й и 2-й групп имели место отдельные подрагивания тела, данный показатель варьировал от особи к особи, в связи с чем достоверных отличий по данному показателю между группами не выявлено. Уменьшение длины тела также продолжало сокращаться во всех группах, но различия по данному параметру между группами были недостоверны. По остальным четырем критериям по-прежнему достоверное улучшение отмечалось лишь у 4-й группы по сравнению со всеми остальными группами.

При введении раствора БДНФ (таблица) увеличение содержания его концентрации в головном мозге было недостоверно выше (на 11%), чем при введении физраствора ($p > 0{,}05$). При введении БДНФ, сорбированного на НЧ, оно достоверно увеличивалось на 16% ($p < 0{,}05$) по сравнению с группой, получавшей физраствор, а при введении БДНФ, сорбированного на НЧ с полоксамером — на 20% ($p < 0{,}01$). По сравнению с раствором БДНФ, при введении БДНФ, сорбированного на НЧ, и БДНФ, сорбированного на НЧ с полоксамером,

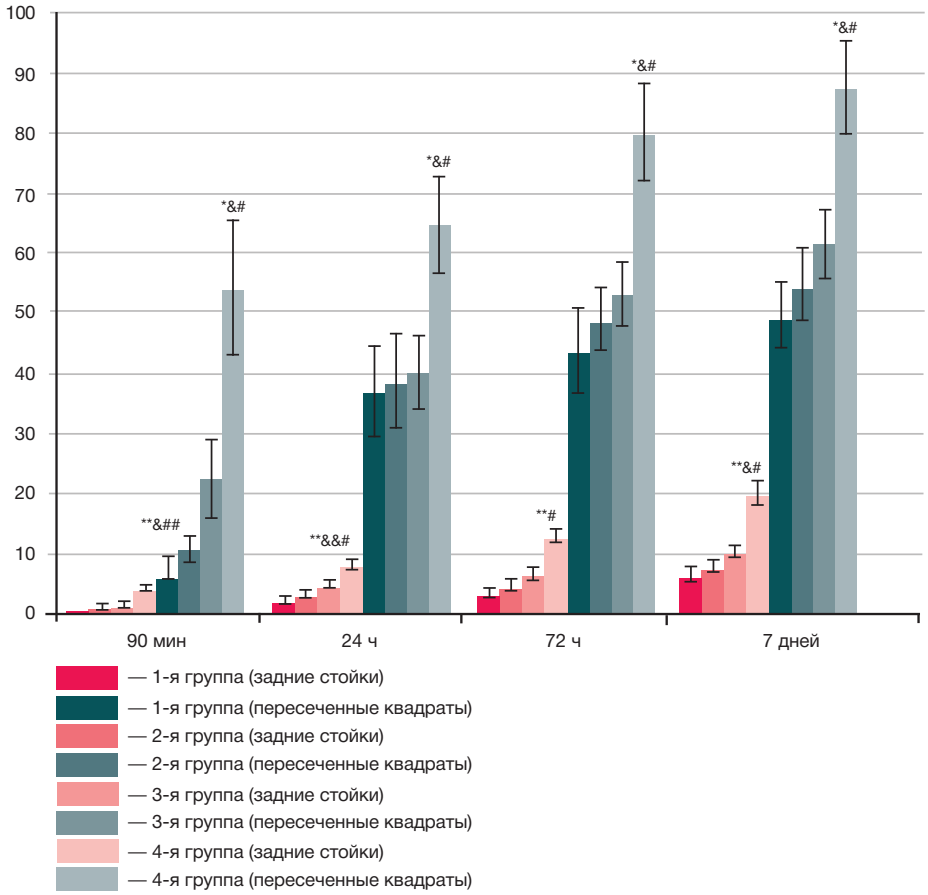


Рис. 1. Результаты теста «открытое поле» у контрольных и экспериментальных мышей в модели паркинсонизма (m ± SEM). * — $p < 0{,}05$ при сравнении с 1-й группой, ** — $p < 0{,}01$ при сравнении с 1-й группой, & — $p < 0{,}05$ при сравнении со 2-й группой, && — $p < 0{,}01$ при сравнении со 2-й группой, # — $p < 0{,}05$ при сравнении с 3-й группой, ## — $p < 0{,}01$ при сравнении с 3-й группой

содержние БДНФ в тканях мозга было достоверно выше ($p < 0,01$). Также достоверно различалось содержание БДНФ в тканях мозга при введении БДНФ, сорбированного на НЧ с полоксамером, и без последнего ($p < 0,05$).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Проведенные исследования показали, что при внутривенном введении БДНФ, сорбированного на полилактидных НЧ, покрытых полоксамером 188, достоверно увеличивается

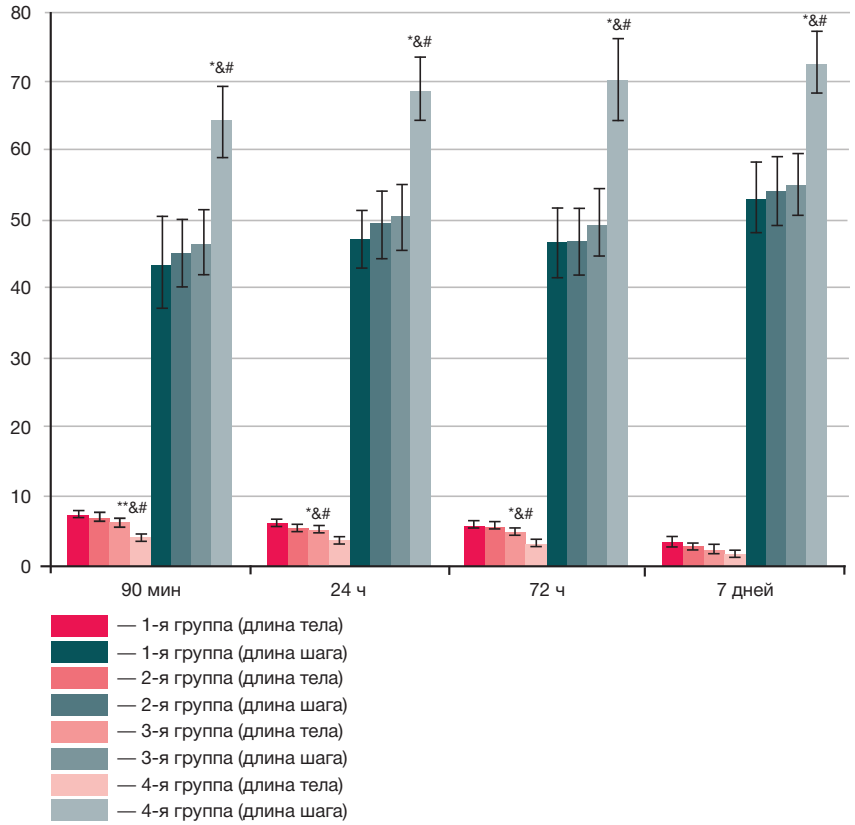


Рис. 2. Длина тела и шага у контрольных и экспериментальных мышей в модели паркинсонизма, мм (m ± SEM). * — $p < 0,05$ при сравнении с 1-й группой, ** — $p < 0,01$ при сравнении с 1-й группой, & — $p < 0,05$ при сравнении со 2-й группой, && — $p < 0,01$ при сравнении со 2-й группой, # — $p < 0,05$ при сравнении с 3-й группой, ## — $p < 0,01$ при сравнении с 3-й группой

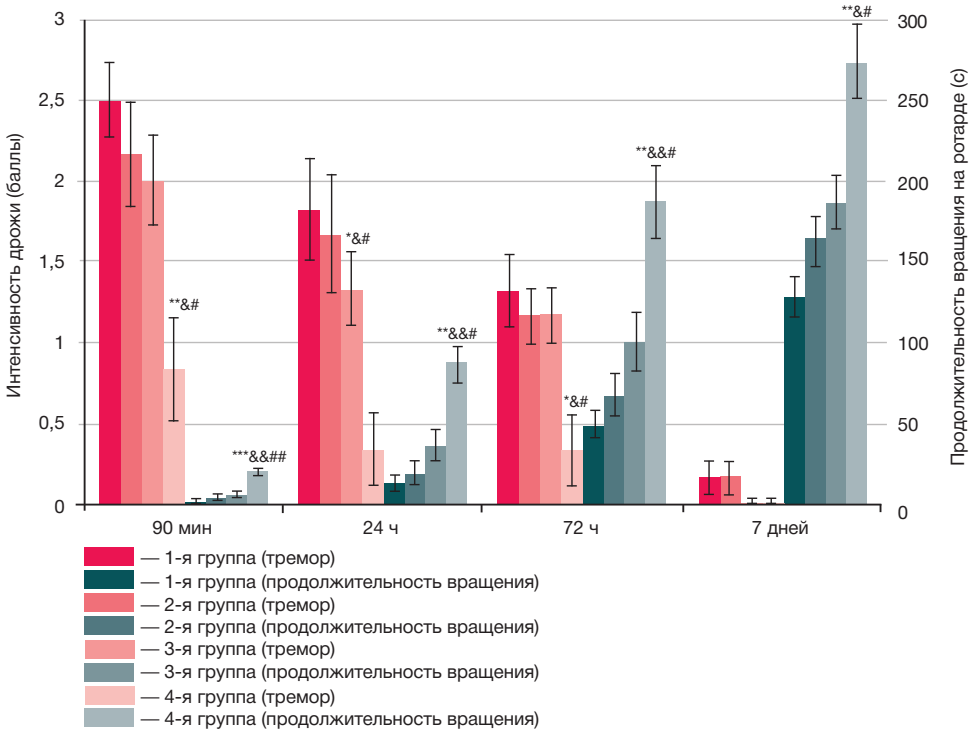


Рис. 3. Тремор (баллы) и продолжительность вращения на ротароде (с) у контрольных и экспериментальных мышей в модели паркинсонизма (m ± SEM). * — $p < 0,05$ при сравнении с 1-й группой, ** — $p < 0,01$ при сравнении с 1-й группой, & — $p < 0,05$ при сравнении со 2-й группой, && — $p < 0,01$ при сравнении со 2-й группой, # — $p < 0,05$ при сравнении с 3-й группой, ## — $p < 0,01$ при сравнении с 3-й группой

Таблица. Содержание БДНФ в тканях головного мозга после внутривенного введения различных форм БДНФ и физраствора мышам с паркинсонизмом (pg/mg, m+/–SE)

1-я группа	2-я группа	3-я группа	4-я группа
163,91 ± 10,17	184,03 ± 2,28	194,51 ± 1,14*##	204,46 ± 3,71**##&

Примечание: * — $p < 0,05$ в сравнении с физраствором; ** — $p < 0,01$ в сравнении с физраствором; ## — $p < 0,01$ в сравнении с БДНФ; & — $p < 0,05$ в сравнении с БДНФ, сорбированном на НЧ.

его концентрация в головном мозге. Доставленный в головной мозг БДНФ способствует значительному уменьшению выраженности симптомов, возникших в модели паркинсонизма, вызванного МФТП. Системное введение раствора чистого БДНФ не оказывало значимого противопаркинсонического действия. Статистически достоверное уменьшение ригидности и нормализация локомоторной активности были отмечены только в группе животных, получавших БДНФ, сорбированный на покрытых полоксамером НЧ. Этот эффект можно было наблюдать, начиная с 45 мин после введения МФТП на протяжении 7 дней. Аналогично только в этой группе животных было отмечено влияние препарата на тремор, вызванный введением МФТП. Тенденция к увеличению/увеличение содержания БДНФ при введении раствора БДНФ может свидетельствовать о наличии транспортных систем в клетках ГЭБ.

Данные нашего исследования коррелируют с результатами, полученными при изучении направленного транспорта с помощью наноразмерных коллоидных частиц. В экспериментах с использованием полибутилцианоакрилатных НЧ, покрытых полисорбатом 80, была показана возможность доставки в головной мозг фактора роста нервов (NGF). Последний уменьшал выраженность симптомов паркинсонизма, вызванных у мышей МРТР [9, 10].

В настоящее время активно исследуется активирующее влияние БДНФ на регенерацию нервной ткани. Показано, что инкубирование нервной ткани в среде, содержащей БДНФ, приводит к увеличению плотности синаптических контактов и увеличению выживаемости нейронов [11]. Кроме того, БДНФ увеличивает выделение ацетилхолина и глутамата синаптическими структурами периферической и ЦНС [12, 13]. Эти медиаторы являются ключевыми в механизме функционирования экстрапирамидной системы и развития паркинсонизма. Как показали исследования ряда авторов, БДНФ стимулирует дофаминергические нейроны [14]. В то же время непосредственное введение в мозг БДНФ уменьшало выраженность вызванных МФТП симптомов паркинсонизма [15].

Таким образом, можно предположить, что доставляемый с помощью НЧ в головной мозг БДНФ способен уменьшать выраженность симптомов вызванного МФТП паркинсонизма за счет прямой стимуляции выделения медиаторов и/или стимуляции регенераторной способности дофаминергических нейронов.

ВЫВОДЫ

Полученные результаты показали, что полилактидные НЧ, покрытые полоксамером 188, способны транспортировать БДНФ через ГЭБ, создавая в головном мозге его концентрацию, способную оказывать физиологическое действие.

Литература

1. Аляутдин Р. Н., Дешмух Р., Петров В. Е. Транспорт лекарственных веществ через гематоэнцефалический барьер. Вестник НИИ Молекулярной медицины. 2003; 11–29.
2. Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD. Nanoparticle technology for drug delivery across blood-brain barrier. Drug Dev Ind Pharm. 2002; 28 (1): 1–13.
3. Begley DJ. Understanding and circumventing the blood-brain barrier. Acta Paediatr Suppl. 2003; (92): 83–91.
4. Lefauconneir JM. The blood brain barrier. J Physiological data. 1998; 140 (1): 3–13.
5. Alyautdin RN, Petrov VE, Kharkevich DA, Kreuter J. Passage of peptides across the blood-brain barrier with nanoparticles. Eur J Pharm Sci. 1994; (3): 91–2.
6. Bibel M, Barde Y. Neurotrophins: key regulator of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev. 2000; (14): 2919–37.
7. Castellenos-Ortega MR, Cruz-Aguado R, Martinez-Marty L. Nerve growth factor: possibilities and limitations of its clinical application. Rev Neurol. 1999; 29 (5): 439–71.
8. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. Restor Neurol Neurosci. 2000; 16 (2): 135–42.
9. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. Adv Drug Deliv Rev. 2001; (47): 65–81.
10. Kurakhmaeva K, Djindjikhashvili I, Petrov V, Balabanjan V, Voronina T, Trofimov S et al. Brain targeting of nerve growth factor using poly(butylcyanoacrilate) nanoparticles. J Drug Targ. 2009; (17): 564–74.
11. Limongi T, Rocchi A, Cesca F, Tan H, Miele E, Giugni A. Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor by 3D Biocompatible Polymeric Scaffolds for Neural Tissue Engineering and Neuronal Regeneration. Mol Neurobiol. 2018 Mar 29; DOI: 10.1007/s12035-018-1022-z.
12. Tyler WJ, Perrett, Pozzo-Miller LD. The role of neurotrophins in neurotransmitter release. Neuroscience. 2002; (8): 524–31.
13. Schindowski K, Belarbi K, Buée L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. Genes Brain Behav. 2008; (7): 43–56.
14. Bhurtel S, Katila N, Neupane S, Srivastav S, Park PH, Choi D. Methyleneblue protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity by upregulating brain-derived neurotrophic factor. Ann N Y Acad Sci, 2018. DOI: 10.1111/nyas.13870. Доступно по ссылке: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29882218#.
15. Chen JF, Wang M, Zhuang YH, Behnisch T. Intracerebroventricularly-administered 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and brain derived neurotrophic factor affect catecholaminergic nerve terminals and neurogenesis in the hippocampus, striatum and substantia nigra. Neural Regen Res. 2018; (13): 717–26. DOI: 10.4103/1673-5374.230300.

References

1. Alyautdin RN, Deshmukh R, Petrov VE. Transport lekarstvennykh veshchestv cherez gematoencephalicheskiy barier. Vestnik NII Molekulyarnoy meditsiny. 2003; 11–29.
2. Lockman PR, Mumper RJ, Khan MA, Allen DD. Nanoparticle technology for drug delivery across blood-brain barrier. Drug Dev Ind Pharm. 2002; 28 (1): 1–13.
3. Begley DJ. Understanding and circumventing the blood-brain barrier. Acta Paediatr Suppl. 2003; 92: 83–91.
4. Lefauconneir JM. The blood brain barrier. J Physiological Data. 1998; 140 (1): 3–13.
5. Alyautdin RN, Petrov VE, Kharkevich DA, Kreuter J. Passage of peptides across the blood-brain barrier with nanoparticles. Eur J Pharm Sci. 1994; (3): 91–2.
6. Bibel M, Barde Y. Neurotrophins: key regulator of cell fate and cell shape in the vertebrate nervous system. Genes Dev. 2000; (14): 2919–37.
7. Castellenos-Ortega MR, Cruz-Aguado R, Martinez-Marty L. Nerve growth factor: possibilities and limitations of its clinical application. Rev Neurol. 1999; 29 (5): 439–71.
8. Przedborski S, Jackson-Lewis V, Djaldetti R, Liberatore G, Vila M, Vukosavic S, Almer G. The parkinsonian toxin MPTP: action and mechanism. Restor Neurol Neurosci. 2000; 16 (2): 135–42.
9. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. Adv Drug Deliv Rev. 2001; (47): 65–81.
10. Kurakhmaeva K, Djindjikhashvili I, Petrov V, Balabanjan V, Voronina T, Trofimov S et al. Brain targeting of nerve growth factor using poly(butylcyanoacrilate) nanoparticles. J Drug Targ. 2009; (17): 564–74.
11. Limongi T, Rocchi A, Cesca F, Tan H, Miele E, Giugni A. Delivery of Brain-Derived Neurotrophic Factor by 3D Biocompatible Polymeric Scaffolds for Neural Tissue Engineering and Neuronal Regeneration. Mol Neurobiol. 2018 Mar 29. DOI: 10.1007/s12035-018-1022-z.
12. Tyler WJ, Perrett, Pozzo-Miller LD. The role of neurotrophins in neurotransmitter release. Neuroscience. 2002; (8): 524–31.
13. Schindowski K, Belarbi K, Buée L. Neurotrophic factors in Alzheimer's disease: role of axonal transport. Genes Brain Behav. 2008; (7): 43–56.
14. Bhurtel S, Katila N, Neupane S, Srivastav S, Park PH, Choi D. Methyleneblue protects dopaminergic neurons against MPTP-induced neurotoxicity by upregulating brain-derived neurotrophic factor. Ann N Y Acad Sci. 2018.DOI: 10.1111/nyas.13870. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29882218#.
15. Chen JF, Wang M, Zhuang YH, Behnisch T. Intracerebroventricularly-administered 1-methyl-4-phenylpyridinium ion and brain derived neurotrophic factor affect catecholaminergic nerve terminals and neurogenesis in the hippocampus, striatum and substantia nigra. Neural Regen Res. 2018; (13): 717–26. DOI: 10.4103/1673-5374.230300.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ДЕНДРИМЕРНОЙ НАНОКОНСТРУКЦИИ С RGD-ПЕПТИДОМ ДЛЯ РАДИОНУКЛИДНОЙ ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Ю. В. Стукалов[1], Е. Ю. Григорьева[1] ✉, А. В. Смирнова[1,3], А. А. Липенгольц[1,2], И. Ю. Кубасова[1], Н. В. Позднякова[1], М. И. Лукашина[4]

[1] Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва

[2] Федеральный медицинский биофизический центр имени А. И. Бурназяна, Москва

[3] Московский клинический научно-практический центр имени А. С. Логинова, Москва

[4] Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии имени Дмитрия Рогачева, Москва

Радионуклидная терапия (РНТ) является эффективным методом лечения множественных метастазов злокачественных опухолей. Расширение номенклатуры злокачественных новообразований, для которых возможно применение РНТ, происходит за счет создания новых туморотропных радиофармацевтических препаратов (РФП). Перспективно создание РФП на основе универсальной транспортной платформы, которая может быть модифицирована различными терапевтическими и диагностическими радионуклидами, а также векторными молекулами для достижения требуемой специфичности к опухолям и терапевтической эффективности. Целью работы было оценить в качестве такой транспортной платформы конструкцию на основе оригинального дендримера. Исследование на мышах показало его низкую токсичность ($ЛД_{50}$ достигало 779 ± 111 мг/кг). Туморотропность и терапевтическую эффективность дендримера исследовали на примере наноконструкции (НК) из дендримера, RGD-пептида и радионуклида ^{188}Re (^{188}Re-НК). В качестве опухолевой модели использовали мышиную карциному легкого Льюиса LLC1. Данные биораспределения предложенной НК показали ее эффективное накопление в опухоли с коэффициентом дифференциального накопления более 1 по отношению к основным органам и тканям и временем удержания в опухоли не менее 6 ч. Введение ^{188}Re-НК в дозе 185 МБк/кг мышам с подкожно трансплантированной опухолью статистически достоверно ($p < 0,05$) способствовало торможению роста опухоли к 7-м суткам после введения до T/C = 5%, сохраняющемуся в течение 6 суток. Проведенные исследования показали перспективность исследованного дендримера как транспортной платформы для РНТ.

Ключевые слова: дендример, RGD-пептид, ^{188}Re, радионуклидная терапия, биораспределение, исследование на животных, перевивные опухолевые модели

✉ **Для корреспонденции:** Елена Юрьевна Григорьева
Каширское шоссе, д. 24, г. Москва, 115478; grig-elen11@mail.ru

Статья получена: 12.09.2018 **Статья принята к печати:** 11.10.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.089

EXPERIMENTAL STUDY OF DENDRIMER-BASED NANOPARTICLES WITH RGD-PEPTIDE FOR ANTICANCER RADIONUCLIDE THERAPY

Stukalov YuV[1], Grigorieva EYu[1] ✉, Smirnova AV[1,3], Lipengolts AA[1,2], Kubasova IYu[1], Pozdniakova NV[1], Lukashina MI[4]

[1] Blokhin National Medical Research Center of Oncology, Moscow

[2] Burnazyan Federal Medical Biophysical Center, Moscow

[3] Loginov Moscow Clinical Scientific Center, Moscow

[4] Dmitry Rogachev National Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology, Moscow

Radionuclide therapy (RNT) is an effective modality for treating multiple metastases in patients with cancer. The list of malignancies that can be managed with RNT expands with the arrival of novel tumoritropic radiopharmaceuticals (RP). A versatile delivery platform capable of carrying various therapeutic and diagnostic radionuclides, as well as vector molecules needed to achieve sufficient specificity to tumor cells and ensure therapeutic efficacy may hold great promise for radiation therapy. The aim of this work was to assess the performance of a delivery system based on the original dendrimer. The dendrimer demonstrated low toxicity in mice (LD_{50} was 779 ± 111 mg/kg). To study the specificity of the dendrimer to tumor cells and its therapeutic efficacy, we used a nanostructure (NS) composed of the dendrimer itself, the RGD peptide and ^{188}Re (^{188}Re-NS). Lewis lung carcinoma LLC1 was used as a tumor model. The biodistribution analysis revealed that the compound effectively accumulated in the tumor demonstrating a tumor-to-normal ratio >1 (relative to healthy organs and tissues) and retention time of at least 6 hours. Injections of 185 MBq/kg ^{188}Re-NS caused a statistically significant inhibition of tumor growth ($p < 0.05$) by day 7 following the injection (T/C = 5%), which remained stable for 6 days. Our findings suggest that the proposed dendrimer is a promising platform for RP delivery.

Keywords: dendrimer, RGD peptide, ^{188}Re, radionuclide therapy, biodistribution, research in animals, transplanted tumor model

✉ **Correspondence should be addressed:** Elena Yu. Grigorieva
Kashirskoe shosse 24, Moscow, 115478; grig-elen11@mail.ru

Received: 12.09.2018 **Accepted:** 11.10.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.089

Наличие препаратов, способных эффективно и избирательно накапливаться в опухолевых тканях, является определяющим фактором в обеспечении терапевтической эффективности таких методов лечения злокачественных опухолей, как радионуклидная терапия, нейтрон-захватная и фотон-захватная виды терапии [1]. В последнее время большой интерес вызывает разработка препаратов на основе дендримеров [2–6] — шарообразных молекул 2–10 нм, содержащих во внешней сфере большое количество химических функциональных групп, позволяющих присоединять к дендримеру различные молекулы. На их основе можно создавать конструкции с присоединенным к дендримеру опухолеспецифичным агентом для обеспечения туморотропности и диагностическим и/или терапевтическим агентом для обеспечения функциональной пригодности. Ранее нами были показаны возможность и перспективность такого подхода для терапии и диагностики злокачественных опухолей [7–8]. Перспективным может быть подход с использованием рецепторов опухолевых клеток к некоторым низкомолекулярным соединениям. Так, конструкции на основе дендримеров с β-эстрадиолом показали эффективное накопление в трансплантированной аденокарциноме молочной железы Ca755 [9]. В настоящей работе адресным компонентом конструкции служит RGD-пептид, который связывается с интегринами на поверхности опухолевых клеток [10–17].

Целью работы было экспериментально *in vivo* изучить возможности применения конструкций на основе созданных нами дендримеров в лучевой терапии и диагностике.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследованная наноконструкция (НК) представляет собой дендример первой генерации, к которому ковалентно присоединены сафранин для связывания перрената и RGD-пептид для обеспечения туморотропности. Дендример, лежащий в основе изучаемой НК, описан в более ранней работе [7]. На рис. 1 представлена описанная НК; ее строение подтверждено ПМР-спектроскопией.

В качестве терапевтического агента использовали радионуклид ^{188}Re. Период полураспада ^{188}Re составляет 17 ч. Данный радионуклид при распаде испускает β-излучение с энергией, равной 2,12 МэВ, обеспечивающее противоопухолевый эффект, и γ-излучение, в том числе с энергий 155 кэВ и выходом 15,2%, позволяющим контролировать распределение РФП в организме больного с помощью γ-камеры [18–23]. Генераторная система ^{188}W/^{188}Re позволяла продуцировать радионуклид ^{188}Re в течение 4–6 месяцев [24], поэтому проводить мечение соединений ^{188}Re возможно непосредственно перед применением РФП.

Мечение НК при помощи ^{188}Re осуществляли путем добавления перрената натрия, элюированного из генератора ^{188}Re ГРЕН-1 (АО ГНЦ РФ ФЭИ; Россия). При приготовлении рабочих растворов соединений количества ^{188}RE-НК рассчитывали в соответствии с молярностью вносимого ^{188}Re (1 МБк ^{188}Re — 0,00015 нМ). Для полного связывания ^{188}Re брали не менее чем 100-кратный избыток НК; радиоизотоп добавляли в исследуемые соединения *ex tempore*. ЯМР-спектры снимали на спектрометре WH-360 (Bruker; Германия) с рабочей частотой 360 МГц. Тонкослойную хроматографию проводили с использованием пластинок с силикагелем типа Si 60 (размер частиц 5–17 мкм) (Fluka; США). Хроматограммы проявляли в парах йода.

Оценку острой токсичности ^{188}RE-НК проводили только по токсичности исходного немодифицированного дендримера, вследствие высокой стоимости RGD-пептида. Токсикологические испытания дендримера проводили на здоровых самцах мышей линии Balb/c весом 19–21 г (питомник ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий», филиал «Столбовая»; Россия). Все исследования на животных были выполнены в соответствии с этическими нормами обращения с животными [25].

Животных содержали при естественном освещении в стандартных условиях конвенционального вивария. Для проведения исследования формировали 10 групп одновозрастных животных по 6 особей в группе. Исследование проводили для 10 доз дендримера. Дендример, растворенный в 0,9%-м растворе NaCl с 10%-м содержанием ДМСО, вводили животным однократно интраперитонеально в объеме 0,2 мл раствора. Дозы дендримера на мышь составляли: 62,5 мг/кг; 125 мг/кг; 187,5 мг/кг; 250 мг/кг; 375 мг/кг; 500 мг/кг; 750 мг/кг; 1000 мг/кг; 1250 мг/кг; 1500 мг/кг. Наблюдение за животными осуществляли в течение 30 дней, ежедневно отмечая изменения в их общем состоянии и поведении. Павших мышей вскрывали, оценивали степень изменения внутренних органов. По окончании эксперимента оставшихся в живых мышей подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации. Критериями оценки острой токсичности соединения служили: число павших животных и сроки их гибели, клиническая картина развивавшегося процесса и изменение поведенческих реакций, а также посмертные патологические изменения в тканях и внутренних органах (макроскопическая оценка) [26–28]. В дальнейшем, с использованием программы BioStat Pro 2008 5.0.1 (AnalystSoft; США), были рассчитаны значения токсических доз.

Биораспределение созданной конструкции ^{188}RE-НК изучали в сравнении с биораспределением ^{188}Re-перрената

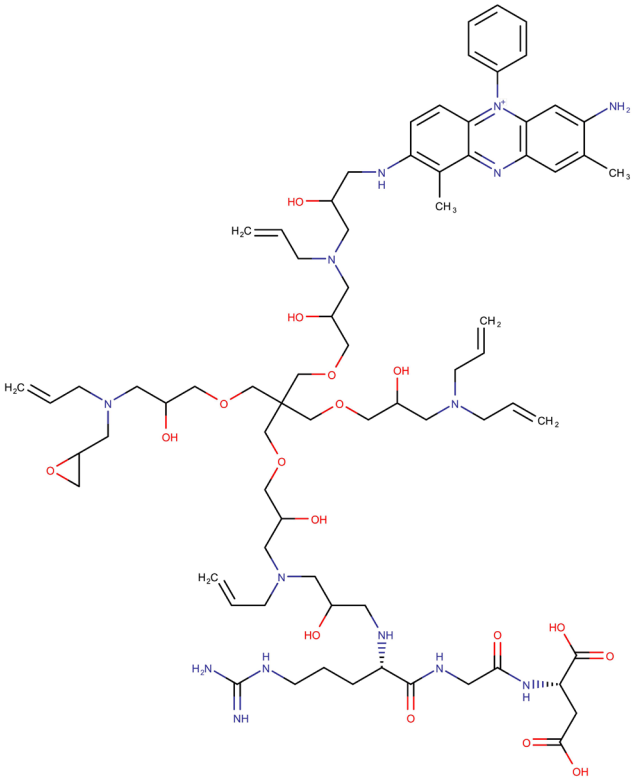


Рис. 1. Конструкция на основе дендримера с RGD-пептидом

натрия на животных с подкожно (п/к) трансплантированной опухолью LLC1 (из коллекции опухолевых штаммов ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н. Н. Блохина»; Россия). Выбор данного штамма был обусловлен данными о равномерном распределении в опухоли рецептора αvβ3, который является RGD-связывающим интегрином [29]. Мышей-самцов C57Bl/6 весом 19–21 г группировали по 6 особей на каждую группу животных. Суспензию опухолевых клеток (4 000 000 кл./мышь) вводили под кожу правого бедра. На 10-й день после трансплантации LLC1 вводили внутривенно по 0,2 мл исследуемых соединений. Количество радиоактивности каждого вводимого соединения составляло 1,85 МБк на одно животное (92,5 МБк/кг). Для отбора образцов тканей животных декапитировали и проводили аутопсию с взятием артериальной крови. Аутопсию проводили через 1, 3, 6, 9, 12 и 24 ч после однократного введения. Дозы радиоактивности вводимых соединений измеряли на дозкалибраторе IZOMED 2010 (MED Nuklear-Medizintechnik Dresden GmbH; Германия). Распределение исследовали с помощью прямой радиометрии биологических образцов. Уровень радиоактивности измеряли на сцинтилляционном автоматическом гамма-счетчике WIZARD 2480 (Perkin Elmer; США). Оценку результатов накопления осуществляли по содержанию ^{188}Re в 1 г ткани/органа в процентах от введенного количества.

Изучение терапевтической эффективности ^{188}RE-НК проводили на мышах-самцах линии C57Bl/6 весом 20–22 г. Мышей группировали по 8 особей. Через двое суток после п/к трансплантации LLC1 животным одноразово системно вводили по 0,2 мл ^{188}Re-перрената натрия и ^{188}RE-НК в 0,9%-м растворе NaCl. Были исследованы следующие дозы по активности ^{188}Re: 15 МБк/кг, 92,5 МБк/кг, 185 МБк/кг

Таблица 1. Распределение во времени ^{188}Re-НК и ^{188}Re в органах и тканях мышей с подкожно трансплантированной LLC1 (в % от введенного количества на 1 г органа/ткани)

Наименование органа, ткани	Соединение	Время после введения соединения					
		1 ч	3 ч	6 ч	9 ч	12 ч	24 ч
Кровь	^{188}Re-НК	14,90 ± 0,20	10,40 ± 0,51	7,76 ± 0,25	4,42 ± 0,24	2,31 ± 0,20	1,32 ± 0,12
	^{188}Re	15,04 ± 0,12	9,40 ± 0,80	7,36 ± 0,20	5,00 ± 0,34	2,64 ± 0,48	0,94 ± 0,24
		p >0 ,2	p > 0,2	p > 0,1	p > 0,1	p > 0,2	p > 0,1
Печень	^{188}Re-НК	5,22 ± 0,36	4,09 ± 0,13	3,69 ± 0,23	3,06 ± 0,25	1,02 ± 0,07	0,07 ± 0,01
	^{188}Re	5,44 ± 0,29	4,66 ± 0,42	3,53 ± 0,18	1,98 ± 0,51	1,36 ± 0,24	0,15 ± 0,05
		p > 0,2	p > 0,2	p > 0,2	p > 0,1	p > 0,1	p > 0,1
Почки	^{188}Re-НК	7,27 ± 0,42	5,04 ± 0,21	4,47 ± 0,29	3,32 ± 0,35	1,84 ± 0,19	0,35 ± 0,07
	^{188}Re	7,34 ± 0,46	5,35 ± 0,56	3,67 ± 0,35	2,08 ± 0,41	1,44 ± 0,25	0,35 ± 0,07
		p > 0,8	p > 0,5	p > 0,1	p > 0,1	p > 0,1	p > 0,6
Легкие	^{188}Re-НК	10,01 ± 0,50	7,46 ± 0,31	5,68 ± 0,16	4,61 ± 0,32	2,75 ± 0,23	0,34 ± 0,06
	^{188}Re	10,09 ± 0,50	7,79 ± 0,52	5,52 ± 0,26	3,31 ± 0,38	1,99 ± 0,33	0,30 ± 0,05
		p > 0,5	p > 0,2	p > 0,3	p > 0,1	p > 0,1	p > 0,2
Селезенка	^{188}Re-НК	9,77 ± 1,17	7,66 ± 0,43	4,74 ± 0,35	4,15 ± 0,30	2,16 ± 0,06	0,29 ± 0,05
	^{188}Re	9,52 ± 0,40	6,90 ± 0,37	4,72 ± 0,47	3,01 ± 0,20	1,95 ± 0,33	0,31 ± 0,11
		p > 0,8	p > 0,1	p > 0,8	p > 0,1	p > 0,2	p > 0,8
Кость бедренная	^{188}Re-НК	5,61 ± 5,61	3,77 ± 3,77	3,14 ± 3,14	2,13 ± 2,13	1,45 ± 1,45	0,44 ± 0,44
	^{188}Re	5,02 ± 0,29	3,98 ± 0,38	2,77 ± 0,21	1,58 ± 0,06	1,11 ± 0,09	0,44 ± 0,05
		p > 0,1	p > 0,5	p > 0,1	p > 0,1	p > 0,1	p > 0,8
Опухоль	^{188}Re-НК	8,16 ± 0,26	8,20 ± 0,14	8,24 ± 0,06	6,54 ± 0,35	3,15 ± 0,35	1,17 ± 0,07
	^{188}Re	6,06 ± 0,17	3,82 ± 0,26	2,32 ± 0,42	1,90 ± 0,16	1,14 ± 0,09	0,66 ± 0,07
		p < 0,03	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,01	p < 0,05	p < 0,05

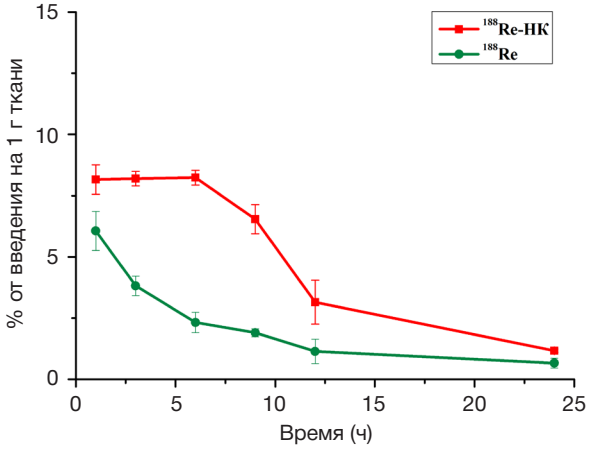


Рис. 2. Динамика накопления (% от введенной активности на 1 г ткани) ^{188}Re-НК и ^{188}Re-перрената натрия у мышей-самцов C57Bl/6 в подкожно трансплантированной LLC1

(0,3 МБк, 1,85 МБк, 3,7 МБк на животное). В контрольной группе вводили 0,2 мл 0,9%-го NaCl. В течение всего эксперимента ежедневно измеряли размеры опухолей и их объемы. По полученным данным в группах контроля и эксперимента рассчитывали стандартный количественный показатель противоопухолевого действия T/C по формуле [30]:

$$T/C = 100 \cdot V_{опыт} / V_{контр},$$

где $V_{опыт}$ — средний объем опухолей у животных в экспериментальной группе, $V_{контр}$ — средний объем опухолей у животных в контрольной группе.

Для анализа данных использовали программы OriginPro 8.0 (OriginLab; США) и Excel 2003 (Microsoft; США). Статистическую значимость полученных результатов определяли при помощи непараметрического U-критерия Манна–Уитни, а различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Критериями оценки наличия острой токсичности соединения служили число павших животных и сроки их гибели с момента введения дендримера. Было установлено, что гибель животных начинается при введении дозы дендримера 500 мг/кг (2 из 6 животных), 4 из 6 животных погибают при дозе 1000 мг/кг и все животные в группе погибают при дозе 1500 мг/кг. При введении летальных доз дендримера мышам в течение первых 30 мин наблюдали транзиторное двигательное возбуждение, переходящее в сопорозное состояние. Смерть животных наступала в зависимости от дозы дендримера в течение 144 ч. У выживших мышей в течение первых 5 дней после введения соединения отмечали транзиторную потерю массы тела (5–8%) и проявление повышенной двигательной активности. При проведении некропсии животных было отмечено следующее: сердце, почки, селезенка и легкие — без визуально выраженной патологии; брюшина — без видимых изменений и гиперемии; печень — увеличена в размерах, края притуплены. При введении в сублетальных дозах соединение не вызывало видимых нарушений состояния и поведения животных: признаков атаксии или местных парезов не наблюдали. Мыши прибавляли в весе в соответствии с динамикой контрольной группы, состояние видимых кожных покровов не изменялось. При аутопсии выведенных из эксперимента животных видимых изменений внутренних органов не выявили. На основании данных о количестве павших животных в каждой из 10 экспериментальных групп были рассчитаны токсические дозы дендримера для мышей: $ЛД_{10}$ = 270 ± 92 мг/кг; $ЛД_{16}$ = 382 ± 94 мг/кг; $ЛД_{50}$ = 779 ± 111 мг/кг; $ЛД_{84}$ = 1177 ± 196 мг/кг; $ЛД_{90}$ = 1289 ± 260 мг/кг; $ЛД_{100}$ = 1376 ± 367 мг/кг.

Результаты распределения ^{188}RE-НК в сравнении с ^{188}Re-перренатом натрия в организме мышей с п/к трансплантированной LLC1 представлены в табл. 1. Статистически значимые различия были выявлены только при анализе данных о накоплении соединений в опухоли. Динамика накопления ^{188}Re-НК и ^{188}Re-перрената натрия в образцах LLC1 представлена на рис. 2.

В связи с тем что ^{188}Re-НК разрабатывается для противоопухолевой радиотерапии, важной фармакокинетической характеристикой является дифференциальный уровень накопления данного соединения в опухоли. С этой целью были рассчитаны величины коэффициентов дифференциального накопления (КДН) — отношения удельной активности опухоли к удельной активности других органов и тканей (табл. 2). Почти для всех органов и тканей после 3 ч величина отношений для ^{188}Re-НК выше 1, что свидетельствует о более интенсивном выведении соединения из органов по сравнению с опухолью. В то же время для ^{188}Re скорость выведения из опухоли была сопоставима с выведением из печени и костной ткани.

Терапевтическую эффективность определяли в течение месяца после трансплантации опухоли животным.

Таблица 2. Сравнительные данные дифференциального уровня накопления ^{188}Re-НК и ^{188}Re в органах и тканях мышей

Наименование органа, ткани	Соединение	Время после введения соединения					
		1 ч	3 ч	6 ч	9 ч	12 ч	24 ч
Опухоль/кровь	^{188}Re-НК	0,55 ± 0,02	0,79 ± 0,04	1,06 ± 0,04	1,48 ± 0,04	1,36 ± 0,06	0,89 ± 0,11
	^{188}Re	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,06	0,32 ± 0,07	0,38 ± 0,05	0,45 ± 0,11	0,72 ± 0,18
		$p > 0,1$	$p < 0,05$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p > 0,1$
Опухоль/печень	^{188}Re-НК	1,57 ± 0,14	2,01 ± 0,09	2,24 ± 0,13	2,15 ± 0,24	3,09 ± 0,29	16,55 ± 2,7
	^{188}Re	1,11 ± 0,04	0,82 ± 0,02	0,66 ± 0,14	1,02 ± 0,37	0,86 ± 0,19	4,65 ± 1,25
		$p < 0,05$	$p < 0,004$	$p < 0,001$	$p < 0,004$	$p < 0,001$	$p < 0,001$
Опухоль/почки	^{188}Re-НК	1,12 ± 0,07	1,63 ± 0,04	1,85 ± 0,11	1,99 ± 0,22	1,73 ± 0,30	3,42 ± 0,85
	^{188}Re	0,83 ± 0,07	0,72 ± 0,08	0,63 ± 0,09	0,95 ± 0,27	0,81 ± 0,19	1,91 ± 0,15
		$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,05$	$p < 0,05$
Опухоль/легкие	^{188}Re-НК	0,82 ± 0,06	1,10 ± 0,06	1,45 ± 0,05	1,43 ± 0,17	3,86 ± 0,80	13,92 ± 2,56
	^{188}Re	0,60 ± 0,04	0,49 ± 0,05	0,42 ± 0,09	0,58 ± 0,10	0,59 ± 0,14	2,18 ± 0,17
		$p < 0,05$	$p < 0$, 004	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,02$	$p < 0,002$
Опухоль/селезенка	^{188}Re-НК	0,84 ± 0,11	1,07 ± 0,04	1,75 ± 0,12	1,58 ± 0,05	1,46 ± 0,12	4,09 ± 0,80
	^{188}Re	0,64 ± 0,04	0,55 ± 0,02	0,49 ± 0,04	0,63 ± 0,08	0,60 ± 0,14	2,26 ± 0,64
		$p < 0,05$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,004$
Опухоль/кость бедренная	^{188}Re-НК	1,46 ± 0,10	2,17 ± 0,01	2,64 ± 0,23	3,08 ± 0,22	2,18 ± 0,32	2,67 ± 0,15
	^{188}Re	1,21 ± 0,10	0,97 ± 0,13	0,85 ± 0,21	1,20 ± 0,14	1,04 ± 0,14	1,51 ± 0,31
		$p < 0,05$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,004$	$p < 0,05$	$p < 0,004$
Опухоль ^{188}Re-НК/Опухоль ^{188}Re		1,35 ± 0,05	2,15 ± 0,19	3,55 ± 0,66	3,45 ± 0,32	2,76 ± 0,51	1,79 ± 0,24

При однократном введении ^{188}Re-НК выраженный противоопухолевый эффект ($p < 0,05$) на всех сроках наблюдения имел место только при введении дозы 185 МБк/кг (табл. 3, рис. 3А). После введения животным ^{188}Re-перрената натрия в дозе 185 МБк/кг терапевтического эффекта не наблюдали (рис. 3Б). Значения количественного параметра противоопухолевого эффекта Т/С для исследованных доз 188Re представлены в табл. 3.

Наблюдаемый противоопухолевый эффект носил дозозависимый характер: в использованном диапазоне доз ^{188}Re-НК при максимальной дозе, равной 185 МБк/ кг, наблюдали значимый противоопухолевый эффект; при промежуточной дозе, равной 92,5 МБк/кг, — слабовыраженный и при дозе 15 МБк/кг — незначительный. Представленные кривые роста опухолей наглядно иллюстрируют динамику описанных процессов. Таким образом, были определены минимально эффективные концентрации ^{188}Re-НК для достижения терапевтического эффекта.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В результате проведенных исследований было установлено, что токсичность предложенного дендримера сопоставима с токсичностью аналогичных дендримеров данного класса, исследованных ранее [31].

Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что ^{188}Re-НК, попадая в опухоль, удерживается тканями опухоли длительное время: до 6 ч после введения соединения. На протяжении 6 ч содержание ^{188}Re-НК в опухоли остается достаточно высоким и составляет 8,2% от введенного количества. Это может свидетельствовать о прочном связывании ^{188}Re-НК со структурами опухолевой ткани. При аналогичном анализе динамики накопления ^{188}Re-перрената натрия такого эффекта не наблюдалось. Максимальное соотношение активностей ^{188}Re-НК и ^{188}Re-перрената натрия в опухолевых тканях составило 3,55 ± 0,660 через 6 ч после введения.

Полученный *in vivo* значимый противоопухолевый эффект при дозе ^{188}Re-НК, равной 185 МБк/кг, с учетом коэффициентов межвидового пересчета составляет для человека 15,42 МБк/кг, тогда как типичные значения терапевтических доз существующих РФП достигают 44–47 МБк/кг [32]. Это позволяет снизить лучевую нагрузку на пациента при сохранении терапевтической эффективности. Еще одно преимущество предлагаемой нами конструкции — ее низкая токсичность. В нашем исследовании для полного связывания ^{188}Re использовали 100-кратный избыток НК; доза НК при 185 МБк/кг составляет $4,05 \cdot 10^{-3}$ мг/кг (или $2,16 \cdot 10^{-3}$ мг/кг по дендримеру), что ниже ЛД10 на 5 порядков. В совокупности описанные эффекты позволяют рассматривать предложенную НК как перспективную для создания РФП.

ВЫВОДЫ

В результате проведенного исследования была показана принципиальная возможность применения конструкций на основе созданных дендримеров как средства направленной доставки противоопухолевого агента, определен минимальный порог терапевтической дозы ^{188}Re в полученном соединении и показано, что действие синтезированного дендримера носит дозозависимый характер. Исследование острой токсичности на мышах показало низкую токсичность конструкции ^{188}Re-НК. Установлена низкая токсичность исследуемого соединения, позволяющая достигать значимого противоопухолевого эффекта при вводимых дозах намного меньше дозы ЛД10. Выявленные уровни накопления и время удержания ^{188}Re-НК в опухолевой ткани дают основание предполагать возможность достижения высокой терапевтической дозы β-излучения в патологическом очаге при ее использовании. Введение ^{188}Re в составе ^{188}Re-НК в дозе 185 МБк/кг вызывает значимый противоопухолевый эффект в течение 18 дней после лечения.

Таблица 3. Оценка эффективности противоопухолевого действия ^{188}Re-НК на подкожно трансплантированную опухоль LLC1

Время после введения, сут.	7 сут.			14 сут.			18 сут.		
Доза активности по ^{188}Re, МБк/кг	15	92,5	185	15	92,5	185	15	92,5	185
Т/С, %	100	41	5	74	55	13	87	75	20

Примечание. Сроки оценки показателей эффективности даны на 7-е, 14-е и 18-е сутки после лечения.

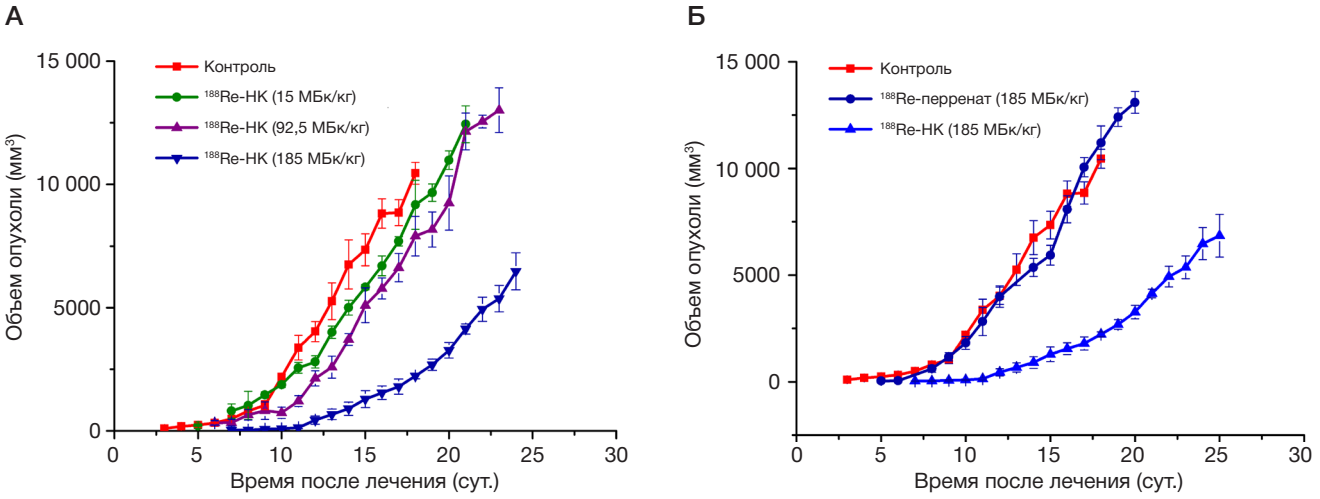


Рис. 3. Динамика роста п/к трансплантированной опухоли LLC1 в организме мышей C57Bl/6 после однократного введения ^{188}Re-НК с различными дозами ^{188}Re (**А**); после однократного введения 188Re-перрената натрия и ^{188}Re-НК (доза ^{188}Re = 185 МБк/кг) (**Б**)

Литература

1. Kulakov VN, Lipengolts AA, Grigorieva EY, Shimanovskii NL. Pharmaceuticals for Binary Radiotherapy and Their Use for Treatment of Malignancies (A Review). Pharm Chem J. 2016 Sep 8; 50 (6): 388–93.
2. Rakesh Kumar Tekade, Palanirajan Vijayaraj Kumar, Narendra Kumar Jain. Dendrimers in Oncology: An Expanding Horizon. Chem Rev. 2009; 109: 49–87.
3. Wu L-P, Ficker M, Christensen JB. Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges. Bioconjugate Chem. 2015; 26: 1198–211.
4. Olson ES, Jiang T, Aguilera T, Nguyen QT, Ellies LG, Scadeng M, et al. Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for in vivo fluorescence and MR imaging of proteases. Proc Natl Acad Sci. 2010; 107 (9): 4311–6.
5. Palmerston Mendes L, Pan J, Torchilin V. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. Molecules. 2017; 22 (9): 1401.
6. Xu L, Yeudall WA, Yang H. Folic acid-decorated polyamidoamine dendrimer exhibits high tumor uptake and sustained highly localized retention in solid tumors: Its utility for local siRNA delivery. Acta Biomater. 2017; (57): 251–61.
7. Stukalov YuV, Grigorieva EYu, Kulakov VN, Baryshnikov AYu. Transport platform synthesis for drug development. Pharmaceutical chemistry journal. 2017; 51 (6): 480–1.
8. Григорьева Е. Ю., Стукалов Ю. В., Смирнова А. В., Колдаева Е. Ю., Калыгина Н. С., Кулаков В. Н. и др. Цитотоксическое действие конструкций на основе дендримеров с 188Re с моноклональными антителами анти-ICO-25 (MUC1) и анти-ICO-80 (CD5) На моделях клеточных линий SKOV-3 (рак яичника) и Jurkat (Т-лимфобластная лимфома). Химико-фармацевтический журнал. 2018; 52 (8): 3–6.
9. Григорьева Е. Ю., Стукалов Ю. В., Колдаева Е. Ю. Конструкции на основе дендримеров нового класса для таргетной радиотерапии онкологических заболеваний. Российский биотерапевтический журнал. 2009; 8 (1): 5–6.
10. Domingo-Espín J, Petegnief V, de Vera N. RGD-based cell ligands for cell-targeted drug delivery act as potent trophic factors. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2012; (8): 1263–6.
11. Берман А. Е., Козлова Н. И., Морозевич Г. Е. Интегрины как потенциальная мишень для целевой терапии рака. Биомедицинская химия. 2013; 59 (3): 239–48.
12. Miller LM, Pritchard JM, Macdonald SJF, Jamieson C, Watson AJB. The Emergence of Small Molecule Non-RGD-mimetic Inhibitors for RGD Integrins Journal of Medicinal Chemistry. 2017; 60 (8): 3241–51.
13. Hwang R, Varner J. The role of integrins in tumor angiogenesis. Hematol Oncol Clin North Am. 2004; 18 (5): 991–1006.
14. Koistinen P, Ahonen M, Kähäri VM, Heino J. AlphaV integrin promotes in vitro and in vivo survival of cells in metastatic melanoma. Int J Cancer. 2004; 112 (1): 61–70.
15. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev. 2005; 24 (2): 195–222.
16. Veeravagu A, Liu Z, Niu G, Chen K, Jia B, Cai W et al. Integrin alphavbeta3-targeted radioimmunotherapy of glioblastoma multiforme. Clin Cancer Res. 2008; (14): 7330–9.
17. Landen CN, Kim TJ, Lin YG, Merritt WM, Kamat AA, Han LY et al. Tumour-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer. Neoplasia. 2008; 10 (11): 1259–67.
18. Beiki D, Tajik M, Haddad P, Fallahi B, Arefpour AM, Mirzaei H et. al. Effectiveness and complications of 188Re-HEDP in palliative treatment of diffuse skeletal metastases. Iran J Nucl Med. 2015; 23 (1): 44–8.
19. Erfani M, Doroudi A, Dinari MA, Shirmardi SP. Preparation of a rhenium-188 labeled bisphosphonate for bone pain palliation therapy. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2015; 303 (3): 2027–32.
20. Zamora PO, Gulhke S, Bender H. Experimental radiotherapy of receptor-positive human prostate adenocarcinoma with 188Re-RC-160, a directly-radiolabeled somatostatin analogue. Int J Cancer. 1999; (6): 214–20.
21. Molina-Trinidad EM, Arteaga de Murphy C, Ferro-Flores G. Radiopharmacokinetic and dosimetric parameters of 188Re-lanreotide in athymic mice with induced human cancer tumors. Int J Pharm. 2006; (310): 125–30.
22. Krylov V, Kochetova T, Smolyarchuk M, Petriev V, Kanygin V, Alexandrova A et al. Evaluation of 188Re-khedp (phosphoren) for palliative treatment in patients with bone metastases., World Journal of Nuclear Medicine. 2013; 12 (2): 255–6.
23. Kochetova T, Smolyarchuk M, Krylov V, Voloznev V, Lunev A, Petriev VM. 188Re-zoledronic acid: first in man study. World Journal of Nuclear Medicine. 2013; 12 (2): 228–9.
24. Konior M, Iller E. Classic Radionuclide 188W/188Re Generator (Experiments, Design and Construction). Mod Chem appl. 2014; (2): 143.
25. Европейская конвенция по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей, ЕЭС, Страсбург, 1985 г. Ланималогия. 1993; (1): 29 с.
26. Беленький М. Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта: Л.: Изд-во «МедГиз», 1968; 151 с.
27. Гуськова Т. А. Токсикология лекарственных средств: М.: Изд-во «Русский врач», 2003; 154 с.
28. Трахтенберг И. А., Сова А. Е., Шефтель В. О., Оникиенко Ф. А. Проблема нормы в токсикологии. М.: Изд-во «Медицина», 1992; 208 с.
29. Seguin J, Nicolazzi C, Mignet N, Scherman D, Chabot GG. Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours. Tumour Biol. 2012; 33 (5): 1709–17.
30. Трещалина Е. М., Жукова О. С., Герасимова Г. К., Андронова Н. В. и др. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств. В книге: Миронов А. Н., Бунатян Н. Д. и др., редакторы. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К., 2012; с. 642–657.
31. Колдаева Е. Ю., Григорьева Е. Ю., Стукалов Ю. В. Сравнительная токсикология наноконструкций на основе дендримеров для таргетной радиотерапии в онкологии. Российский биотерапевтический журнал. 2010; 9 (3): 13–14.
32. Argyrou M, Valassi A, Andreou M, Lyra M. Rhenium-188 Production in Hospitals, by W-188/Re-188 Generator, for Easy Use in Radionuclide Therapy. Int J Mol Imaging. 2013; (2013): 1–7.

References

1. Kulakov VN, Lipengolts AA, Grigorieva EYu, Shimanovskii NL. Pharmaceuticals for Binary Radiotherapy and Their Use for Treatment of Malignancies (A Review). Pharm Chem J. 2016 Sep 8; 50 (6): 388–93.
2. Rakesh Kumar Tekade, Palanirajan Vijayaraj Kumar, Narendra Kumar Jain. Dendrimers in Oncology: An Expanding Horizon. Chem Rev. 2009; 109: 49–87.
3. Wu L-R, Ficker M, Christensen JB. Dendrimers in Medicine: Therapeutic Concepts and Pharmaceutical Challenges. Bioconjugate Chem. 2015; 26: 1198–211.
4. Olson ES, Jiang T, Aguilera T, Nguyen QT, Ellies LG, Scadeng M, et al. Activatable cell penetrating peptides linked to nanoparticles as dual probes for in vivo fluorescence and MR imaging of proteases. Proc Natl Acad Sci. 2010; 107 (9): 4311–6.
5. Palmerston Mendes L, Pan J, Torchilin V. Dendrimers as Nanocarriers for Nucleic Acid and Drug Delivery in Cancer Therapy. Molecules. 2017; 22 (9): 1401.
6. Xu L, Yeudall WA, Yang H. Folic acid-decorated polyamidoamine

dendrimer exhibits high tumor uptake and sustained highly localized retention in solid tumors: Its utility for local siRNA delivery. Acta Biomater. 2017; (57): 251–61.
7. Stukalov YuV, Grigorieva EYu, Kulakov VN, Baryshnikov AYu. Transport platform synthesis for drug development. Pharmaceutical chemistry journal. 2017; 51 (6): 480–1.
8. Grigorieva EYu, Stukalov YV, Smirnova AV, Koldaeva EY, Kalygina NS, Kulakov VN et al. Cytotoxicity of Conjugates of 188Re-Labeled Dendrimers and Monoclonal Antibodies Anti-ICO-25 (MUC1) and Anti-ICO-80 (CD5) Against SKOV-3 (Ovary Cancer) and Jurkat Tumor Cell Lines (T-Lymphoblstic Lymphoma). Pharm Chem J. 2018; 52 (8): 681–4.
9. Grigorieva EYu, Stukalov YuV, Koldaeva EYu. Konstruktsii na osnove dendrimerov novogo klassa dlya targetnoy radioterapii onkologicheskikh zabolevaniy. Rossiyskiy bioterapevticheskiy zhurnal. 2009; 8 (1): 5–6. Russian.
10. Domingo-Espín J, Petegnief V, de Vera N. RGD-based cell ligands for cell-targeted drug delivery act as potent trophic factors. Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine. 2012; (8): 1263–6.
11. Berman AE, Kozlova, NI, Morozevich GE. Integrins as a potential target for targeted anticancer therapy. Biochem. Moscow Suppl Ser B. 2012; 6 (3): 205–10.
12. Miller LM, Pritchard JM, Macdonald SJF, Jamieson C, Watson AJB. The Emergence of Small Molecule Non-RGD-mimetic Inhibitors for RGD Integrins Journal of Medicinal Chemistry. 2017; 60 (8): 3241–51.
13. Hwang R, Varner J. The role of integrins in tumor angiogenesis. Hematol Oncol Clin North Am. 2004; 18 (5): 991–1006.
14. Koistinen P, Ahonen M, Kähäri VM, Heino J. AlphaV integrin promotes in vitro and in vivo survival of cells in metastatic melanoma. Int J Cancer. 2004; 112 (1): 61–70.
15. Kuphal S, Bauer R, Bosserhoff AK. Integrin signaling in malignant melanoma. Cancer Metastasis Rev. 2005; 24 (2): 195–222.
16. Veeravagu A, Liu Z, Niu G, Chen K, Jia B, Cai W et al. Integrin alphavbeta3-targeted radioimmunotherapy of glioblastoma multiforme. Clin Cancer Res. 2008; (14): 7330–9.
17. Landen CN, Kim TJ, Lin YG, Merritt WM, Kamat AA, Han LY et al. Tumour-selective response to antibody-mediated targeting of alphavbeta3 integrin in ovarian cancer. Neoplasia. 2008; 10 (11): 1259–67.
18. Beiki D, Tajik M, Haddad P, Fallahi B, Arefpour AM, Mirzaei H et. al. Effectiveness and complications of 188Re-HEDP in palliative treatment of diffuse skeletal metastases. Iran J Nucl Med. 2015; 23 (1): 44–8.
19. Erfani M, Doroudi A, Dinari MA, Shirmardi SP. Preparation of a rhenium-188 labeled bisphosphonate for bone pain palliation therapy. Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry. 2015; 303 (3): 2027–32.
20. Zamora PO, Gulhke S, Bender H. Experimental radiotherapy of receptor-positive human prostate adenocarcinoma with 188Re-RC-160, a directly-radiolabeled somatostatin analogue. Int J Cancer. 1999; (6): 214–20.
21. Molina-Trinidad EM, Arteaga de Murphy C, Ferro-Flores G. Radiopharmacokinetic and dosimetric parameters of 188Re-lanreotide in athymic mice with induced human cancer tumors. Int J Pharm. 2006; (310): 125–30.
22. Krylov V, Kochetova T, Smolyarchuk M, Petriev V, Kanygin V, Alexandrova A et al. Evaluation of 188Re-khedp (phosphoren) for palliative treatment in patients with bone metastases., World Journal of Nuclear Medicine. 2013; 12 (2): 255–6.
23. Kochetova T, Smolyarchuk M, Krylov V, Voloznev V, Lunev A, Petriev VM. 188Re-zoledronic acid: first in man study. World Journal of Nuclear Medicine. 2013; 12 (2): 228–9.
24. Konior M, Iller E. Classic Radionuclide 188W/188Re Generator (Experiments, Design and Construction). Mod Chem appl. 2014; (2): 143.
25. Evropejskaja konvencija po zashhite pozvonochnyh zhivotnyh, ispol'zuemyh dlja jeksperimental'nyh i drugih nauchnyh celej, EJeS, Strasburg, 1985 g. Lanimalogija. 1993; (1): 29 s.
26. Belenkiy ML. Jelementy kolichestvennoj ocenki farmakologicheskogo jeffekta: L.: Izd-vo «MedGiz», 1968; 151 s.
27. Guskova TA. Toksikologiya lekarstvennyh sredstv: M.: Izd-vo «Russkij vrach», 2003; 154 s.
28. Trahtenberg IA, Sova AE, Sheftel VO, Onikienko FA. Problema normy v toksikologii. M.: Izd-vo «Medicina», 1992; 208 s.
29. Seguin J, Nicolazzi C, Mignet N, Scherman D, Chabot GG. Vascular density and endothelial cell expression of integrin alpha v beta 3 and E-selectin in murine tumours. Tumour Biol. 2012; 33 (5): 1709–17.
30. Treshhalina EM, Zhukova OS, Gerasimova GK, Andronova NV i dr. Metodicheskie rekomendacii po doklinicheskomu izucheniju protivoopuholevoj aktivnosti lekarstvennyh sredstv. V knige: Mironov AN, Bunatjan ND i dr., redaktory. Rukovodstvo po provedeniju doklinicheskih issledovanij lekarstvennyh sredstv. M.: Grif i K., 2012; S. 642–657.
31. Koldaeva EYu, Grigorieva EYu, Stukalov YuV. Sravnitel'naja toksikologija nanokonstrukcij na osnove dendrimerov dlja targetnoj radioterapii v onkologii. Rossijskij Bioterapevticheskij Zhurnal. 2010; 9 (3): 13–14.
32. Argyrou M, Valassi A, Andreou M, Lyra M. Rhenium-188 Production in Hospitals, by W-188/Re-188 Generator, for Easy Use in Radionuclide Therapy. Int J Mol Imaging. 2013; (2013): 1–7.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ СИСТЕМЫ НА ОСНОВЕ ПОЛИ-3-ОКСИАЛКАНОАТОВ: МИКРО- И НАНОСТРУКТУРА

А. П. Бонарцев[1,2] ✉, Г. А. Бонарцева[2], В. В. Воинова[1], М. П. Кирпичников[1], К. В. Шайтан[1]

[1] Биологический факультет, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[2] Институт биохимии имени А. Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва

Биоразлагаемые и биосовместимые полимеры, полиоксиалканоаты (ПОА), активно используют для изготовления широкого спектра лекарственных форм, придающих лекарственным средствам такие свойства, как пролонгированное действие, направленная доставка, сниженная токсичность, увеличенная стабильность. В основном в медицинской промышленности используют ПОА, полученные химическим синтезом, но растет интерес к использованию в фармацевтике природных ПОА, полученных биотехнологическим путем. В статье обсуждаются разработка и исследование разнообразных лекарственных форм, полученных на основе природных ПОА как вспомогательных веществ для антибактериальных, противовоспалительных, противоопухолевых, обезболивающих, гормональных и других средств, и связь их свойств с микро- и наноструктурой изделий. Лекарственные системы на основе ПОА позволят устранить недостатки активных действующих веществ, связанных с особенностями их физико-химических характеристик в традиционных лекарственных формах.

Ключевые слова: поли-3-оксиалканоаты, поли-3-оксибутират, микрочастицы, наночастицы, наноструктура, пролонгированное высвобождение

Финансирование: работа поддержана грантом РНФ, проект № 17-74-20104 в рамках раздела 1 и грантом РФФИ офи-м, проект № 15-29-04856 в рамках раздела 2.

✉ **Для корреспонденции:** Антон Павлович Бонарцев
Ленинские горы, д. 1, стр. 12, г. Москва, 119234; ant_bonar@mail.ru

Статья получена: 26.08.2018 **Статья принята к печати:** 22.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.083

POLY(3-HYDROXYALKANOATE)-BASED DRUG FORMULATIONS: THE MICRO- AND NANOSTRUCTURE

Bonartsev AP[1,2] ✉, Bonartseva GA[2], Voinova VV[1], Kirpichnikov MP[1], Shaitan KV[1]

[1] Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, Moscow

[2] A. N. Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology, RAS, Moscow

Biodegradable and biocompatible polymers referred to as polyhydroxyalkanoates (PHAs) are extensively used in the production of pharmaceutical drugs to ensure sustained release, targeted delivery, reduced toxicity, and increased stability of the drug substance. Although the pharmaceutical industry ordinarily exploits chemically synthesized PHAs, bioengineered polymers are also starting to enjoy growing interest. This article focuses on the research and development of drug formulations based on natural PHAs that act as auxiliary substances for antibacterial, anti-inflammatory, anticancer, and hormonal medications, as well as pain killers, and discusses the association between their properties and the micro/nano structure of the synthetic drug. The problems associated with the poor performance of active components in traditional dosage forms can be overcome in PHAs-based formulations.

Keywords: poly(3-hydroxyalkanoates), poly(3-hydroxybutyrate), microparticles, nanoparticles, nanostructure, sustained release

Funding: this work was supported by the grant of the Russian Science Foundation (project 17-74-20104, section 1) and the grant of the Russian Foundation for Basic Research (project 15-29-04856, section 2).

✉ **Correspondence should be addressed:** Anton P. Bonartsev
Leninskie gory 1, str. 12, Moscow, 119234; ant_bonar@mail.ru

Received: 26.08.2018 **Accepted:** 22.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.083

Использование поли-3-оксиалканоатов для разработки лекарственных систем на их основе

Разработка инъекционных систем для пролонгированного высвобождения лекарственных веществ (ЛВ) на основе микро- и наночастиц (НЧ), изготовленных из биодеградируемых полимеров полиоксиалканоатов (ПОА) является перспективным направлением в современной фармакологии. Иммобилизация ЛВ в полимерной матрице медицинского изделия или лекарственной формы в виде микрочастиц и НЧ и последующее его пролонгированное высвобождение обеспечивает оптимальный уровень концентрации ЛВ локально в органе или ткани в течение длительного периода времени (до нескольких месяцев), что дает эффективный фармакологический ответ. Поддержание концентрации ЛВ в течение длительного времени в терапевтических, но не токсичных концентрациях позволяет избавиться от побочных эффектов традиционных лекарственных препаратов. Среди побочных эффектов следует отметить повышенную

токсичность, нестабильность, неравномерную подачу и неэффективный расход ЛВ. Применение терапевтических полимерных систем обеспечивает равномерное и целенаправленное высвобождение ЛВ в оптимальной дозе, что очень важно при лечении различных заболеваний, особенно хронических. В настоящее время как в клинической практике, так и в научных исследованиях используют следующие полимеры из этого класса: синтетические — поли-2-оксипропановую (полимолочная (ПМК), полилактиды), поли-2-оксиуксусную кислоты (полигликолевая (ПГК), полигликолиды), поли-6-оксикапролактон (ПКЛ) и природные — поли-3-оксимасляную (поли-3-оксибутират (ПОБ)), поли-4-оксимасляную (П4ОБ), поли-3-оксивалериановую кислоты (поли-3-оксивалерат (ПОВ)), поли-3-оксигексаноат (ПОГк), поли-3-оксиоктаноат (ПОО), их сополимеры и близкие по структуре полимеры, такие как поли-р-диоксанон (ПДС). В фармацевтике уже используют или разрабатывают огромный спектр различных лекарственных форм на основе ПОА, придающих им такие свойства, как направленная доставка, пролонгированное действие, сниженная токсичность, увеличенная стабильность. С 1989 г. на фармацевтическом рынке представлен и активно применяется в клинической практике целый ряд препаратов с лекарственной формой на основе ПОА: пролонги пептидных гормонов на основе микрочастиц из полимолочных-со-полигликолевых кислот (ПМГК) для лечения рака предстательной железы (Zoladex, Lupron Depot, Trelstar, Eligard), акромегалии (Sandostatin LAR, Somatuline) и карликовости (Nutropin depot); пролонг противоопухолевого ЛВ в форме имплантируемой мембраны для лечения множественной глиобластомы (Gliadel); пролонги микрокапсулированных антибиотиков для лечения пародонтоза (Atridox, Arestin); пролонг микрокапсулированного противовоспалительного ЛВ для лечения макулярной эдемы глаза (Ozurdex), пролонг микрокапсулированного антинаркотического ЛВ для лечения алкогольной и наркотической зависимости (Vivitrol); пролонг микрокапсулированного атипического антипсихотического средства для лечения шизофрении (Risperdal Consta) и др. [1].

Активное использование и внедрение в медицинскую практику ПОА обусловлены уникальным сочетанием их свойств: способностью к биодеградации в организме без образования токсичных продуктов, биосовместимостью с органами и тканями человека, физико-химическими свойствами (термопластичностью, специфическими диффузионными свойствами), возможностью использования эффективных технологических процессов при их получении. Несмотря на то что такое сочетание свойств присуще всем представителям класса ПОА, большая доля случаев использования ПОА в фармацевтике принадлежит таким синтетическим ПОА, как поли-2-оксипропановая кислота (полимолочная кислота или полилактид), поли-2-оксиуксусная (полигликолевая кислота или полигликолид) и их сополимеры — ПМГК. Однако эти полимеры являются синтетическими аналогами природных полиоксиалканоатов, поли-3-оксиалканоатов. Природные поли-3-оксиалканоаты представляют собой полиэфиры 3-оксиалкановых кислот, соответственно ПОБ является линейным полиэфиром 3-оксимасляной кислоты. В зависимости от бокового радикала, существуют различные поли-3-оксиалканоаты: ПОБ, поли-3-оксивалерат, поли-3-оксигексаноат, поли-3-оксиоктаноат и т. д. Все они довольно сильно различаются по своим физико-химическим свойствам, таким как кристалличность, температура плавления, температура стеклования, гидрофобность, пластичность, модуль упругости и др. [2].

Природные ПОА являются перспективными полимерными материалами для изготовления лекарственных систем контролируемого высвобождения ЛВ. Для разработки лекарственных систем на основе ПОБ и его сополимеров были использованы различные ЛВ: модельные ЛВ (2,7-дихлорофлуоресцеин, декстран-ФИТЦ, метиловый красный, 7-гидроксиэтилтеофиллин, кальцеин и судановый красный 5Б (Oil Red O), родамин В изотиоцианат, тимохинон), антибиотики и антибактериальные ЛВ (рифампицин, тетрациклин, цефоперазон и гентамицин, сульперазон и дуацид, сульбактам и цефоперазон, фузидиевая кислота, нитрофурал, норфлоксацин, азитромицин, цефтиофур), противоопухолевые ЛВ (5-флуороурацил, 2',3'-диацил-5-флуоро-2'-деоксиуридин, паклитаксел, доцетаксел, рубомицин, такролимус, хлорамбуцил и этопозид, доксорубицин), противовоспалительные ЛВ (индометацин, флурбипрофен, ибупрофен, триамцинолона ацетонид), анальгетики (морфин, гидроксиморфин, кодеин, бупивакаин, трамадол), антитромбогенные ЛВ (дипидирамол, донор оксида азота, нимодипин, фелодипин), гипотензивные (манидипином гидрохлоридом), иммуносупрессоры (финголимод), гормональные контрацептивы (левоноргестрел, модельные и терапевтические белки и пептиды (бычий сывороточный альбумин, фактор роста гепатоцитов, микобактериальный белок для получения вакцин, костный морфогенетический белок, нафарелин, инсулин) [1].

Для получения содержащих ЛВ полимерных изделий и микрочастиц и НЧ на основе ПОБ были использованы различные методы: осаждение из раствора, одно-, двух- и многоэтапное эмульгирование, распылительное высушивание, послойная самосборка в растворе, диализ, осаждение с помощью углекислого газа в сверхкритическом состоянии, электроформование. Для изготовления ЛВ-содержащих медицинских изделий и лекарственных форм были использованы как гомополимер ПОБ, так и его различные сополимеры, а также композиты с другими полимерами и веществами. Получены экспериментальные объекты (пленки), прототипы медицинских изделий, а также микрочастицы и НЧ, содержащие ЛВ [1].

Показана фармакологическая активность и исследована токсичность *in vitro* и *in vivo* некоторых таких медицинских изделий и лекарственных форм на основе ПОА как вспомогательного вещества: антибактериальная активность, цитотоксичность и противоопухолевая активность на культурах опухолевых клеток млекопитающих, биобезопасность и терапевтическая эффективность на лабораторных крысах и мышах [1].

Микро- и наноструктура лекарственных систем на основе ПОА

Внутренняя структура и морфология поверхности биополимерных микрочастиц зависит не только от метода их получения, но и от физико-химических свойств инкапсулируемого ЛВ и полимера, используемого для загрузки ЛВ. Для получения однородных непористых биополимерных микрочастиц инкапсулируемое в них вещество должно быть хорошо растворимо в том же растворителе, который используют для растворения полимера. Так, нами были получены однородные сферические микрочастицы из ПОБ с паклитакселом, имеющие гладкую поверхность, тогда как поверхность

микрочастиц с доксорубицином имеет довольно выраженную ячеистую структуру (рис. 1А, Б).

При не очень хорошей растворимости ЛВ в используемом растворителе могут формироваться кристаллы ЛВ как в полимерной матрице микрочастиц, так и на их поверхности (рис. 1В) [3].

При плохой растворимости ЛВ в используемом растворителе могут формироваться микрочастицы с нарушенной структурой: слоистые, пористые, неправильной формы и т. д. Такие частицы могут образовываться при использовании самых разнообразных методик их изготовления (рис. 1Г).

Загрузка высокомолекулярных биологически активных веществ, прежде всего терапевтических белков в микрочастицы на основе ПОА, сильно влияет на их микроструктуру. Фактически в этом случае образуется композит из полимеров, сильно различающихся по своим физико-химическим свойствам, что приводит к образованию сложных надмолекулярных структур и также нарушению структуры: появлению пористости, слоистости, искажению формы.

Отдельным направлением является получение НЧ из ПОА [4]. Следует отметить, что в настоящее время в фармакологии частицы до 1 мкм диаметром относят к НЧ, так как уже при таком размере начинают проявляться специфические биологические и физико-химические свойства, связанные с размером. Полимерные НЧ обладают особыми свойствами, например способностью к преодолению физиологических барьеров, повышенной всасываемостью слизистыми оболочками бронхов, носоглотки, ротовой полости и желудка, облегченной способностью к проникновению через клеточную мембрану по механизму эндоцитоза, невосприимчивостью к иммунным клеткам (микрофагам, лимфоцитам), и, как следствие, повышенной биодоступностью инкапсулированных ЛВ [5, 6]. Как правило, при получении НЧ используют амфифильные сополимеры ПОА. Это позволяет не только значительно увеличить время миграции НЧ в кровяном русле, но и ковалентно пришивать к ним лиганды направленного действия [7, 8].

На кинетику высвобождения ЛВ из микрочастиц на основе ПОБ и его сополимеров основное влияние оказывает частично кристаллическая наноструктура этого полимера. Как правило, ПОБ образует пластинчатый кристалл с размерами около 0,3–2 мкм и 5–10 мкм вдоль короткой и длинной осей соответственно (рис. 2А).

Толщина кристаллов ПОБ варьируется от 4 до 10 нм, в зависимости от молекулярного веса, растворителя и температуры кристаллизации [9]. На рис. 2Б представлено изображение стопки ламелей. Они выглядят как параллельные полосы шириной 11–40 нм. По некоторым данным, толщина ламелей, измеренная малоугловым рентгеновским рассеиванием в аналогичных пленках ПОБ, составила 6,4 нм [10]. Это различие в толщине ламелей, можно объяснить тем, что плоскости ламелей могут располагаться под различными углами к поверхности пленки (рис. 2Б).

На ультратонких пленках из ПОБ был показано, какие кристаллические структуры склонен образовывать этот полимер. Кристаллическая компонента ПОБ может быть представлена кристаллами, имеющими морфологию «водорослей», двумерными сферолитами (рис. 2В). Эти структуры имеют примерно одинаковую среднюю высоту над подложкой, равную 4,5 нм. Они отличаются

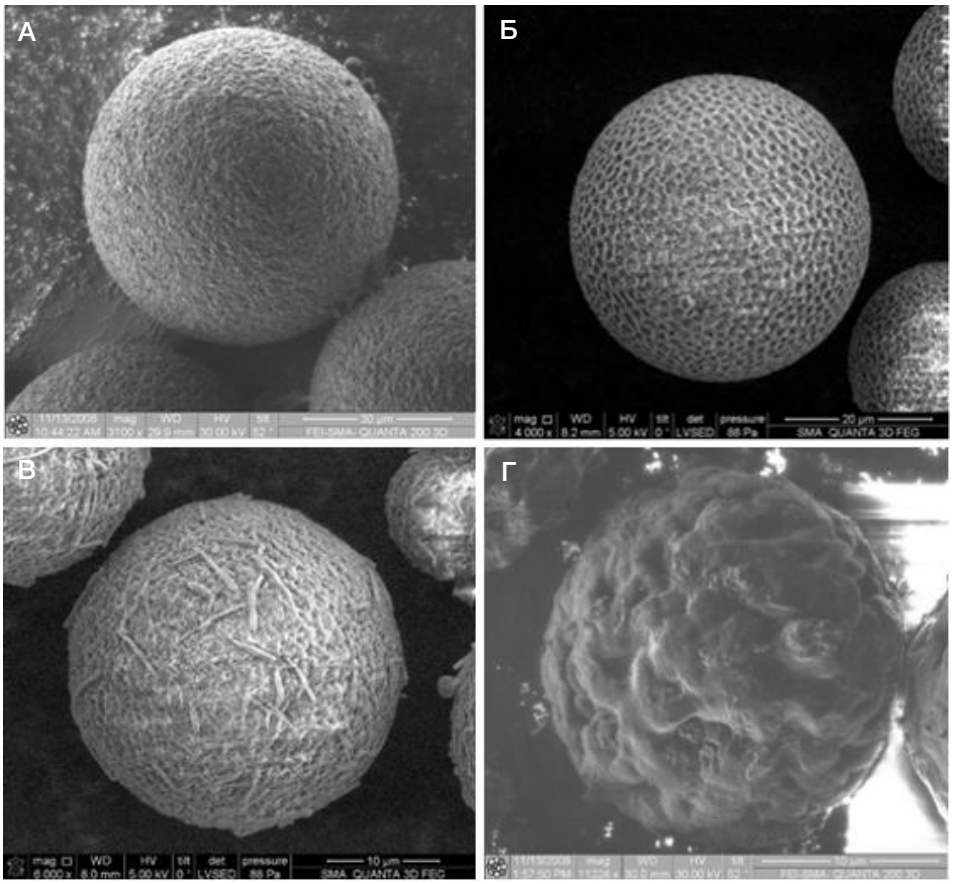


Рис. 1. Микрочастицы из ПОБ с инкапсулированными ЛВ: микрочастицы, загруженные паклитакселом (**А**); микрочастицы, загруженные доксорубицином (**Б**); кристаллы кумарина на поверхности микрочастицы, загруженной этим ЛВ (**В**); микрочастицы, загруженные метотрексатом (**Г**)

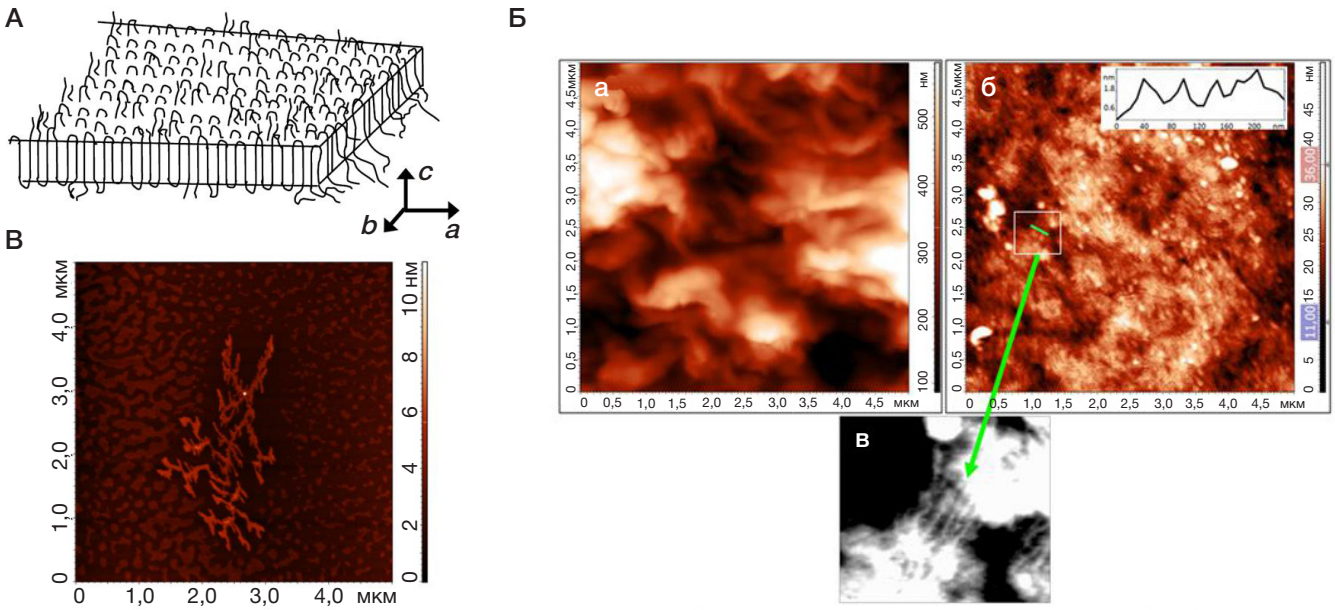


Рис. 2. А. Схематичная модель упаковки молекулярной цепи одиночных кристаллов ПОБ (По данным: Iwata T. et al. [9]). **Б**. Изображение шероховатой (**а**) и гладкой (**б**) поверхности макроскопической пленки ПОБ, а также график сечения стопки ламелей по зеленой линии (**в**). **В**. Топографическое изображение ультратонкой пленки ПОБ; видны кристаллические структуры полимера [19]

направлением роста от центра кристаллизации. Так, кристаллическая компонента растет равномерно во все стороны на плоскости у двумерных сферолитов. У «водорослей» рост кристаллической компоненты осуществляется неравномерно из центра кристаллизации в разные стороны. Наблюдаемые частично кристаллические структуры ПОБ аналогичны структурам, которые формируются в ультратонких пленках других полимеров: полиэтиленоксида, полилактида, полистирола [11].

Контролируемое высвобождение ЛВ из полимерной матрицы ПОБ и его сополимеров косвенно связано с природными свойствами этого биополимера. ПОБ синтезируется в бактериальной клетке в особых структурах — гранулах ПОА или карбоносомах, в которых полимер находится не в кристаллическом (как в выделенном состоянии), а в мобильном аморфном состоянии [12]. Существует гипотеза, что роль пластификатора, который поддерживает аморфное состояние биополимера, выполняет вода, в небольших количествах (5–10%) присутствующая в нативных гранулах ПОБ [12, 13]. Удаление воды из нативных гранул приводит к тому, что полимерные цепи образуют ламеллярно-кристаллическую структуру. Было сделано предположение, что благодаря молекулам воды формируются водородные связи между карбонильными группами полиэфирных цепей и, таким образом, образуется что-то вроде сшивок между соседними полимерными цепями. Такая молекулярная организация может объяснить мобильное аморфное состояние ПОБ *in vivo* [14]. Образцы полимера, высаженные из раствора, обладают наноструктурой, способствующей при помещении их в водную среду диффузии воды в толщу полимерной матрицы, пластифицируя тем самым полимер подобно тому (правда, в очень малой степени), как это происходит в ПОА-гранулах бактерий. В то же время столь специфическая структура ПОБ, даже при поддержании аморфного состояния полимера в гранулах бактерий, препятствует гидролитической деструкции полимера той самой водой, которая его в этих гранулах пластифицирует [15–18]. Вода, пластифицирующая ПОБ, способствует также и длительной диффузии ЛВ, загруженных в изделия и микрочастицы или НЧ на основе этих биополимеров, так как в нативных гранулах ПОБ у бактерий, или так называемых карбоносомах, постоянно происходит активный синтез и расщепление полимерных цепей ПОБ, что сопровождается интенсивной диффузией в матрице аморфного ПОБ мономерных предшественников полимера, АТФ, НАДФ/НАДФН и других низкомолекулярных веществ. Таким образом сам механизм синтеза и расщепления ПОБ в бактериальной клетке предполагает диффузию низкомолекулярных веществ в его полимерной матрице, а взаимодействие биополимера с различными белками в полимерной грануле (карбоносоме) бактериальной клетки предполагает возможность иммобилизации белков и других биомакромолекул в полимерных микрочастицах и НЧ.

ВЫВОДЫ

Можно заключить, что функциональные свойства лекарственных систем на основе ПОА могут быть связаны с биомиметической нано- и микроструктурой этих полимеров, которая в свою очередь обусловлена природными функциями бактериальных ПОА. Разработка новых биомиметических лекарственных систем на основе ПОА позволит устранить недостатки активных действующих веществ с неудовлетворительными физико-химическими характеристиками в традиционных лекарственных формах.

Литература

1. Bonartsev AP. Poly(3-hydroxybutyrate): applications. In: Mishra M, editor. Encyclopedia of Polymer Applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2019; 5250 p. DOI: 10.1201/9781351019422-140000085.
2. Bonartsev AP, Voinova VV, Bonartseva GA. Poly(3-hydroxybutyrate) and human microbiota. Applied biochemistry and microbiology. 2018; 54 (6): 547–68. DOI: 10.1134/S0003683818060066.
3. Lee TH, Wang J, Wang CH. Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: characterization and irradiation studies. J Control Release. 2002; (83): 437–52.
4. Dong Y, Feng SS. Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. Biomaterials. 2005; (26): 6068–76.
5. Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. Nano Today. 2007; (2): 14–21.
6. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis Adv Drug Deliv Rev. 2002; (54): 631–51.
7. Blanco E, Bey EA, Dong Y, Weinberg BD, Sutton DM, Boothman DA, Gao J. β-Lapachone-containing PEG–PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. J Control Release. 2007; (122): 365–74.
8. Nguyen A, Marsaud V, Bouclier C, Top S, Vessieres A, Pigeon P, Gref R, Legrand P, Jaouen G, Renoir JM. Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment. Int J Pharm. 2008; (347): 128–35.
9. Iwata T et al. Enzymatic Degradation and Adsorption on Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals with Two Types of Extracellular PHB Depolymerases from Comamonas acidovorans YM1609 and Alcaligenes faecalis T1. Macromolecules. 1997; 97 (30): 5290–6.
10. Capitán MJ, Rueda DR, Ezquerra TA. Inhibition of the crystallization in nanofilms of poly(3-hydroxybutyrate). Macromolecules. 2004; 15 (37): 5653–9.
11. Liu YX, Chen EQ. Polymer crystallization of ultrathin films on solid substrates. Coordination Chemistry Reviews. 2010; 254 (9–10): 1011–37.
12. Barnard GN, Sanders JK. J Biol Chem. 1989; 264 (6): 3286–91.
13. Harrison ST, Chase HA, Amor SR, Bonthrone KM, Sanders JK. Plasticization of poly(hydroxybutyrate) in vivo. Int J Biol Macromol. 1992; 14 (1): 50–6.
14. Lauzier C, Revol JF, Marchessault RH. FEMS Microbiol Rev. 1992; (103): 299–310.
15. Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog Polym Sci. 2000; (25): 1503–55.
16. Abe H, Doi Y. Structural effects on enzymatic degradability for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers: mini-review. Int J Biol Macromol. 1999; (25): 185–92.
17. Schliecker G, Schmidt C, Fuchs S, Wombacher R, Kissel T. Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. Int J Pharm. 2003; 266 (1–2): 39-49.
18. Kunze C, Edgar Bernd H, Androsch R, Nischan C, Freier T, Kramer S, Kramp B, Schmitz KP. In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material. Biomaterials. 2006; 27 (2): 192–201.
19. Жуйков В. А. Исследование изменений физико-химических свойств поли-3-оксибутирата и его сополимеров в процессе биодеградации in vitro [диссертация]. М.: 2018.

References

1. Bonartsev AP. Poly(3-hydroxybutyrate): applications. In: Mishra M, editor. Encyclopedia of Polymer Applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2019; 5250 p. DOI: 10.1201/9781351019422-140000085.
2. Bonartsev AP, Voinova VV, Bonartseva GA. Poly(3-hydroxybutyrate) and human microbiota. Applied biochemistry and microbiology. 2018; 54 (6): 547–68. DOI: 10.1134/S0003683818060066.
3. Lee TH, Wang J, Wang CH. Double-walled microspheres for the sustained release of a highly water soluble drug: characterization and irradiation studies. J Control Release. 2002; (83): 437–52.
4. Dong Y, Feng SS. Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/montmorillonite nanoparticles for oral delivery of anticancer drugs. Biomaterials. 2005; (26): 6068–76.
5. Gu FX, Karnik R, Wang AZ, Alexis F, Levy-Nissenbaum E, Hong S et al. Targeted nanoparticles for cancer therapy. Nano Today. 2007; (2): 14–21.
6. Brigger I, Dubernet C, Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis Adv Drug Deliv Rev. 2002; (54): 631–51.
7. Blanco E, Bey EA, Dong Y, Weinberg BD, Sutton DM, Boothman DA, Gao J. β-Lapachone-containing PEG–PLA polymer micelles as novel nanotherapeutics against NQO1-overexpressing tumor cells. J Control Release. 2007; (122): 365–74.
8. Nguyen A, Marsaud V, Bouclier C, Top S, Vessieres A, Pigeon P, Gref R, Legrand P, Jaouen G, Renoir JM. Nanoparticles loaded with ferrocenyl tamoxifen derivatives for breast cancer treatment. Int J Pharm. 2008; (347): 128–35.
9. Iwata T et al. Enzymatic Degradation and Adsorption on Poly[(R)-3-hydroxybutyrate] Single Crystals with Two Types of Extracellular PHB Depolymerases from Comamonas acidovorans YM1609 and Alcaligenes faecalis T1. Macromolecules. 1997; 97 (30): 5290–6.
10. Capitán MJ, Rueda DR, Ezquerra TA. Inhibition of the crystallization in nanofilms of poly(3-hydroxybutyrate). Macromolecules. 2004; 15 (37): 5653–9.
11. Liu YX, Chen EQ. Polymer crystallization of ultrathin films on solid substrates. Coordination Chemistry Reviews. 2010; 254 (9–10): 1011–37.
12. Barnard GN, Sanders JK. J Biol Chem. 1989; 264 (6): 3286–91.
13. Harrison ST, Chase HA, Amor SR, Bonthrone KM, Sanders JK. Plasticization of poly(hydroxybutyrate) in vivo. Int J Biol Macromol. 1992; 14 (1): 50–6.
14. Lauzier C, Revol JF, Marchessault RH. FEMS Microbiol Rev. 1992; (103): 299–310.
15. Sudesh K, Abe H, Doi Y. Synthesis, structure and properties of polyhydroxyalkanoates: biological polyesters. Prog Polym Sci. 2000; (25): 1503–55.
16. Abe H, Doi Y. Structural effects on enzymatic degradability for poly[(R)-3-hydroxybutyric acid] and its copolymers: mini-review. Int J Biol Macromol. 1999; (25): 185–92.
17. Schliecker G, Schmidt C, Fuchs S, Wombacher R, Kissel T. Hydrolytic degradation of poly(lactide-co-glycolide) films: effect of oligomers on degradation rate and crystallinity. Int J Pharm. 2003; 266 (1–2): 39-49.
18. Kunze C, Edgar Bernd H, Androsch R, Nischan C, Freier T, Kramer S, Kramp B, Schmitz KP. In vitro and in vivo studies on blends of isotactic and atactic poly (3-hydroxybutyrate) for development of a dura substitute material. Biomaterials. 2006; 27 (2): 192–201.
19. Zhujkov VA. Issledovanie izmenenij fiziko-himicheskih svojstv poli-3-oksibutirata i ego sopolimerov v processe biodegradacii in vitro [dissertacija]. M.: 2018.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ ОКСИДА ЖЕЛЕЗА СФЕРИЧЕСКОЙ И КУБИЧЕСКОЙ ФОРМ ДЛЯ ДОСТАВКИ ДОКСОРУБИЦИНА В КЛЕТКИ ЛИНИИ КАРЦИНОМЫ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ МЫШИ 4Т1

Т. Р. Низамов[1] ✉, А. С. Гаранина[1,2], В. И. Уварова[1,2], В. А. Науменко[1], И. В. Щетинин[3], А. Г. Савченко[1]

[1] Лаборатория биомедицинских наноматериалов, Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

[2] Лаборатория тканеспецифических лигандов, Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва

[3] Кафедра физического материаловедения, Национальный исследовательский технологический университет «МИСиС», Москва

[4] Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва

Магнитные наночастицы (МНЧ) все больше привлекают внимание в качестве перспективного материала для разработки эффективных систем противоопухолевой терапии и диагностики. Целью работы было исследование влияния формы магнитного ядра наночастиц (НЧ) оксида железа на эффективность доставки доксорубицина в клетки линии 4Т1. Наночастицы сферической (СНЧ) и кубической (КНЧ) форм синтезировали методом термического разложения олеата железа (III), что позволило эффективно контролировать их форму и размер. Затем НЧ гидрофилизировали посредством использования Pluronic F-127. В полученные средства доставки загружали доксорубицин в среде натрий-фосфатного буфера. Загрузка составила 15,22% для СНЧ и 15,44% для КНЧ. IC_{50} для незагруженного доксорубицина оказалась равной 1 мкМ, в то время как для СНЧ и КНЧ с препаратом — 6,4 мкМ и 5,5 мкМ соответственно. В протестированном диапазоне концентраций от 1,77 мг/л до 227,2 мг/л цитотоксичность у НЧ без препарата не выявлена. Согласно данным динамики накопления доксорубицина, в клетках 4Т1 активнее всего идет накопление свободного препарата — он локализуется в клеточном ядре. В то же время доксорубицин, загруженный в НЧ, накапливается менее интенсивно и первоначально локализуется в везикулах вокруг ядра, обнаруживаясь в самом ядре лишь после 2 ч совместной инкубации. Противоопухолевый препарат, загруженный в КНЧ, несколько более активно доставляется на ранних сроках инкубации с клетками по сравнению со СНЧ, однако данная разница не существенна.

Ключевые слова: наночастицы оксида железа, форма наночастиц, цитотоксичность, адресная доставка, доксорубицин

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки РФ, соглашение № 14.578.21.0201 (уникальный идентификатор RFMEFI57816X0201).

✉ **Для корреспонденции:** Тимур Радикович Низамов
Ленинский пр-т, д. 4, г. Москва, 119049; nizamov.timur@gmail.com

Статья получена: 28.08.2018 **Статья принята к печати:** 20.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.085

THE USE OF IRON OXIDE MAGNETIC NANOSPHERES AND NANOCUBES FOR TARGETED DOXORUBICIN DELIVERY INTO 4T1 MOUSE BREAST CARCINOMA CELLS

Nizamov TR[1] ✉, Garanina AS[1,2], Uvarova VI[1,2], Naumenko VA[1], Schetinin IV[3], Savchenko AG[1]

[1] Laboratory of Biomedical Nanomaterials, National University of Science and Technology MISiS, Moscow

[2] Laboratory of Tissue-Specific Ligands, Faculty of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow

[3] Department of Physical Materials Science, National University of Science and Technology MISiS, Moscow

[4] D. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow

Magnetic nanoparticles (MNP) are attracting increasing attention as promising materials for the treatment and diagnosis of cancer. The aim of this work was to explore the effect of the magnetic core shape of iron oxide nanoparticles (NP) on the efficacy of doxorubicin delivery into 4T1 cells. Nanospheres (NS) and nanocubes (NC) were synthesized by thermal decomposition of iron (III) oleate. This method of synthesis enables control over the NP shape and size. The NP were hydrophilized using Pluronic F-127. The obtained particles were doped with doxorubicin in a sodium phosphate buffer. The weight fractions of doxorubicin in the NS and NC were 15.22% and 15.44%, respectively. The IC50 of free doxorubicin was 1 μM. The IC_{50} of doxorubicin-loaded NS and NC were 6.4 μM and 5.5 μM, respectively. Unloaded NP did not exhibit any toxicity towards the cells at a studied range of concentrations between 1.77 mg/l and 227.2 mg/l. Free doxorubicin demonstrated more vigorous accumulation dynamics in 4T1 cells with a tendency to localize in cell nucleus, whereas doxorubicin loaded onto iron oxide NP was mainly accumulated in the vesicles surrounding the nucleus and was able to enter it only after being incubated with the cells for 2 h. We conclude that doxorubicin loaded onto cubic-shaped NP is delivered into the cell nucleus a little bit more effectively at early incubation stages in comparison with nanospheres, but the difference is insignificant.

Keywords: iron oxide nanoparticles, nanoparticle shape, cytotoxicity, drug delivery, doxorubicin

Funding: this work was supported by the Project 14.578.21.0201 (ID RFMEFI57816X0201).

✉ **Correspondence should be addressed:** Timur R. Nizamov
Leninsky prospect 4, Moscow, 119049; nizamov.timur@gmail.com

Received: 28.08.2018 **Accepted:** 20.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.085

Магнитные наночастицы (МНЧ), и НЧ оксида железа в частности, в последнее время привлекают все больше внимания в качестве перспективного материала для разработки эффективных систем противоопухолевой терапии и диагностики. Это связано с тем, что современный уровень развития науки и технологий позволяет синтезировать МНЧ с заранее заданными функциональными свойствами, а также контролируемо химически модифицировать их поверхность для последующей адресной доставки лекарств и МРТ-диагностики [1–5]. Благодаря хорошим контрастным свойствам МНЧ средства доставки лекарств на их основе могут использоваться для исследования процессов распределения лекарственных препаратов в ткани-мишени в реальном времени, а также для оценки эффективности терапии [6]. Прочие средства доставки, такие как полимерные НЧ, липосомы, мицеллы и др., не проявляют контрастные свойства, что исключает их применение для исследования распределения *in vivo*. В то же время и у самих МНЧ есть целый ряд недостатков: токсичность, невысокая агрегационная стабильность и, как правило, низкая способность к образованию стабильных ковалентных связей с модификаторами поверхности. Для снижения токсичности и повышения агрегативной стабильности поверхность НЧ покрывают биосовместимой полимерной оболочкой. Применением такого подхода можно добиться высоких контрастных свойств наряду с хорошей агрегативной стабильностью, низкой токсичностью и возможностью иммобилизировать на поверхности этих НЧ необходимые компоненты: лиганды, лекарственные средства, векторы и др. Отдельно следует отметить новый перспективный метод получения средств доставки на основе МНЧ, в котором сначала НЧ оксида железа синтезируют методом термического разложения олеата железа (III) в присутствии стабилизатора (олеиновой кислоты) в среде, а затем выполняют фазовый перенос полученных НЧ в воду посредством Pluronic F-127 — блок-сополимера полиэтиленгликоля с полипропиленгликолем, обладающего поверхностно-активными свойствами. В образовавшейся полимерной оболочке присутствуют гидрофобные сайты, которые можно использовать для доставки гидрофобных лекарств [7–9].

Еще одним важным фактором, влияющим на взаимодействие средства доставки с биологическими системами наряду с химическим составом ядра и состоянием поверхности НЧ, является ее геометрия. Имеющиеся противоречивые данные по поглощению и цитотоксичности ряда наноматериалов показывают, что влияние формы НЧ на их поведение в живых организмах заранее предсказать трудно. Так, в одном исследовании было продемонстрировано большее повреждение ДНК углеродными нанотрубками по сравнению с менее токсичными НЧ сажи сферической формы на первичных фибробластах эмбриона мыши [10]. Авторы предположили, что данный эффект был вызван удлиненной формой нанотрубок с аспект-фактором (соотношением длины к ширине), равным 625. В другой работе наностержни оксида цинка с аспект-фактором 3 оказались менее токсичными, чем наносферы из того же материала, по отношению к клеткам остеосаркомы человека (MG-63) [11]. Еще в одной из работ был показан некоторый рост цитотоксичности и случаев захвата частиц клетками наряду с ростом аспект-фактора НЧ оксида кремния на клетках меланомы человека A375 [12]. Изучались также влияние формы НЧ серебра на рост дрожжей *S. cerevisiae* и интенсивность их захвата клетками [13]. Серебряные нанопластины оказались более токсичными, чем наносферы, нанокубы и наностержни. Авторы предположили, что описанный эффект был обусловлен преобладанием на поверхности нанопластин химически более активных {111} граней, увеличивающих их цитостатическое воздействие на клетки дрожжей. В следующей работе у золотых наносфер — по сравнению с наностержнями золота — были выявлены более активное поглощение НЧ и высокая токсичность по отношению к эпителиальным клеткам MDCK II [14]. В то же время нет данных о влиянии формы МНЧ, в частности оксида железа, на клетки и адресную доставку лекарств.

Доксорубицин является широко известным препаратом для лечения рака с антипролиферативным действием. Он активно используется в клинической практике уже более 40 лет. Однако его применение ограничено низкой селективностью и высокой токсичностью по отношению к неопухолевым клеткам организма. К примеру, наиболее опасными побочными эффектами препарата являются кардиомиопатия и сердечная недостаточность [15]. Таким образом, существует необходимость разработки новых средств доставки препарата, которые помогли бы устранить вышеописанные недостатки. Одним из решений данной проблемы может явиться использование средств доставки лекарств на основе уже упоминавшегося Pluronic F-127 [9]. Доксорубицин способен адсорбироваться на поверхности НЧ, стабилизированных поверхностно-активными веществами, благодаря наличию у них гидрофобных сайтов и далее высвобождаться вследствие механического воздействия на МНЧ, вызванного броуновской релаксацией во внешнем магнитном поле или в кислой среде лизосом после захвата НЧ клетками [16].

В настоящей работе выполнено исследование влияния сферической и кубической форм НЧ оксида железа, модифицированных Pluronic F-127 и загруженных доксорубицином, на взаимодействие с клетками линии 4T1 (карцинома молочной железы мыши), а именно: цитотоксичность МНЧ, эффективность доставки лекарственного препарата в указанные опухолевые клетки и его распределение внутри них.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Pluronic F-127 (Sigma Aldrich; США), деионизированная вода, толуол, хч (Компонент-реактив; Россия), хлорид железа (III), 97% (Sigma Aldrich; США), олеиновая кислота, ≥99% (Roth; Германия), олеат натрия, 95% (Roth; Германия), соляная кислота, хч (СигмаТек; Россия), феррозин, ≥ 97% (Sigma Aldrich; США), ацетат аммония, ≥ 98% (Sigma Aldrich; США), аскорбиновая кислота, ≥99% (Sigma Aldrich; США), доксорубицина гидрохлорид, ≥ 98% (Glentham; Великобритания), таблетки натрий-фосфатного буфера, Biotechnology Grade (Amresco; США,), изопропанол, хч (СигмаТек; Россия), 1-октадецен, ≥ 95% (Sigma Aldrich; США), этанол, ≥ 95% (Sigma Aldrich; США), гексан, хч (СигмаТек; Россия), MTS (Promega; США), диметилсульфоксид, ≥ 99% (Sigma Aldrich; США), стандарт ICP по железу (Sigma Aldrich; США).

Получение средств доставки лекарств и загрузка доксорубицина

Получение сферических и кубических наночастиц

Сферические НЧ получали высокотемпературным термическим разложением олеата железа в соответствии

(с минимальными изменениями) с ранее описанным методом [17, 18]. 100 ммоль олеата натрия и 33 ммоль безводного хлорида железа (III) растворяли в смеси 66,7 мл этанола, 50 мл воды и 116 мл гексана при интенсивном перемешивании. Полученный раствор нагревали до 70 °C и продолжали перемешивание в этих условиях в течение 4 ч. Затем отделяли органическую фазу и выпаривали растворитель на роторном испарителе до получения коричневого воскоподобного комплекса олеата железа (III). 2,2 ммоль полученного олеата железа и 12 ммоль олеиновой кислоты растворяли в 10 мл 1-октадецена. Затем смесь нагревали до 320 °C в атмосфере аргона при интенсивном перемешивании. Скорость нагрева составляла 3,3 °C/мин. Систему выдерживали при температуре 320 °C 60 мин, после чего ее охлаждали до комнатной температуры и далее разбавляли в пять раз изопропанолом. Наночастицы собирали неодимовым магнитом и три раза промывали изопропанолом. Осадок редиспергировали в толуоле путем обработки ультразвуком.

Кубические НЧ синтезировали методом (с минимальными изменениями) высокотемпературного термического разложения олеата железа (III) [19]. 33 мл раствора, содержащего 4 ммоль комплекса олеата железа, 1,3 ммоль олеата натрия и 1,3 ммоль олеиновой кислоты, помещали в трехгорлую колбу с обратным холодильником на 100 мл. Далее систему грели при 140 °C в течение 60 мин для удаления следов воды, затем нагревали со скоростью 4 °C/мин до температуры кипения и выдержали при данной температуре в течение 30 мин. Все процедуры выполняли в атмосфере аргона. Полученный раствор охлаждали до комнатной температуры и выделяли НЧ путем разбавления раствора 320 мл изопропанола и последующей магнитной декантации. Продукт трижды промывали изопропанолом и редиспергировали в толуоле.

Приготовление феррозинового теста

385,4 мг ацетата аммония, 3,2 мг феррозина и 352,2 мг аскорбиновой кислоты взвесили и растворили в 1 мл деионизированной воды. Полученный раствор в дальнейшем использовали для спектрофотометрического измерения концентрации железа.

Фазовый перенос наночастиц в воду с помощью Pluronic F-127

Фазовый перенос полученных НЧ оксида железа в воду выполняли с помощью неионного поверхностно-активного вещества Pluronic F-127 по описанной методике (с некоторыми изменениями) [20, 21]. 15 мл раствора НЧ в толуоле с концентрацией по оксиду железа 1 мг/мл смешивали с таким же объемом раствора Pluronic F-127 с концентрацией C = 25 мг/мл в воде. Систему интенсивно перемешивали в течение ночи. Полученную эмульсию разделяли путем центрифугирования при малой скорости вращения (1000 g) и собирали водную фазу. Затем водную фазу снова центрифугировали при большой скорости вращения (12 000 g) для осаждения НЧ магнетита. Наконец, осадок повторно диспергировали в деионизированной воде при интенсивной обработке ультразвуком. Раствор разбавляли до C = 0,32 мг/мл по оксиду железа.

Загрузка доксорубицина в наночастицы оксида железа, покрытые Pluronic F-127

0,2 мл водного раствора доксорубицина с концентрацией 5 мг/мл и 0,2 мл натрий-фосфатного буфера, концентрированного в пять раз относительно изотонического, с pH = 7,4, добавляли к 10 мл полученного водного раствора НЧ и перемешивали на магнитной мешалке в течение суток при комнатной температуре. Общая концентрация доксорубицина в растворе с НЧ после добавления $C_{общ}$(докс) = 96,0 мг/л. Затем раствор центрифугировали до осаждения всех НЧ. Собранные НЧ редиспергировали в натрий-фосфатном буфере при энергичном перемешивании на шейкере.

Определение характеристик полученных магнитных наночастиц

Просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ)

Морфологию и размер частиц оценивали с использованием 200 киловаттного просвечивающего электронного микроскопа JEOL JEM-2100F (JEOL; Япония), ток 0,8 А.

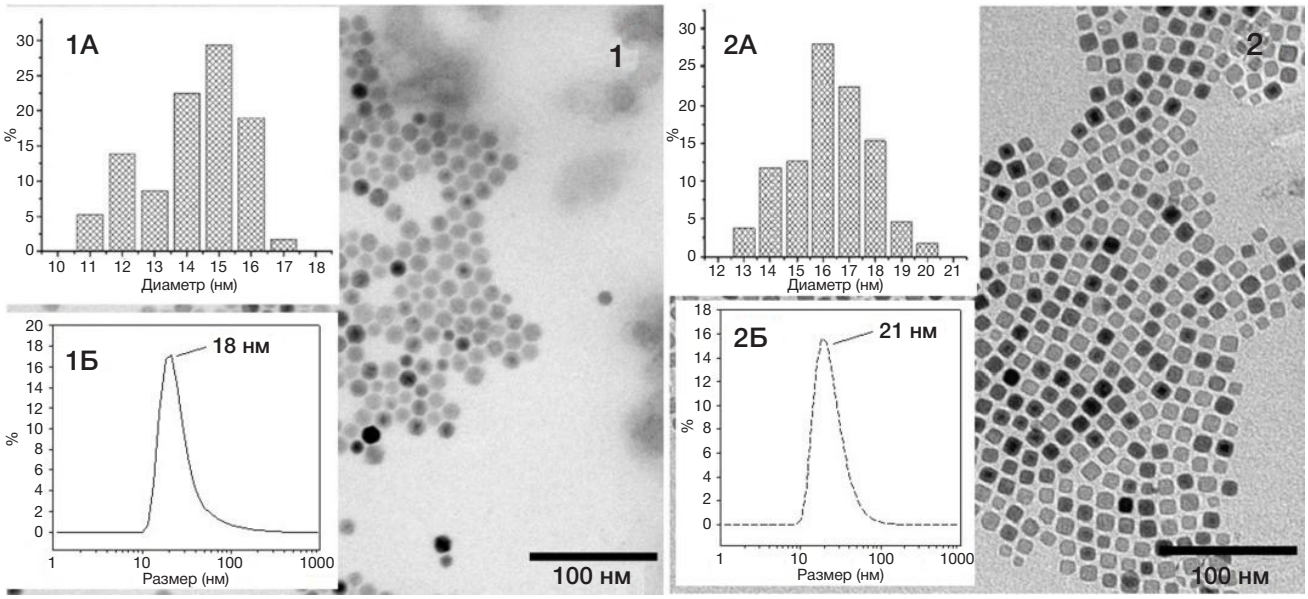


Рис. 1. Микрофотографии полученных образцов СНЧ (**1**) и КНЧ (**2**) оксида железа. Представлены также гистограммы распределения по размерам и их средний гидродинамический размер

Образцы готовили путем нанесения 1–2 мкл раствора на медную сетку (*d* = 3,05 мм), покрытую формваром, и высушивания на воздухе.

Фотонная корреляционная спектроскопия

Гидродинамический диаметр НЧ и их дзета-потенциал измеряли с помощью оборудования Zetasizer Nano ZS (Malvern; Германия). Объем измеренного раствора НЧ варьировался от 1 до 2 мл.

Вибромагнетометрия

Измерение магнитных свойств проводили с использованием системы измерения физических свойств Quantum Design (PPMS, Германия) с вибрирующим образцовым магнитометром. Условия измерения были следующими: от –30 до 30 кЭ. Диапазон измерения: амплитуда колебаний — 2 мм; частота — 40 Гц; чувствительность прибора — 10^{-6} э.м.е.

Рентгеноструктурный анализ (РСА)

Кристаллическую структуру МНЧ исследовали с помощью дифрактометра ДРОН-4 (ЛНПО «Буревестник»; Россия) от 20° до 120° из диапазона углов дифракции 2θ с шагом 0,1° и трехсекундным временем экспозиции (излучение CoKα при λ = 0,179 нм, напряжение — 40 кВ, ток — 30 мА).

Спектрофотометрия

1. *Измерение концентрации доксорубицина и его загрузки в средства доставки.* 600 мкл раствора доксорубицина добавляли в две лунки 96-луночного планшета (по 300 мкл на лунку). Поглощение раствора измеряли при λ = 495 нм на спектрофотометре Multiskan GO (Thermo Scientific; США). Концентрацию рассчитывали по построенной калибровочной кривой доксорубицина с точками 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0; 50 мкг/мл. Загрузку доксорубицина рассчитывали путем измерения остаточной концентрации препарата в супернатанте ($C_{ост}$(докс)) после центрифугирования, которую вычитывали из исходной концентрации $C_{общ}$(докс) в растворе. Далее массовую загрузку рассчитывали по формуле $\omega = 100\% \cdot C_{заг}(докс)/(C_{заг}(докс) + C(НЧ))$, где $C_{заг}$(докс) — концентрация загруженного доксорубицина в мг/л; C(НЧ) — концентрация НЧ, равная 308 мг/л.

2. *Измерение концентрации железа.* Из стандарта ICP по железу готовили серию растворов с концентрациями 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2 мг/мл. 100 мкл образца с неизвестной концентрацией железа растворяли в 400 мкл концентрированной соляной кислоты в течение 2 ч. Далее раствор разбавляли в 100 раз деионизированной водой и 400 мкл полученного раствора смешивали с 200 мкл деионизированной воды и 40 мкл феррозинового теста. Через 5 мин по 300 мкл полученного раствора помещали в две лунки 96-луночного планшета и измеряли поглощение при λ = 560 нм на спектрофотометре Thermo Scientific Multiskan GO в режиме фотометрии. По данным поглощения определяли концентрацию железа.

Культивирование клеток

Клетки линии 4T1 (ATCC® CRL-2539™, США) карциномы молочной железы мыши культивировали в среде RPMI-1640 (Gibco) с 2 мМ L-глутамина (Gibco) и 10%-й фетальной бычьей сывороткой (Gibco) при 37 °C и 5% CO_2.

Исследование цитотоксичности MTS-тестом

Клетки высаживали в лунки 96-луночного планшета (12–15 тыс./лунка) за 24 ч до внесения частиц. Загруженные и не загруженные лекарственным препаратом наночастицы, а также свободный доксорубицин разводили в натрий-фосфатном буфере и добавляли в культуральную среду с клетками в различных концентрациях. В качестве отрицательного контроля в лунки добавляли натрий-фосфатный буфер. В качестве положительного контроля в среду культивирования вносили диметилсульфоксид из расчета 20 мкл реагента на 100 мкл среды. После 48 ч инкубации в термостате с тестируемыми НЧ и контрольными веществами при 37 °C и 5% CO_2 количество жизнеспособных клеток в каждой из лунок определяли с использованием раствора MTS. Для этого культуральную среду из лунок заменяли на раствор MTS в свежей среде из расчета 20 мкл MTS на 100 мкл среды и инкубировали 4 ч в темноте при 37 °C и 5% CO_2. Затем планшеты устанавливали на 5 мин. на постоянный магнит, из каждой лунки отбирали полученный раствор и помещали

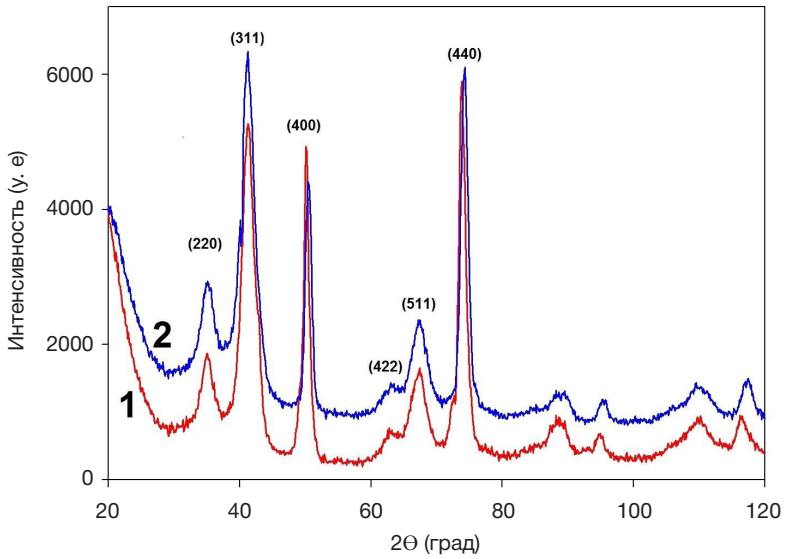


Рис. 2. Данные рентгеноструктурного анализа для образцов СНЧ (**1**) и КНЧ (**2**)

его в новый планшет для предотвращения попадания в исследуемую смесь НЧ. Данные оптической плотности итогового раствора снимали на спектрофотометре при λ = 490 нм. Построение гистограмм выживаемости клеток и вычисление величин стандартного отклонения проводили в программе Microsoft Office Excel 2007.

Исследование динамики накопления свободного и загруженного в наночастицы доксорубицина в клетках

Клетки сажали на стекла в чашках Петри в концентрации 120–150 тыс./чашка. Через 24 ч в культуральную среду с клетками вносили свободный доксорубицин либо доксорубицин, загруженный в СНЧ или КНЧ, в концентрации 50 мкг/мл (по доксорубицину). В качестве контроля использовали клетки, инкубировавшиеся в среде. Через 15 мин, 30 мин, 45 мин, 1 ч, 2 ч, 4 ч, 6 ч и 24 ч после со-культивирования с исследуемыми образцами клетки фиксировали 3,7% формалином в натрий-фосфатном буфере (pH 7,2–7,4; Gibco) в течение 15 мин. Полученные препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе EVOS с объективом LplanFL PH2 ×60 (Life technologies; США). Обработку полученных изображений и измерение интенсивности флуоресценции проводили в программе ImageJ 1.52a (Wayne Rasband (NIH); США). Для статистического анализа данных использовали однофакторный ANOVA-тест. Значения $p < 0,05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Полученные методом термического разложения НЧ оксида железа исследовали с помощью ПЭМ (рис. 1). Согласно гистограмме распределения размеров, средний размер НЧ магнетита, полученных по методике для СНЧ, оказался равным 15 нм (рис. 1–1А). Синтезированные НЧ ожидаемо получились сферической формы. По данным измерения гидродинамического размера, средний размер СНЧ в толуоле составил около 18 нм (рис. 1–1Б).

Образцы, синтезированные по протоколу получения кубических НЧ, также охарактеризовали с использованием ПЭМ (рис. 1–2). В этом случае средний размер НЧ магнетита оказался равным 16 нм (рис. 1–2А). Синтезированные НЧ, как и ожидалось, оказались кубической формы. Средний гидродинамический размер КНЧ составил около 21 нм (рис. 1–2Б).

По данным РСА, положение пиков и их интенсивность указывают на наличие у СНЧ структуры обратной шпинели, характерной для магнетита (рис. 2–1). Аналогичная структура и у КНЧ (рис. 2–2). Более полные данные указаны в таблице.

По данным измерения магнитных свойств полученных образцов, у СНЧ намагниченность насыщения Ms составила 50,5 э.м.е./г, а коэрцитивная сила H_c = 20,5 Э (рис. 3–1). Сопоставимые магнитные свойства и у КНЧ: намагниченность насыщения — 60,5 э.м.е./г; коэрцитивная сила — 20,0 Э (рис. 3–2).

Средний гидродинамический диаметр НЧ после фазового переноса из толуола в воду с использованием Pluronic F-127 вырос до 43 нм для СНЧ (рис. 4–1) и до 50 нм для КНЧ (рис. 4–2), а дзета-потенциал для них соответственно составил –10 мВ и –15,1 мВ. После процедуры загрузки доксорубицина средний размер СНЧ составил около 68 нм (рис. 4–3), а дзета-потенциал стал положительным — +21,1 мВ. Аналогичная ситуация наблюдалась и в случае КНЧ: гидродинамический диаметр в среднем стал равным 78 нм (рис. 4–4), а дзета-потенциал — +22,0 мВ. Расчет загрузки доксорубицина для СНЧ: концентрация препарата в супернатанте $C_{ост}$(докс) составила 40,7 мг/л, следовательно Сзаг(докс) = $C_{общ}$(докс) – $C_{ост}$(докс) = 96,0 – 40,7=55,3 мг/л. Тогда загрузка по массе ω(СНЧ) = 100% • $C_{заг}$(докс)/($C_{заг}$(докс) + С(НЧ)) = 100% • 55,3/(55,3 + 308) = 15,22%. Расчет загрузки доксорубицина для КНЧ: $C_{ост}$(докс) = 39,2 мг/л, тогда $C_{заг}$(докс) = $C_{общ}$(докс) – $C_{ост}$(докс) = 96,0 – 39,2 = 56,2 мг/л. В этом случае загрузка по массе ω(КНЧ) = 100% • $C_{заг}$(докс)/($C_{заг}$(докс) + С(НЧ)) = 100% • 56,2/(56,2 + 308) = 15,44% для КНЧ.

В ходе исследования выявили, что как СНЧ, так и КНЧ не оказывают токсического влияния на клетки линии 4Т1 во всем диапазоне тестируемых концентраций (рис. 5А). Инкубация клеток с аналогичными концентрациями СНЧ и КНЧ, загруженных доксорубицином, привела к снижению количества жизнеспособных клеток в популяции. IC_{50} (концентрация, при которой наблюдается 50% смертность клеток) для КНЧ с доксорубицином (КНЧ-Докс) составила 21 мг/л по оксиду железа и 5,5 мкМ по доксорубицину. Для СНЧ с доксорубицином (СНЧ-Докс) — 25 мг/л и 6,4 мкМ соответственно. IC_{50} чистого доксорубицина составила порядка 1 мкМ (рис. 5Б). Следовательно, загруженные

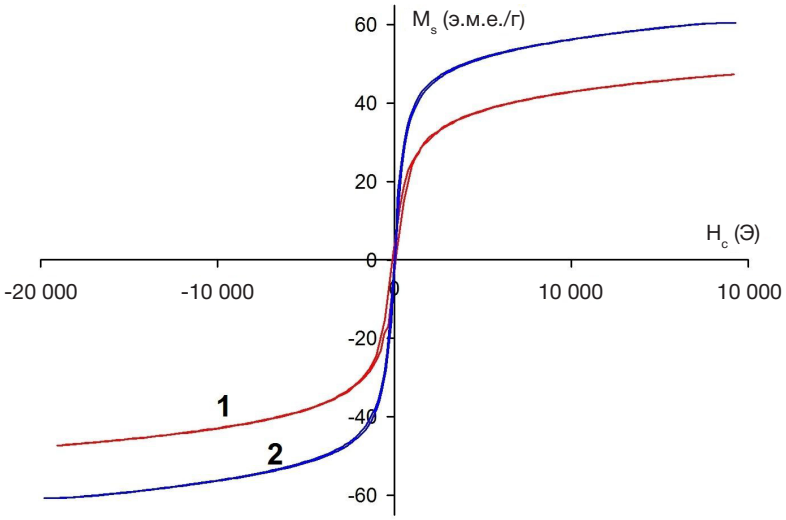


Рис. 3. Кривая намагничивания образцов СНЧ (**1**) и КНЧ (**2**)

доксорубицином КНЧ оказали несколько более выраженное противоопухолевое действие, чем СНЧ-Докс. Однако эта разница несущественна. Наибольшую гибель клеток вызвал свободный доксорубицин.

Исследование динамики накопления свободного доксорубицина в клетках, а также загруженного на КНЧ и СНЧ, выявило, что уже через 15 мин совместной инкубации в клетках обнаруживался небольшой сигнал флуоресценции доксорубицина. Через 30 мин со-культивирования интенсивность флуоресценции свободного противоопухолевого препарата в клетках становилась сопоставима с таковой от доксорубицина, доставленного в клетки посредством КНЧ. Однако свободный Докс накапливался преимущественно в ядрах клеток, в то время как доксорубицин, загруженный на КНЧ, визуализировался в везикулах, располагающихся в околоядерной области (рис. 6А, Г, Л). Интенсивность флуоресценции в клетках доксорубицина, доставленного с помощью СНЧ, была достоверно ниже, чем от КНЧ-Докс и Докс (рис. 6Ж). Данная тенденция сохранялась и после 45 мин совместной инкубации клеток линии 4Т1 со свободным и загруженным в НЧ противоопухолевым препаратом. Впоследствии интенсивность флуоресценции доксорубицина, доставленного в клетки на КНЧ или СНЧ, существенно не отличалась. Однако накопление свободного доксорубицина было значительно более выраженным, чем загруженного на НЧ. Стоит также отметить, что противоопухолевый препарат обнаруживался преимущественно в ядрах клеток только лишь после 2 ч совместной инкубации клеток с КНЧ-Докс и СНЧ-Докс. Таким образом, мы показали, что эффективность проникновения свободного доксорубицина в клетки выше, чем препарата, загруженного в НЧ. Также было установлено, что КНЧ активнее проникают в клетки по сравнению со СНЧ. Однако впоследствии эта разница становится менее выраженной.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Синтез МНЧ методом высокотемпературного разложения олеата железа (III) позволяет получать в препаративных количествах стабильные золи монодисперсных НЧ оксида железа контролируемых размера и формы: сферической [17, 18], кубической [19] и др. [22]. При этом исходный комплекс олеата железа (III) разлагается при высокой температуре в процессе синтеза, а сам комплекс частично восстанавливается компонентами среды до Fe (II) с образованием НЧ оксида железа переменного состава между магнетитом (Fe_3O_4) и маггемитом (γ-Fe_2O_3). Оба оксида железа обладают ферримагнитными свойствами. Конечный размер и форма НЧ определяются наличием в реакционной среде стабилизаторов, таких как олеиновая кислота и олеат натрия. Они способны выборочно адсорбироваться на гранях {111} растущих НЧ и определять их конечную геометрию. Также из-за адсорбции этих стабилизаторов поверхность синтезированных НЧ оказывается гидрофобной, что является принципиально важным для последующего создания средств доставки гидрофобных лекарств, подобных доксорубицину.

В ходе работы получены образцы кубической и сферической форм, стабилизированные Pluronic F-127 (рис. 1). Согласно результатам структурных (рис. 2) и магнитных исследований (рис. 3), данные образцы представляют собой оксид железа со структурой обратной шпинели. Из-за несовпадения размеров НЧ по данным ПЭМ с областью когерентного рассеяния (ОКР) можно сделать вывод, что образцы получились поликристалличными (табл. 1). Коэрцитивная сила у обоих образцов >0, следовательно, они являются ферримагнетиками.

Полученные образцы стабильны как в гидрофобной среде (рис. 1–1Б, рис. 1–2Б), так и после фазового переноса в воду с Pluronic F-127 (рис. 4–1, рис. 4–2). Специфика этого процесса заключается в том, что в структуре данного полимера присутствует гидрофобный сайт полипропиленгликоля, благодаря которому он адсорбируется на гидрофобной поверхности НЧ, и два гидрофильных терминальных участка полиэтиленгликоля, которые оказываются расположенными «снаружи» после адсорбции. В итоге у НЧ после переноса в воду имеются гидрофобные сайты, куда можно загружать гидрофобные лекарственные препараты, и гидрофильная оболочка, существенно повышающая растворимость этих НЧ в водных средах. Увеличение гидродинамического размера НЧ в водном растворе также связано с этим процессом адсорбции стабилизатора.

Механизм загрузки доксорубицина в полимерную оболочку НЧ состоит в том, что сам по себе препарат плохо растворяется в воде, поэтому обычно в клинической практике используют его гидрохлорид. Загрузку препарата проводят в среде натрий-фосфатного буфера, где происходит

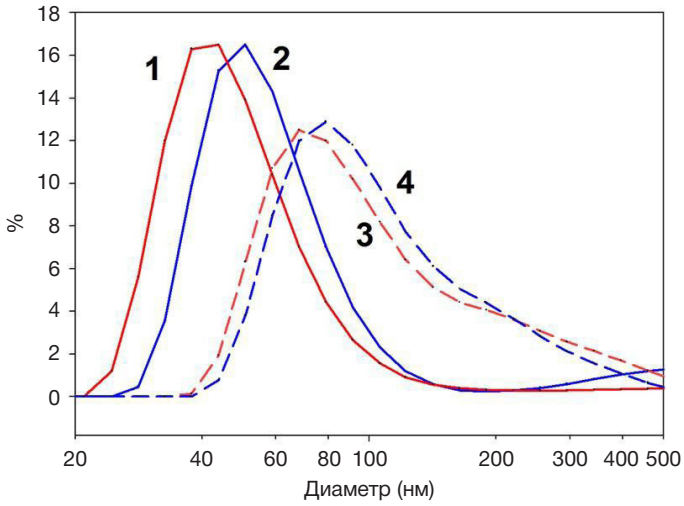


Рис. 4. Гидродинамический диаметр НЧ после фазового переноса в воду: СНЧ до (**1**) и после (**3**) загрузки доксорубицина; КНЧ до (**2**) и после (**4**) загрузки доксорубицина

депротонирование его молекулы, что приводит к образованию кристаллов его основания, малорастворимого в воде. Если же в такой среде присутствуют НЧ с гидрофобными сайтами, то депротонированный доксорубицин может там адсорбироваться. По этой причине и наблюдается некоторое возрастание гидродинамического диаметра НЧ после загрузки, а также перезарядка их поверхности (рис. 4-3, рис. 4–4). В дальнейшем загруженный доксорубицин может протонироваться в более кислой среде лизосом клеток (pH 4,5–5) и высвобождаться из полимерной оболочки НЧ [16].

Вопрос влияния формы МНЧ на биологические системы актуален в связи с тем, что в последнее время появился ряд публикаций, в которых продемонстрированы преимущества несферических НЧ для гипертермии и МРТ-диагностики. Так, в ряде исследований показано [23, 24], что МНЧ кубической формы, а также «октоподы» [25] обладают большими значениями SAR по сравнению со сферическими МНЧ и поэтому могут найти применение в терапии посредством магнитной гипертермии. Кроме того, МНЧ кубической формы демонстрируют большие значения T_2-релаксивности по сравнению с аналогичными НЧ сферической формы [26]. В связи с этим мы провели сравнительный анализ влияния КНЧ и СНЧ на клетки, а также эффективности доставки противоопухолевого препарата, загруженного на данные частицы, в клетки карциномы молочной железы мыши.

Выявлено, что в концентрациях вплоть до 227 мг/л синтезированные НЧ обеих форм не оказывают токсического влияния на клетки. Загруженные доксорубицином КНЧ вызывают несколько более выраженную гибель опухолевых клеток по сравнению с СНЧ. Это может быть связано с тем, что КНЧ быстрее проникают в клетки, чем СНЧ. Однако данная разница несущественна. Свободный противоопухолевый препарат обладает значительно более выраженным цитотоксическим эффектом и активнее накапливается в ядрах клеток. Причиной этого может быть то, что свободный доксорубицин проникает в клетки посредством диффузии, тогда как загруженный на НЧ лекарственный препарат попадает в клетки из-за эндоцитоза, что требует больше времени. Еще следует отметить, что НЧ, несущие доксорубицин, сначала обнаруживаются в составе внутриклеточных везикул, предположительно лизосом, в которых впоследствии происходит протонирование лекарственного препарата. Только после этого он может высвобождаться из НЧ и транспортироваться в ядра клеток [27]. Таким образом, доксорубицин, загруженный в НЧ, обладает меньшей противоопухолевой активностью, однако в дальнейшем,

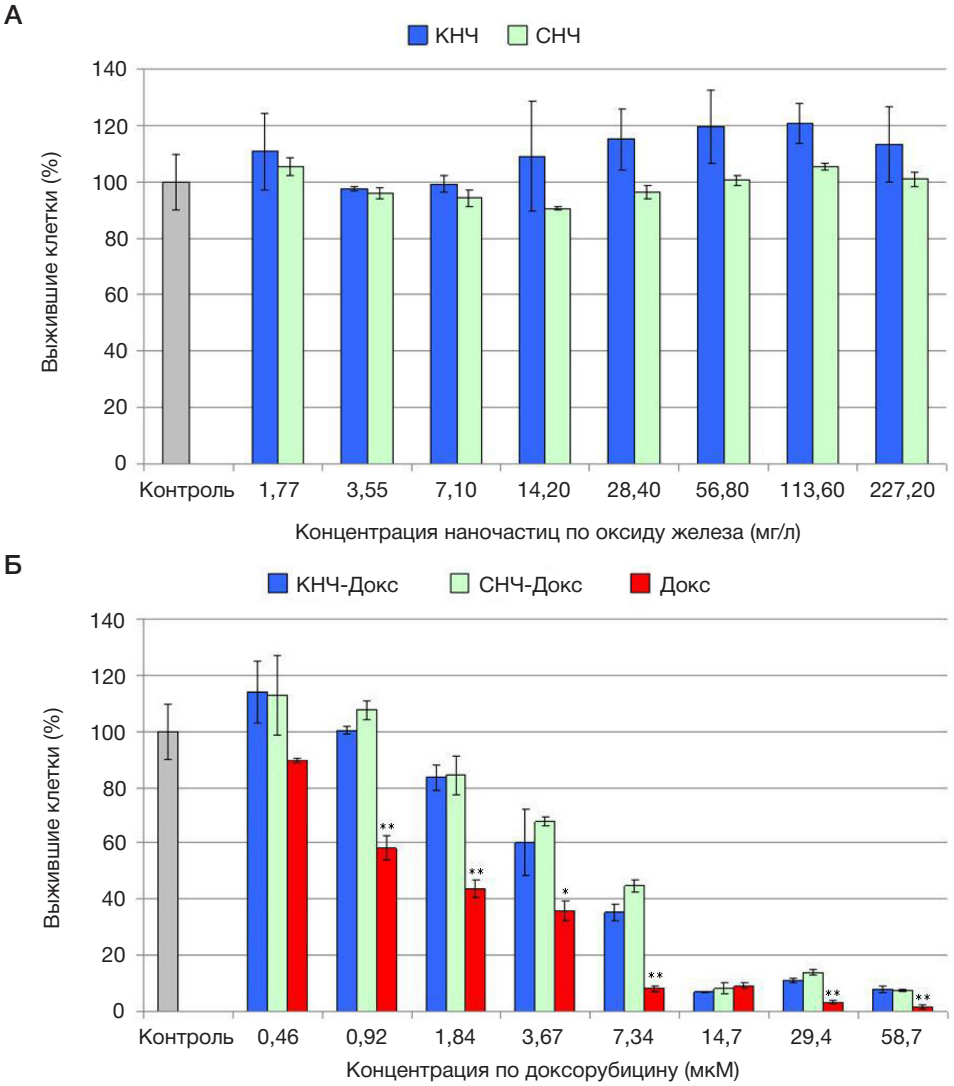


Рис. 5. Оценка цитотоксичности НЧ на клетках линии 4T1. Гистограмма выживаемости клеток после 48 ч культивирования с КНЧ и СНЧ (**А**); после 48 ч сокультивирования с КНЧ-Докс, СНЧ-Докс и свободным доксорубицином (Докс) (**Б**). MTS-тест. Результаты представлены как средние значения ±SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. Количество живых клеток, инкубировавшихся с натрий-фосфатным буфером, был принят за 100%

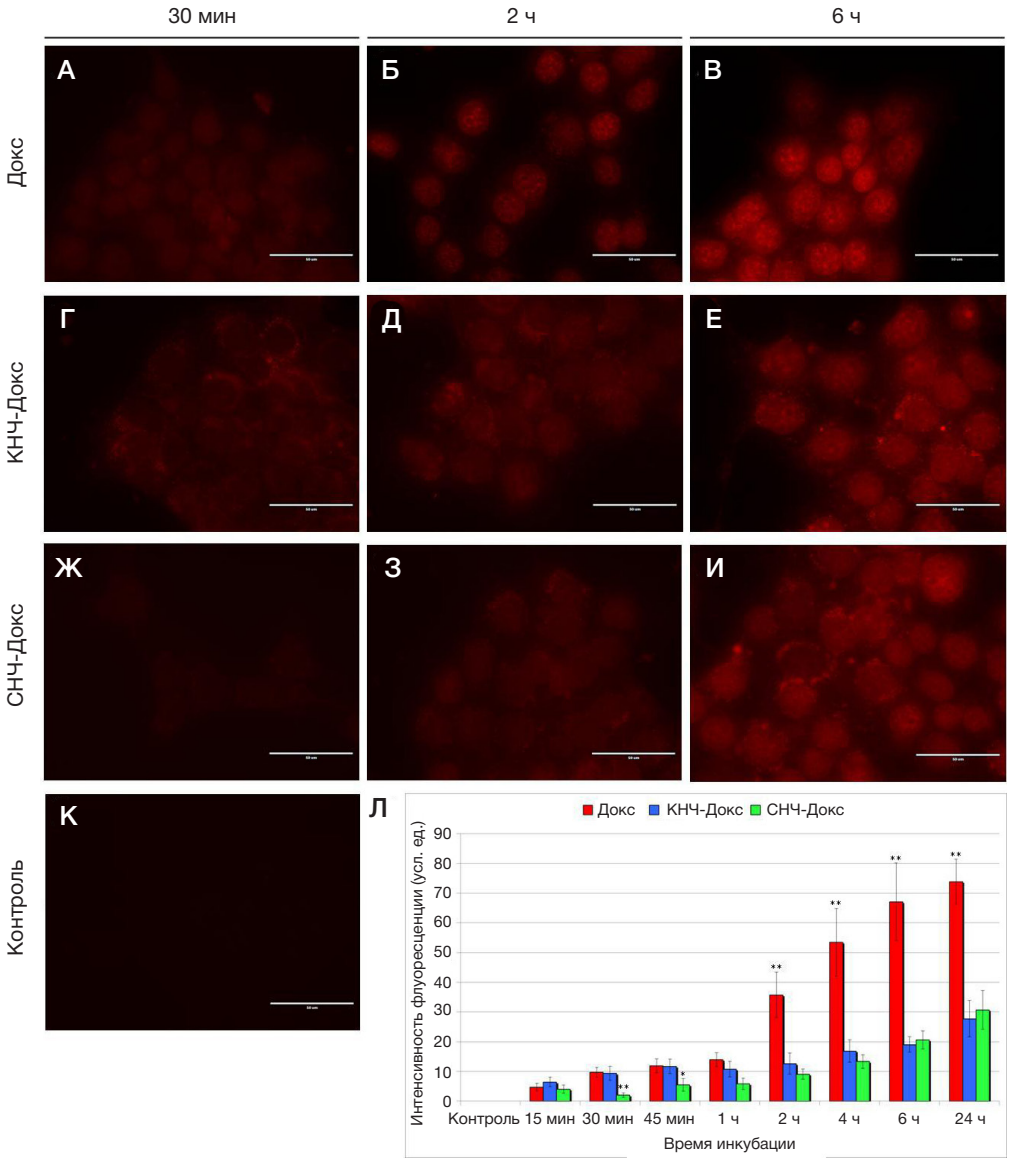


Рис. 6. Динамика накопления свободного и загруженного на НЧ доксорубицина в клетках линии 4T1. Флуоресцентная микроскопия (**А–К**); гистограмма зависимости интенсивности флуоресценции доксорубицина в клетках от продолжительности инкубации клеток с Докс, КНЧ-Докс и СНЧ-Докс (**Л**). Результаты представлены как средние значения ±SD. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$

после дополнительных модификаций (связывания специфических лигандов с поверхностью НЧ), такую систему можно использовать для адресной доставки противоопухолевого препарата [28].

ВЫВОДЫ

В результате проведенной работы выявлено, что эффективность доставки свободного доксорубицина в опухолевые клетки линии 4T1 выше, чем загруженного в СНЧ или КНЧ. В свободном виде препарат быстро проникает в клетку в результате диффузии и аккумулируется в клеточном ядре. В случае же загрузки в НЧ оксида железа он попадает в клетку путем эндоцитоза и аккумулируется в везикулах, откуда уже постепенно высвобождается во внутриклеточную среду. Неполное высвобождение ведет к тому, что IC_{50} загруженного доксорубицина существенно меньше, чем у свободного препарата. Несмотря на то что КНЧ показали несколько более эффективную доставку противоопухолевого препарата в клетки по сравнению с СНЧ, достоверного различия между ними не выявлено.

Таблица. Результаты рентгеноструктурных исследований образцов СНЧ и КНЧ

	Фаза	DПЭМ, нм	ОКР, нм	Период решетки, нм
СНЧ	Fe_3O_4 (100%)	11–17	6 ± 1	0,8373 ± 0,0004
КНЧ	Fe_3O_4 (100%)	13–20	6 ± 1	0,8378 ± 0,0004

Литература

1. Ling D, Hyeon T. Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. Small. 2013; 9 (9–10): 1450–66. DOI:10.1002/smll.201202111.
2. Majewski P, Thierry B. Functionalized Magnetite Nanoparticles — Synthesis, Properties, and Bio-Applications. Crit Rev Solid State Mater Sci. 2007; 32 (3–4): 203–15.DOI:10.1080/10408430701776680.
3. Xie J, Huang J, Li X, Sun S, Chen X. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. Curr Med Chem. 2009; 16 (10): 1278–94. DOI:10.2174/092986709787846604.
4. Oh JK, Park JM. Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application. Prog Polym Sci. 2011; 36 (1): 168–89. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2010.08.005.
5. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological applications. Chem Rev. 2008; 108 (6): 2064–110. DOI:10.1021/cr068445e.
6. Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL et al. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. Biomaterials. 2009; 30 (28): 5114–24. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.06.004.
7. Andhariya N, Chudasama B, Mehta RV, Upadhyay RV. Biodegradable thermoresponsive polymeric magnetic nanoparticles: A new drug delivery platform for doxorubicin. J Nanoparticle Res. 2011; 13 (4): 1677–88. DOI:10.1007/s11051-010-9921-6.
8. Tavano L, Vivacqua M, Carito V, Muzzalupo R, Caroleo MC, Nicoletta F. Doxorubicin loaded magneto-niosomes for targeted drug delivery. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2013; (102): 803–7. DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.09.019.
9. Jain TK, Foy SP, Erokwu B, Dimitrijevic S, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice. Biomaterials. 2009; 30 (35): 6748–56. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.08.042.
10. Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. J Appl Toxicol. 2009; 29 (1): 69–78. DOI:10.1002/jat.1385.
11. Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, Menon D, Nair S, Manzoor K et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. J Mater Sci Mater Med. 2009; 20 (1): 235–41. DOI:10.1007/s10856-008-3548-5.
12. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. Biomaterials. 2010; 31 (3):438–48. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.09.060.
13. Xiong Y, Brunson M, Huh J, Huang A, Coster A, Wendt K et al. The role of surface chemistry on the toxicity of Ag nanoparticles. Small. 2013; 9 (15): 2628–38. DOI:10.1002/smll.201202476.
14. Tarantola M, Pietuch A, Schneider D, Rother J, Sunnick E, Rosman C et al. Toxicity of gold-nanoparticles: Synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. Nanotoxicology. 2011; 5 (2): 254–68. DOI:10.3109/17435390.2010.528847.
15. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. J Pharm Pharmacol. 2013; 65 (2): 157–70. DOI:10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
16. Gautier J, Munnier E, Paillard A, Hervé K, Douziech-Eyrolles L, Soucé M et al. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. Int J Pharm. 2012; 423 (1): 16–25. DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.06.010.
17. Yu WW, Falkner JC, Yavuz CT, Colvin VL. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. Chem Commun. 2004; (20): 2306–7. DOI:10.1039/b409601k.
18. Park J, An K, Hwang Y, Park JG, Noh HJ, Kim JY et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. Nat Mater. 2004; 3 (12): 891–5. DOI:10.1038/nmat1251.
19. Hai HT, Yang HT, Kura H, Hasegawa D, Ogata Y, Takahashi M et al. Size control and characterization of wustite (core)/spinel (shell) nanocubes obtained by decomposition of iron oleate complex. J Colloid Interface Sci. 2010; 346 (1): 37–42. DOI:10.1016/j.jcis.2010.02.025.
20. Simon T, Boca S, Biro D, Baldeck P, Astilean S. Gold-Pluronic core-shell nanoparticles: Synthesis, characterization and biological evaluation. J Nanoparticle Res. 2013; 15 (4): 1578. DOI:10.1007/s11051-013-1578-5.
21. Gonzales M, Krishnan KM. Phase transfer of highly monodisperse iron oxide nanocrystals with Pluronic F127 for biomedical applications. J Magn Magn Mater. 2007; 311 (1): 59–62. DOI:10.1016/j.jmmm.2006.10.1150.
22. Zhou Z, Zhu X, Wu D, Chen Q, Huang D, Sun C et al. Anisotropic shaped iron oxide nanostructures: Controlled synthesis and proton relaxation shortening effects. Chem Mater. 2015; 27 (9): 3505–15. DOI:10.1021/acs.chemmater.5b00944.
23. Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, Marangon I, Guardia P, Silva AKA et al. Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle "Destructurators" of the Tumoral Microenvironment. ACS Nano. 2014; 8 (5): 4268–83. DOI:10.1021/nn405356r.
24. Guardia P, Di Corato R, Lartigue L, Wilhelm C, Espinosa A, Garcia-Hernandez M et al. Water Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. ACS nano. 2012; 6 (4): 3080–91. DOI:10.1021/nn2048137.
25. Nemati Z, Alonso J, Martinez LM, Khurshid H, Garaio E, Garcia JA et al. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects. J Phys Chem C. 2016; 120 (15): 8370–9. DOI:10.1021/acs.jpcc.6b01426.
26. Lee N, Kim H, Choi SH, Park M, Kim D, Kim H-C et al. Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. Proc Natl Acad Sci. 2011; 108 (7): 2662–7. DOI:10.1073/pnas.1016409108.
27. Nizamov TR, Garanina AS, Grebennikov IS, Zhironkina OA, Strelkova OS, Alieva IB et al. Effect of Iron Oxide Nanoparticle Shape on Doxorubicin Drug Delivery Toward LNCaP and PC-3 Cell Lines. BioNanoScience. 2018; 8 (1): 394–406. DOI:10.1007/s12668-018-0502-y.
28. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR et al. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. J Control Release. 2011; 152 (1): 76–83. DOI:10.1016/j.jconrel.2011.01.024.

References

1. Ling D, Hyeon T. Chemical design of biocompatible iron oxide nanoparticles for medical applications. Small. 2013; 9 (9–10): 1450–66. DOI:10.1002/smll.201202111.
2. Majewski P, Thierry B. Functionalized Magnetite Nanoparticles — Synthesis, Properties, and Bio-Applications. Crit Rev Solid State Mater Sci. 2007; 32 (3–4): 203–15.DOI:10.1080/10408430701776680.
3. Xie J, Huang J, Li X, Sun S, Chen X. Iron oxide nanoparticle platform for biomedical applications. Curr Med Chem. 2009; 16 (10): 1278–94. DOI:10.2174/092986709787846604.
4. Oh JK, Park JM. Iron oxide-based superparamagnetic polymeric nanomaterials: Design, preparation, and biomedical application. Prog Polym Sci. 2011; 36 (1): 168–89. DOI:10.1016/j.progpolymsci.2010.08.005.
5. Laurent S, Forge D, Port M, Roch A, Robic C, Vander Elst L et al. Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis, stabilization, vectorization, physicochemical characterizations and biological

applications. Chem Rev. 2008; 108 (6): 2064–110. DOI:10.1021/cr068445e.
6. Lin JJ, Chen JS, Huang SJ, Ko JH, Wang YM, Chen TL et al. Folic acid-Pluronic F127 magnetic nanoparticle clusters for combined targeting, diagnosis, and therapy applications. Biomaterials. 2009; 30 (28): 5114–24. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.06.004.
7. Andhariya N, Chudasama B, Mehta RV, Upadhyay RV. Biodegradable thermoresponsive polymeric magnetic nanoparticles: A new drug delivery platform for doxorubicin. J Nanoparticle Res. 2011; 13 (4): 1677–88. DOI:10.1007/s11051-010-9921-6.
8. Tavano L, Vivacqua M, Carito V, Muzzalupo R, Caroleo MC, Nicoletta F. Doxorubicin loaded magneto-niosomes for targeted drug delivery. Colloids Surfaces B Biointerfaces. 2013; (102): 803–7. DOI:10.1016/j.colsurfb.2012.09.019.
9. Jain TK, Foy SP, Erokwu B, Dimitrijevic S, Flask CA, Labhasetwar V. Magnetic resonance imaging of multifunctional pluronic stabilized iron-oxide nanoparticles in tumor-bearing mice. Biomaterials. 2009; 30 (35): 6748–56. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.08.042.
10. Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z. Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: The role of particle size, shape and composition. J Appl Toxicol. 2009; 29 (1): 69–78. DOI:10.1002/jat.1385.
11. Nair S, Sasidharan A, Divya Rani VV, Menon D, Nair S, Manzoor K et al. Role of size scale of ZnO nanoparticles and microparticles on toxicity toward bacteria and osteoblast cancer cells. J Mater Sci Mater Med. 2009; 20 (1): 235–41. DOI:10.1007/s10856-008-3548-5.
12. Huang X, Teng X, Chen D, Tang F, He J. The effect of the shape of mesoporous silica nanoparticles on cellular uptake and cell function. Biomaterials. 2010; 31 (3):438–48. DOI:10.1016/j.biomaterials.2009.09.060.
13. Xiong Y, Brunson M, Huh J, Huang A, Coster A, Wendt K et al. The role of surface chemistry on the toxicity of Ag nanoparticles. Small. 2013; 9 (15): 2628–38. DOI:10.1002/smll.201202476.
14. Tarantola M, Pietuch A, Schneider D, Rother J, Sunnick E, Rosman C et al. Toxicity of gold-nanoparticles: Synergistic effects of shape and surface functionalization on micromotility of epithelial cells. Nanotoxicology. 2011; 5 (2): 254–68. DOI:10.3109/17435390.2010.528847.
15. Tacar O, Sriamornsak P, Dass CR. Doxorubicin: An update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems. J Pharm Pharmacol. 2013; 65 (2): 157–70. DOI:10.1111/j.2042-7158.2012.01567.x.
16. Gautier J, Munnier E, Paillard A, Hervé K, Douziech-Eyrolles L, Soucé M et al. A pharmaceutical study of doxorubicin-loaded PEGylated nanoparticles for magnetic drug targeting. Int J Pharm. 2012; 423 (1): 16–25. DOI:10.1016/j.ijpharm.2011.06.010.
17. Yu WW, Falkner JC, Yavuz CT, Colvin VL. Synthesis of monodisperse iron oxide nanocrystals by thermal decomposition of iron carboxylate salts. Chem Commun. 2004; (20): 2306–7. DOI:10.1039/b409601k.
18. Park J, An K, Hwang Y, Park JG, Noh HJ, Kim JY et al. Ultra-large-scale syntheses of monodisperse nanocrystals. Nat Mater. 2004; 3 (12): 891–5. DOI:10.1038/nmat1251.
19. Hai HT, Yang HT, Kura H, Hasegawa D, Ogata Y, Takahashi M et al. Size control and characterization of wustite (core)/spinel (shell) nanocubes obtained by decomposition of iron oleate complex. J Colloid Interface Sci. 2010; 346 (1): 37–42. DOI:10.1016/j.jcis.2010.02.025.
20. Simon T, Boca S, Biro D, Baldeck P, Astilean S. Gold-Pluronic core-shell nanoparticles: Synthesis, characterization and biological evaluation. J Nanoparticle Res. 2013; 15 (4): 1578. DOI:10.1007/s11051-013-1578-5.
21. Gonzales M, Krishnan KM. Phase transfer of highly monodisperse iron oxide nanocrystals with Pluronic F127 for biomedical applications. J Magn Magn Mater. 2007; 311 (1): 59–62. DOI:10.1016/j.jmmm.2006.10.1150.
22. Zhou Z, Zhu X, Wu D, Chen Q, Huang D, Sun C et al. Anisotropic shaped iron oxide nanostructures: Controlled synthesis and proton relaxation shortening effects. Chem Mater. 2015; 27 (9): 3505–15. DOI:10.1021/acs.chemmater.5b00944.
23. Kolosnjaj-Tabi J, Di Corato R, Lartigue L, Marangon I, Guardia P, Silva AKA et al. Heat-Generating Iron Oxide Nanocubes: Subtle "Destructurators" of the Tumoral Microenvironment. ACS Nano. 2014; 8 (5): 4268–83. DOI:10.1021/nn405356r.
24. Guardia P, Di Corato R, Lartigue L, Wilhelm C, Espinosa A, Garcia-Hernandez M et al. Water Soluble Iron Oxide Nanocubes with High Values of Specific Absorption Rate for Cancer Cell Hyperthermia Treatment. ACS nano. 2012; 6 (4): 3080–91. DOI:10.1021/nn2048137.
25. Nemati Z, Alonso J, Martinez LM, Khurshid H, Garaio E, Garcia JA et al. Enhanced Magnetic Hyperthermia in Iron Oxide Nano-Octopods: Size and Anisotropy Effects. J Phys Chem C. 2016; 120 (15): 8370–9. DOI:10.1021/acs.jpcc.6b01426.
26. Lee N, Kim H, Choi SH, Park M, Kim D, Kim H-C et al. Magnetosome-like ferrimagnetic iron oxide nanocubes for highly sensitive MRI of single cells and transplanted pancreatic islets. Proc Natl Acad Sci. 2011; 108 (7): 2662–7. DOI:10.1073/pnas.1016409108.
27. Nizamov TR, Garanina AS, Grebennikov IS, Zhironkina OA, Strelkova OS, Alieva IB et al. Effect of Iron Oxide Nanoparticle Shape on Doxorubicin Drug Delivery Toward LNCaP and PC-3 Cell Lines. BioNanoScience. 2018; 8 (1): 394–406. DOI:10.1007/s12668-018-0502-y.
28. Kievit FM, Wang FY, Fang C, Mok H, Wang K, Silber JR et al. Doxorubicin loaded iron oxide nanoparticles overcome multidrug resistance in cancer in vitro. J Control Release. 2011; 152 (1): 76–83. DOI:10.1016/j.jconrel.2011.01.024.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЕРЕДОВЫХ ТЕХНОЛОГИЙ ДЛЯ НАНОМЕДИЦИНЫ: ПОЛУЧЕНИЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫХ «ВОЛШЕБНЫХ ПУЛЬ»

К. Мартина, Л. Серпе, Р. Кавалли, Д. Кравотто ✉

Кафедра фармацевтических технологий,
Центр наноструктурированных интерфейсов и поверхностей, Туринский университет, Турин, Италия

Недавние достижения в области нанотехнологии, в том числе современные методы, позволяющие усовершенствовать способы приготовления лекарственных средств, открыли новые горизонты в наномедицине, связанные с разработкой наноразмерных средств доставки лекарственных препаратов и целых комплексов. Последнее десятилетие большое внимание уделяется использованию нанопереносчиков — усилия исследователей направлены не столько на разработку новых препаратов, сколько на поиск способов целевой доставки терапевтических и/или диагностических агентов. В работе рассмотрены трансдисциплинарный подход к получению наноматериалов, нанокомплексов, нановезикул и перспективы их применения в биологии и тераностике. Особое внимание уделено получению нанопузырьков, стимулчувствительных наночастиц (НЧ) и наносистем с привитым циклодекстрином при нестандартных условиях, таких как действие ультразвука (УЗ) и микроволнового излучения. Помимо использования в процессе приготовления НЧ, УЗ можно так же эффективно применять для активации чувствительных нановезикул и НЧ.

Ключевые слова: наночастицы, нанопузырьки, стимулчувствительный, ультразвук, микроволновое излучение

Финансирование: авторы признательны администрации Туринского университета за их финансовую поддержку (Ricerca Locale 2017).

✉ **Для корреспонденции:** Джанкарло Кравотто
ул. P. Giuria, д. 9, Турин, Италия, 10125; giancarlo.cravotto@unito.it

Статья получена: 26.06.2018 **Статья принята к печати:** 30.08.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.082

ENABLING TECHNOLOGIES FOR THE PREPARATION OF MULTIFUNCTIONAL “BULLETS” FOR NANOMEDICINE

Martina K, Serpe L, Cavalli R, Cravotto G ✉

Department of Drug Science & Technology,
Centre for Nanostructured Interfaces and Surfaces (NIS), University of Turin, Turin, Italy

Recent advances in nanotechnology, including modern enabling techniques that can improve synthetic preparation and drug formulations, have opened up new frontiers in nanomedicine with the development of nanoscale carriers and assemblies. The use of delivery platforms has attracted attention over the past decade as researchers shift their focus away from the development of new drug candidates, and toward new means with which to deliver therapeutic and/or diagnostic agents. This work will explore a transdisciplinary approach for the production of a number of nanomaterials, nanocomplexes and nanobubbles and their application in a variety of potential biological and theranostic protocols. Particular attention will be paid to nanobubbles, stimuli responsive nanoparticles and cyclodextrin grafted nanosystems produced under non-conventional conditions, such as microwave and ultrasound irradiation. Besides nanoparticles preparation, ultrasound can also act as an enabling technology when activating sensitive nanobubbles and nanoparticles.

Keywords: nanoparticles, nanobubbles, stimuli responsive, ultrasound, microwave

Funding: the University of Turin is warmly acknowledged for their financial support (Ricerca Locale 2017).

✉ **Correspondence should be addressed:** Giancarlo Cravotto
Via P. Giuria 9, Turin, Italy, 10125; giancarlo.cravotto@unito.it

Received: 26.06.2018 **Accepted:** 30.08.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.082

Наноматериалы могут быть получены практически из любого вещества; наряду с липофильными коллоидными наночастицами (НЧ), получаемыми из твердых липидов и фосфолипидов, возможно использование наноматериалов на основе углерода, натуральных и синтетических полимеров, кварца, металлов и оксидов металлов. В области бионанотехнологий наноматериалы используются для биомедицинского применения, в том числе целевой доставки лекарственных препаратов, контрастирующих веществ и биосенсоров. Многие свойства наноматериалов, которые делают их полезными, могут в то же время делать их токсичными для живых клеток. Благодаря большой площади поверхности наноматериалы более реактивны и легкотранспортируемы через экологические барьеры, клеточные мембраны и в организме в целом. Для максимального использования потенциала нанотехнологий необходим рациональный научный подход в вопросах нанотоксикологии и безопасности.

Среди способов приготовления НЧ существует множество различных подходов с использованием как общепринятых, так и нетрадиционных методик в твердых и жидких фазах [1]. Первостепенной задачей является получение НЧ, гомогенных по размеру и форме — для ее решения применяли ряд методов; в твердофазных протоколах без растворителей применялась механохимия, в то время как для синтеза в водных растворах использовали микроволновое излучение и ультразвук (УЗ). Микроволновое излучение как эффективный

источник тепла позволяет получить большое количество высококачественных НЧ за короткие промежутки времени. Применение сонохимического облучения позволяет добиваться высокооднородного смешивания и уменьшения роста кристаллов, что также способствует улучшению динамики и увеличению скорости реакции. Данные подходы можно считать одним из наиболее эффективных средств для синтеза наноматериалов [2, 3].

Наработки в области сонохимического синтеза и синтеза с использованием микроволнового излучения можно эффективно применять для дериватизации наноматериалов на основе углерода, а также производства наноструктурированных олигомеров циклодекстрина (ЦД) и наноматериалов с привитым ЦД для применения в биомедицине. Показано, что производные ЦД способны удерживать молекулы лекарственных препаратов и контрастирующих веществ, и таким образом действовать как универсальные и эффективные переносчики и контрастирующие агенты для МРТ. Прививание ЦД на НЧ увеличивает их водорастворимость, поверхностную доступность и «акцептирующую» способность. Нанопузырьки, сферические структуры (ядро/оболочка), служат инновационными наноплатформами, на базе которых можно разрабатывать многофункциональные наноносители для целенаправленной визуализации и терапевтического применения. В области онкологии большое внимание привлекают стимулчувствительные наносистемы, повышающие эффективность действия противоопухолевых препаратов.

Использование стратегий нанодоставки может иметь ключевое значение для успешной терапии, поскольку делает возможным высвобождение лекарства «по требованию», а также персонализированный подход к лечению. В идеале речь может идти о концепции «нужное лекарство нужному человеку в нужный момент». Эта статья о текущем состоянии и перспективах использования «умных» наносистем доставки лекарственных средств, управляемых с помощью специфических внутренних (например, изменения редокс-потенциала) или внешних (например, свет, УЗ, магнитное поле) факторов.

Наноматериалы на основе циклодекстрина или привитые циклодекстрином

Использование нанотехнологий для доставки лекарственных средств открывает новые возможности целенаправленной доставки терапевтических препаратов к внутриклеточным целям и мониторингу целевых мест их доставки (тераностика), что может изменить облик фармацевтической и биотехнологической промышленности. Ключевая роль в достижении этих целей может принадлежать ЦД, отличающимся хорошей биологической совместимостью, способностью улучшать физико-химические свойства лекарственных средств (стабильность, растворимость, биодоступность) [4]. Наряду с другими синтетическими методами нетрадиционные технологии с использованием УЗ и микроволн нашли широкое применение в приготовлении новых и уже известных структур на основе ЦД, продемонстрировав хорошую эффективность и короткое время реакции.

При помощи УЗ был получен водорастворимый олиго-ЦД гетерононамер с целью использования его в качестве дендримерного мультиносителя с высокой принимающей способностью. Применимость его как контрастирующего агента для МРТ была продемонстрирована на релаксометрическом титровании Gd-комплексов, помещенных в дендримерные платформы, а также в успешных экспериментах по изучению жизнеспособности клеток и связывающей способности [5].

ЦД может быть эффективно привит на кварц при обычных и нетрадиционных условиях [6, 7] (рис. 1) — способность этой гибридной системы абсорбировать органические молекулы в значительной степени изучена и опробована. Так, был исследован интересный пример двухпоровых НЧ кварца для эффективной комбинированной терапии рака с одновременным транспортом гена и противоопухолевого препарата. Положительно заряженная большая пора была загружена отрицательно заряженной малой интерферирующей РНК, а в меньшую пору был помещен доксорубицин, покрытый 1-Адамантантиолом и комплексом ЦД [8].

При помощи микроволнового излучения была успешно произведена дериватизация углеродных нанотрубок (SWCNT) с ЦД и контрастирующими веществами [9]. Эффективность микроволнового воздействия продемонстрирована также для получения оксида графена, привитого порфином [10].

Изучается способность ЦД присоединять или высвобождать лекарственные препараты применительно к магнитным НЧ. НЧ оксида железа и золота модифицировали присоединением к полиглицидилметакрилату, соединенному с ЦД и функционализированному этилендиамином с целью получения многофункциональной тераностической наноплатформы [11]. Магнитные НЧ под воздействием УЗ эффективно покрывались β-ЦД, что приводило к увеличению намагничивания, вероятно, в силу высокой степени кристаллизации полученной системы [12].

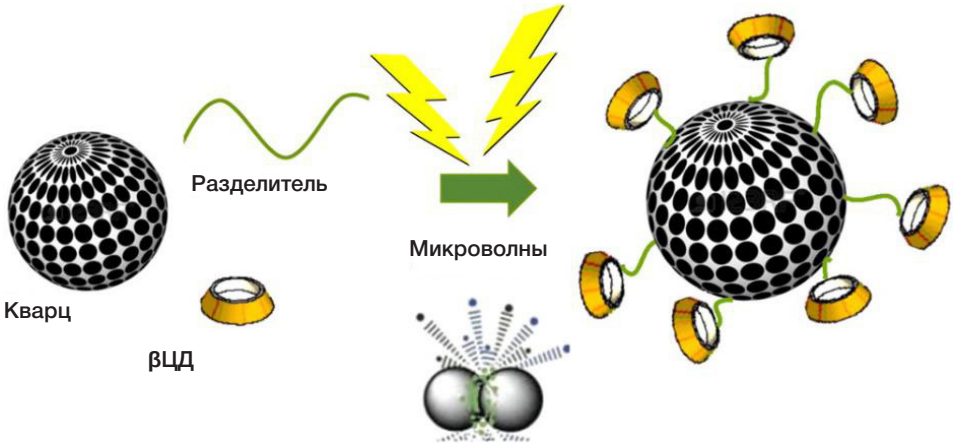


Рис. 1. Схема получения НЧ кварца, привитого циклодекстрином, в нестандартных условиях. (По данным: Martina K., Baricco F. и др. [6].)

Нанопузырьки: универсальный инструмент для биомедицинского применения

Нанопузырьки (нановезикулы) — еще одна ценная платформа для применения в визуализационных и терапевтических приложениях, разновидность «нанопуль», чувствительных к воздействию внешних физических факторов.

Нанопузырьки происходят из микропузырьков, которые в настоящее время используются в клинической практике в качестве контрастирующих агентов. Эта особенность определяет некоторые преимущества, такие как их выход из кровеносных сосудов в окружающие ткани, что повышает эффективность визуализации и целевой доставки. В частности, такая способность позволяет им в течение длительного времени накапливаться в тканях опухоли благодаря эффекту увеличенной проницаемости и задержания (*enhanced permeability and retention*, EPR). Кроме того, воздействием УЗ можно усилить акустические и таргетинговые свойства таких НЧ. Нанопузырьки можно использовать в качестве ядер терапевтической кавитации для УЗ-сонопорации, приводя к формированию временных пор в плазменных мембранах, а также изменению клеточной проницаемости [13].

Нанопузырьки могут быть описаны как сферические структуры, имеющие ядро и оболочку, заполненные газом или испаряющимся компонентом, таким как перфторуглероды, гексафторид серы, воздух или углекислый газ [14]. Ядро — внутреннее пространство, занимающее большую часть объема частицы. Компоненты ядра имеют принципиальное значение, так как могут влиять как на структурные, так и на функциональные характеристики. Использование нерастворимых в воде газов (например, перфторуглеродов) снижает скорость выхода газа от ядра в окружающее пространство, увеличивая тем самым срок жизни системы. Параметры сжимаемости газового ядра могут оказывать значительный эффект на объемные колебания системы из-за циклов сжатия/разрежения УЗ. Колебания объема пузырька могут усиливать эхо обратного рассеяния и способствовать высвобождению препарата, что может повышать эффективность диагностической визуализации и терапевтических применений соответственно.

Состав оболочки пузырьков определяет их жесткость и устойчивость к разрушению в поле давления УЗ, распознавание ретикулоэндотелиальной системой и биораспределение [15]. Оболочка обычно состоит из липидов (фосфолипидов, холестерина), полимеров (плюроников (Pluronic), полисахаридов, поли-D,L-лактид-ко-гликолидов (PLGA) или белков (альбумина).

Большое число исследований сосредоточено на ряде структур, среди которых нанопузырьки с ядром из перфторуглерода и полисахаридной оболочкой; их использование показало интересные результаты [16]. Это гибридные полимер-липидные системы, которые были разработаны для решения проблемы стабильности нанопузырьков и улучшения способности связывать лекарственные препараты. Присутствие полисахаридной оболочки делает возможным взаимодействие со специфическими лигандами.

На границе раздела гибридные системы содержат монослой фосфолипида, который может взаимодействовать с полиэлектролитами. Такая структура гибридной липид-полимерной системы разработана исходя из того, что монослои фосфолипида могут адсорбировать заряженные полимеры, такие как полисахариды, посредством различных типов взаимодействия, включая электростатические и гидрофобные.

Были предприняты попытки создания нанопузырьков меньшего размера. Большинство из них включали технологические манипуляции с микропузырьками в процессе приготовления, например разделение по градиенту силы тяжести, физическая фильтрация или флотация. Другой подход к достижению этой цели — изначальное формирование наноразмерных систем. В этом случае нанопузырьки получали главным образом с помощью обработки УЗ, эмульгирование с высоким сдвиговым усилием, тонкослойное испарение и механическое перемешивание; процедуры, которые также использовали для получения микропузырьков [13].

Нанопузырьки — универсальный инструмент для разработки наноносителей, управляемых извне, с контролируемым высвобождением действующего препарата и возможностями визуализации.

Следует отметить, что нанопузырьки демонстрируют высокую эффективность связывания (инкапсулирования) лекарственных препаратов и их пролонгированного высвобождения. В табл. 1 представлен список биологически активных молекул, которыми «загружали» перфторуглеродно-полисахаридные нанопузырьки, используя различные методы.

Стимулчувствительные наносистемы

Эффективность лечения лекарственными препаратами в значительной степени зависит от того, насколько хорошо активный компонент достигает целевых органов и тканей. На пути к цели молекулы лекарства подвергаются ферментативному воздействию, возникают проблемы с доступом к целевой области, а также селективностью клеток. В связи с этим многообещающей является разработка систем адресной доставки лекарственных средств с использованием НЧ, показавших хорошие результаты как с пассивным, так и с активным нацеливанием. Кроме того, благодаря новым свойствам таких наносистем возможно увеличить бионакопление препарата в нужном месте.

В общепринятом смысле системы адресной доставки лекарственных средств с использованием НЧ обеспечивают выход препарата из кровеносного русла только в целевых местах, или органах-«мишенях», где происходит пассивное либо активное накопление НЧ. Пассивное аккумулирование происходит благодаря эффекту EPR, наблюдающемуся в патологических тканях. Так, в клетках опухоли накопление НЧ происходит намного быстрее, чем в других тканях и характеризуется неравномерным распределением и зависимостью от величины частиц. Активное накопление достигается за счет специфического взаимодействия наносистем с клетками-мишенями — благодаря наличию на поверхности НЧ моноклональных антител или биоконъюгатов [17].

Однако использование систем адресной доставки лекарственных средств с использованием НЧ часто сопровождается системными побочными эффектами, которые связаны с неспецифическим биораспределением и неконтролируемыми особенностями высвобождения препарата. На фармацевтическом рынке уже предложено несколько нанопрепаратов для лечения рака, в том числе Doxil® и Abraxane®, показавших улучшенные профили безопасности по сравнению с обычными препаратами

(свободными). Однако отмечается, что бионакопление лекарства внутри опухоли все еще достаточно низкое, что приводит к недостаточному терапевтическому эффекту [18].

Для решения этих проблем идет поиск современных наносистем, способных обеспечить контролируемое в пространстве и времени прицельное высвобождение препарата. Совместные разработки в области наноматериалов и фармацевтических исследований прокладывают путь к развитию инновационных наноплатформ, в частности для лечения онкологических заболеваний, когда наноматериалы могут играть решающую терапевтическую роль вместе с переносимым препаратом. Использование продуманных наносистем, чувствительных к воздействию внешних и внутренних факторов, может увеличить эффективность препарата и уменьшить побочные эффекты, что дает начало так называемым «умным» стимулчувствительным наносистемам [19].

Существующие стимулчувствительные наносистемы относятся к двум типам: а) способные реагировать на изменения в биологической среде и таким образом модулировать скорость высвобождения препарата по принципу системы обратной связи, зависящие от особенностей болезни (внутренние спусковые механизмы, такие как изменения pH, редокс-потенциала, температуры и концентрации вещества); б) способные активироваться и высвобождать препарат под воздействием определенных внешних пусковых механизмов (свет, УЗ, температура, магнитное поле, высокоэнергетическое излучение) и таким образом действовать как системы разомкнутого контура, обеспечивающие импульсный выпуск лекарства.

Чувствительность к внутренним или внешним стимулам может быть достигнута использованием наноматериалов (главным образом, полимеров), несущих функциональные группы, способные менять их свойства в зависимости от интенсивности сигнала. Это приводит к изменению характеристик наносистемы, таких как способность высвобождать препарат. Изменения могут быть разного уровня сложности, но наносистему можно рассматривать как «умную» только при условии, что эти структурные изменения обратимы и пропорциональны интенсивности стимула. В случае опухолевых клеток такие требования могут быть лаконично определены как «2R2S», т. е. удержание препарата в процессе циркуляции в кровеносном русле — высвобождение препарата в опухоли (drug retention in blood circulations versus release in tumour; 2R) и неактивность в крови — активность в опухоли (stealthy in blood versus sticky in tumour; 2S) [18].

1. Наносистемы, чувствительные к внутренним стимулам

1.1. Наночастицы с pH-зависимым ответом

Классический пример стимул-зависимой наносистемы, реагирующей на внутренний сигнал, — работа pH-чувствительного наноносителя, применяемого для целевого транспорта в плотные опухоли. Низкий уровень pH во внеклеточном матриксе, вызванный активностью гликолиза в опухолевой ткани, может выступать в качестве специфического стимула для наносистемы. Учитывая, что поверхностный потенциал напрямую связан с уровнем клеточного потребления, для целевой доставки в опухолевую ткань были предложены заряд-индуцируемые полимерные наносистемы. Положительно заряженные НЧ демонстрируют хорошую проникающую способность благодаря активному взаимодействию с клеточной мембраной. Более того, такие НЧ способны функционировать подобно «протонной губке», вызывая разрушение лизосом, способствуя доставке внутри объема цитоплазмы и провоцируя гибель раковой клетки [20].

Новый полимер на основе тетра-глюкозы, полученный Caldera с соавт., представляет собой цепь из циклической нигерозил-1-6-нигерозы (CNN). В результате кросс-связи тетра-глюкозы и пиромеллитового диангидрата получены цельные НЧ, описанные как «наногубки» (НГ). Полимер характеризуется биосовместимостью и способностью избирательно усваиваться клетками в ответ на изменение pH. Доксорубицин хорошо упаковывается в наноструктуру и демонстрирует медленную и стабильную динамику высвобождения. Отмечено, что локальный уровень pH влияет на скорость вывода препарата. Сочетание pH-специфичности и способности к пролонгированному высвобождению доксорибуцина в CNN-наноструктуре, их совместное усиленное противоопухолевое действие позволяют утверждать, что такие наноструктуры успешно работают в качестве инструмента наномедицины, демонстрируя при этом мягкий токсикологический профиль терапии [21].

Стоит отдельно отметить применение флуоресцентно-меченых производных ЦД для pH-зависимого блокирования SiO_2-мезопор, где также продемонстрирована благоприятная кинетика высвобождения доксорубицина. Подобная система предоставляет в распоряжение специалиста значительное преимущество благодаря возможности отслеживать перемещение флуоресцентно окрашенных НЧ в ходе терапии [22].

Таблица. Примеры биологически активных веществ в составе нанопузырьков

Терапевтическое действие	Лекарственный препарат	Способ введения
Противоопухолевое	Доксорубицин, паклитаксел, доцетаксел, цисплатин	Парентерально
Антибактериальное	Ванкомицин, эритромицин	Местно
Противогрибковое	Итраконазол	Местно
Противовирусное	Ацикловир, валацикловир	Местно
Противовоспалительное	Преднизолон	Парентерально
Генная терапия	ДНК, малые интерферирующие РНК (siRNA)	Парентерально
Патологии, связанные с гипоксией	Кислород	Парентерально / Местно
Тераностические системы	Gd-комлексы	Парентерально
Другое	Куркумин, мелатонин	Парентерально / Местно

1.2. Наночастицы с редокс-зависимым ответом

Разработка и создание НЧ с редокс-зависимым ответом — еще одно перспективное направление в адресной доставке лекарственных препаратов к специфическим местам внутри клеток опухоли. В качестве опорной модели при создании редокс-зависимых наноносителей была выбрана функционирующая внутри раковой клетки и хорошо изученная система окисления глутатиона (GSH). Показано, что концентрация глутатиона, локализованного в опухолевых клетках, в 100–500 раз выше, чем в нормальных [23]. Известно также, что уровень GSH в межклеточном пространстве может провоцировать обмен связями в тиол-дисульфидной системе. Полимеры, имеющие в своей структуре дисульфидные связи, могут с успехом «эксплуатировать» данное свойство для быстрого высвобождения препарата при стимуляции глутатионом. В общем случае существует два пути использования особенностей дисульфидных связей в полимерных системах: а) модификацией дисульфидной связи непосредственно на каркасе полимера; б) посредством создания дисульфидных связей в качестве кросс-линкеров внутри полимерной сети.

В одном из исследований модифицировали систему доставки активного вещества, предложив использование наногубки, чувствительной к глутатиону и способной дестабилизироваться внутри клетки [24]. Дисульфидные связи полимера способны продолжительное время сохранять свою стабильность во внеклеточном пространстве, однако утрачивают ее, как только оказываются внутри клетки. Таким образом повышается биодоступность и эффективность работы редокс-зависимой наносистемы, поскольку истощение источника эндогенных антиоксидантов, таких как глутатион, делает раковые клетки более восприимчивыми к химиотерапии. Результатом разработки стало появление нового класса глутатиончувствительных ЦД-наногубок (GSH-NS), предназначенных для целевой доставки доксорубицина в клетки с высоким содержанием GSH. Глутатионспецифические носители, нагруженные доксорубицином, ингибировали клоногенный рост, жизнеспособность клеток, активность комплекса II топоизомеразы, и кроме того, при наблюдении в различных клеточных линиях индуцировали повреждение структуры ДНК в большей степени, чем при введении свободного лекарства. Стоит отметить, что применение данной системы позволило более эффективно ингибировать развитие опухоли простаты, чем при введении несвязанного лекарственного препарата, без повышения уровня токсичности, как было показано на ксенографтах [24]. Нагруженные доксорубицином GSH-наносистемы оказывают влияние на клеточную пролиферацию в дозах более низких, чем при использовании доксорубицина в свободной форме, что обеспечивает эффективность лечения и минимизацию побочного действия.

2. Наносистемы, чувствительные к внешним стимулам

2.1. Наночастицы с фотозависимым ответом

Высвобождение лекарственного препарата фото-возбуждаемыми наносистемами запускается воздействием света определенной длины волны от внешнего источника. К сожалению, низкая проникающая способность света накладывает существенные ограничения на область применения таких систем. В фотоиндуцируемой системе лекарство может быть связано с носителем посредством фоторазрушаемой связи или за счет применения носителя, наделенного способностью менять свою структуру при специфической засветке. Так, эффект ИК-фотозависимого сброса доксорубицина демонстрирует матрица, выполненная из полимеров лакто-когликолевой кислоты с нанесением золота [25]. Золотосодержащие наносистемы доставки лекарств в последнее время привлекают к себе повышенное внимание благодаря широте и гибкости достигаемых оптических характеристик, легкости производства, функциональности и хорошей биологической совместимости. Кроме того, такие НЧ занимают особое место среди наноплатформ благодаря уникальной способности выступать в качестве объекта для локализованного плазмонного резонанса (SPR, ЛПР) — метода, применяемого при мультимодальной терапии рака, в частности, при фототермальной терапии [26]. Под воздействием облучения в ближней ИК-области ЛПР в золотосодержащей НЧ приводит к локальному разогреву (на несколько градусов выше значения температуры тела). Подобную схему применяют, в частности, в нанокапсулах AutoShells для терапии очага опухоли, которые уже сегодня проходят стадию клинических испытаний. После внутривенного введения такие НЧ попадают под воздействие лазера, подведенного посредством оптического волокна, инициируют локальный разогрев в очаге раковой опухоли, обеспечивая тем самым фототермальную терапию [27]. Кроме того, поверхность золотонесущих НЧ пригодна для присоединения лекарственных веществ, олигонуклеотидов и пептидов. Данная наноплатформа может быть с успехом применена для выполнения задач по целевой доставке веществ и их высвобождению под воздействием внешнего сигнала.

2.2. Наночастицы и нанопузырьки, чувствительные к температуре и УЗ

Изменение температуры — один из удобных и эффективных факторов для контролирования высвобождения лекарственного препарата из наноносителя. При патофизиологических условиях, таких как опухолевые процессы, температура тканей выше температуры в здоровых тканях. Эта разница может выступать в качестве триггера, запуская процесс высвобождения лекарственного препарата в очаге опухоли. Термочувствительные наноносители разрабатывают таким образом, чтобы удерживать лекарственный агент при физиологической температуре (37 °C) и высвобождать его при повышении температуры до 40–45 °C. Из соображений безопасности диапазон температур для большинства наносистем рассчитывается таким образом, чтобы порог чувствительности к температурному сигналу превышал фоновые температурные флуктуации.

Специфическая аккумуляция лекарственного вещества в опухоли может быть достигнута совместным использованием эффекта гипертермии в присутствии термо-чувствительных липосом. ThermoDox — термозависимая липосомная наносистема — ближе других решений продвинулась на пути к клиническим исследованиям. Эта наносистема спроектирована таким образом, чтобы достигать кумулятивного эффекта от применения пассивного механизма высвобождения доксорубицина в опухолевой ткани совместно с повышением эффективности его доставки через микроциркуляторную часть сосудистого русла за счет использования внешнего источника нагрева,

в частности УЗ. Температура плавления липидного кристалла дипалмитолфосфатидинхолина составляет 41,5 °С, поэтому построенная на нем наносистема высвобождает доксорубицин, оказавшись в этих температурных условиях. Дополнительное действие на выброс лекарственного вещества в случае с ThermoDox оказывает УЗ-абляция. Результаты гепатотерапии с применением ThermoDox демонстрируют улучшенный токсикологический профиль в сравнении с традиционным протоколом введения лекарства, что было показано в ходе фазы I клинических испытаний. Несмотря на недостаточно высокий (33%) показатель продолжительности жизни после применения ThermoDox, зафиксированный в фазе III клинических испытаний, общая стратегия применения данной системы в качестве стимул-зависимого средства доставки может оказаться перспективной [19].

2.3. Наночастицы и нанопузырьки, чувствительные к УЗ

В клинической диагностике и терапии УЗ широко применяют во многом благодаря высокой проникающей способности и безопасности для организма. Низкочастотный УЗ способен проникать в органы тела без значительного рассеяния на несколько сантиметров [18].

На ткани организма УЗ оказывает воздействие разными путями, в том числе посредством локального повышения температуры. Его влияние варьирует в зависимости от используемой частоты волны, интенсивности излучения и продолжительности воздействия. Локальный прогрев тканей с помощью УЗ широко применяют на практике (сфокусированный УЗ высокой интенсивности) при терапии рака простаты [28], в то время как терапевтическое использование нетермического воздействия УЗ изучено в меньшей степени. Помимо термоэффекта УЗ используют для: а) переключения проницаемости биологических барьеров (сонопорация); б) регулирования доставки лекарственных средств; в) в сонодинамической терапии. Последнее применение открывает новые возможности в терапии рака. Сонодинамическая терапия (СДТ) — метод, при котором малотоксичная молекула или система (химический актуатор, соносенсибилизатор) активируется физическим воздействием УЗ, приводя к окислению, последующему повреждению и гибели злокачественной клетки. Эффект СДТ достигается за счет приложения внешнего стимула при наличии активируемой им молекулы или коллоидной системы. Комбинирование двух этих факторов в свою очередь обеспечивает биологический эффект. Акустическая кавитация — формирование или функциональность полостных образований, наполненных газом или паром (пузырьков) в среде, подверженной воздействию УЗ. Различают два состояния акустической кавитации — стабильного, при котором совершаемые колебания приводят к испарению жидкости и активному перемешиванию окружающей их микросреды; и инерционного, при котором растущие полости увеличиваются до размеров, сопоставимых с длиной волны УЗ, а достигнув своего максимума, взрываются. Во втором случае при выбросе энергии температура микроокружения вокруг взрыва может резко вырастать до 10 000 °С, а давление — до 81 МПа, превращая систему в своего рода «сонохимический реактор» [29]. При проведении противораковой СДТ НЧ могут выступать не только в качестве стимул-зависимого соносенсибилизированного средства транспортировки с улучшенными пространственными и скоростными характеристиками, но и, при грамотном дизайне, как соносенсибилизатор «сам в себе» [30].

Отдельный интерес представляет совместное использование нанопузырьков и УЗ для целевой доставки нуклеиновых кислот [31]. Техника доставки достигается за счет применения различных методик «загрузки», таких как прямое физическое «укладывание» молекулы ДНК внутрь транспортной капсулы в лабораторных условиях, применение в капсуле отрицательно заряженных липидов или полимеров, способных связывать молекулу ДНК электростатически, и, наконец, ковалентное связывание НЧ с цепью ДНК.

Нам представилась возможность использовать различные наносистемы и применять их как в качестве системы доставки в связке с УЗ-чувствительным химическим агентом (соносентитайзером), так и в качестве УЗ-зависимой системы «сам в себе» для СДТ рака. При этом была продемонстрирована значительная противораковая активность цельнотельных НЧ из полиметилметакрилата, нагруженных мезотетракис(4-сульфонатофенил)порфирином (TPPS-PMMAНЧ), при воздействии УЗ в целевом сайте в модели *in vitro* нейробластомы [32]. Эти НЧ были адаптированы для применения *in vivo* в соносенсибилизированных системах, в качестве радиометок и магнитно-резонансных агентов визуализации, что делало их пригодными для направленного лечения плотных опухолей и визуализации. Наносистему нагружали TPPS для проведения противораковой СДТ, либо ^{64}Cu-TPPS для использования в исследовании топографии распространения при помощи позитрон-эмиссионной томографии или же Mn(III)-TPPS для изучения методом магнитного резонанса. По результату сравнения данных МР-исследования для материала, взятого до и после лечения в сингенной модели рака груди, наносистема TPPS-PMMAНЧ демонстрировала чувствительность к УЗ, свидетельствуя о том, что данная мультимодальная система может с успехом применяться в качестве селективного управляемого извне инструмента в борьбе с раком [33].

Были также изучены свойства неорганических НЧ, в данном случае из золота, с целью лучше понять уникальность свойственного им феномена ЛПР. Золотые НЧ, соединенные с фолатполиэтиленгликолем (FA-PEG-GHЧ), были подвергнуты испытанию в качестве соносенсибилизатора в лечении рака. Чувствительность к УЗ-воздействию изучали на клеточной линии человеческих раковых клеток с различным количеством фолат-рецепторов. Было обнаружено, что FA-PEG-GHЧ имеет селективную чувствительность к фолат-рецепторам гиперэкспрессивных раковых клеток, приводя через воздействие УЗ к снижению показателя клеточного роста, ощутимому приросту в генерации активных форм кислорода и увеличению количества некротических клеток [34]. Синергия использования целевой точности, характерной для НЧ из золота, с сенсибилизирующим эффектом, получаемым за счет местного внешнего стимула, делает эти наносистемы многообещающей платформой для сайт-специфической терапии рака. Данное исследование *in vitro* можно рассматривать как доказательство возможности применения золотых НЧ в лечении рака.

Понятие «нанопузырек» до момента приложения внешнего стимула, такого как УЗ, следует воспринимать скорее в значении «нанокапля», основа которой состоит из перфлюоропентана — перфлюорокарбона, находящегося

в жидком состоянии при комнатной температуре (точка кипения равна 29 °C). Высвобождение может быть активировано под воздействием УЗ за счет механизма акустической капельной вапоризации [35].

В одной из работ изучали целесообразность совместного применения нанопузырьков с УЗ-воздействием при местном лечении кожных заболеваний. Был разработан носитель для лечения локальных кожных патологий, связанных с гипоксией, и ускорения процесса заживления ран [36].

Специально для доставки кислорода были разработаны нанопузырьки с декстрановой и хитозановой оболочкой, нагруженные декафлуоропентаном («нанокапли») или додекафлуоропентаном («нанопузырьки»), которые за счет свойств перфлуорокарбоната были способны солюбилизировать и сохранять кислород в своем ядре, а также медленно и стабильно его высвобождать [36–39]. Декафлуоропентановая система продемонстрировала значительную эффективность при доставке кислорода в зоны гипоксии, в условиях как *in vitro*, так и *in vivo*, что было показано в ходе сравнительного анализа с применением оксиметрии и фотоакустической визуализации. Нанокапли в хитозановой оболочке, нагруженные кислородом, были предложены в качестве инновационного инструмента для адъювантной терапии при лечении заражений у больных с хроническими кожным болезнями за счет использования противомикробных свойств хитозана [36, 40].

Нагруженные кислородом нанокапли продемонстрировали высокую цитостатическую активность против метициллинустойчивых микроорганизмов *Staphylococcus aureus* (MRSA) и *Candida albicans* и не имели токсического эффекта в человеческих кератиноцитах (HaCaT). Кроме того, дополнительное воздействие УЗ способствовало трансдермальной доставке кислорода из нанокапель в ткани, подверженные гипоксии. Исследования последних лет были посвящены глубокому изучению морфологии нанопузырьков, способствующих переносу кислорода, так как экзогенное поступление кислорода в опухоль затруднено в случае удаления от кровеносного русла. Хорошая растворимость кислорода в пузырьках дает преимущество при доставке кислорода в гипоксическую ткань.

Для целевой доставки лекарства при кожных инфекционных заболеваниях были спроектированы нанопузырьки, выполненные из декстрансульфата и нагруженные ванкомицином [41]. Совместное применение целевой доставки и воздействия УЗ способствовало проникновению антибиотика сквозь толщу кожного покрова за счет эффекта сонофореза, при этом целевое высвобождение лекарства происходило в очаге заболевания.

Были предложены нанопузырьки из диэтиламиноэтилдекстрана (DEAE), обеспечивающие защиту от воздействия протеаз и транспортировку нагруженных в них молекул ДНК для осуществления трансфекции плазмидной ДНК через клеточную мембрану. Цитотоксического эффекта при этом не наблюдали [42]. Для транспортировки ДНК была предложена еще одна формула нанопузырьков на основе хитозана. Нанопузырьки с нагруженной в них ДНК имели размер до 300 нм, вмещая при этом значительный объем ДНК [43]. Были также проведены эксперименты с трансфекцией *in vitro*, в которых адгезивные клетки линии COS7 подвергали воздействию УЗ с частотой 2,5 МГц в присутствии различных концентраций нанопузырьков, заполненных плазмидной ДНК. Во всех протестированных концентрациях ни одна из трансфекций не прошла успешно без УЗ-стимула. В результате 30-секундного УЗ-воздействия выявлялся умеренный процент успешной трансфекции. Исследования по оценке жизнеспособности клеток продемонстрировали, что ни УЗ, ни нанопузырьки не оказывали негативного влияния на систему в условиях проведенных экспериментов.

Постоянные усилия исследователей в области иммунотерапии рака в последние годы привели к появлению нескольких концепций вакцинации, основанных на опухолеассоциированных антигенах, таких как онкоген HER2.

Противораковая вакцинация имеет ряд очевидных преимуществ по сравнениию со стандартной терапией. Это и более высокая специфичность, и меньшая токсичность, и более мягкие долгосрочные эффекты, вызванные иммунной памятью. В этом смысле нанотехнологии обладают большим потенциалом для иммунотерапии и могут значительно улучшить ее качество. Ведь для качественного усиления иммунного ответа на развитие опухоли вакцина должна прежде всего достичь соответствующих дендритных клеток, играющих критическую роль в индуцировании корректной иммунной реакции.

В последние годы для лечения HER2-положительного рака груди был разработан новейший иммунотерапевтический инструмент — хитозановые нанопузырьки, несущие ДНК-вакцину и снабженные поверхностными антителами anti-CD11C для целевого распознавания дендритных клеток [44]. Подкожная инъекция нанопузырьков с CD11c, нагруженных pHER2, проявлялась в миграции дермальных дендритных клеток к дренированным лимфатическим узлам и замедлению роста HER2-положительной опухоли. Таким образом, в данном исследовании на модели с мышами наблюдали индуцированный клеточный и гуморальный иммунный ответ.

Исследователи изучают различные модификации нанопузырьков в качестве диагностико-терапевтических платформ, надеясь использовать их эхогенные свойства. Полимерный нанопузырек рассматривают в качестве многофункционального инструмента для целевой атаки на раковые клетки, УЗ-визуализации и для проведения УЗ-стимулируемой терапии рака.

Нами был разработан вариант хитозиновых нанопузырьков для использования в качестве диагностико-терапевтической системы, способной обеспечить двойную визуальную детекцию нанопузырьков [45]. Вариант наносистемы одновременно доставлял фосфат преднизолона, размещенного на переднем крае перфлуоропентанного ядра, и отрицательно заряженный комплекс GD-DOTP, связанный электростатически с катионным хитозановым корпусом. Нанопузырьки проявляли свойство эхогенности, что позволяет использовать их в визуальных системах реального времени, и одновременно демонстрировали позитивный контраст в магнитно-резонансном исследовании.

Было изучено влияние экстракорпоральных ударных волн (ЭУВ) в качестве еще одного внешнего стимула, в результате реакции на который (помимо УЗ) может быть произведен выброс активного компонента наносистемы. ЭУВ короткоживущие (менее 10 мс) сфокусированные акустические колебания, широко применяемые в урологии для проведения литотрипсии и лечения различных опорно-двигательных дисфункций. Эффективность применения ЭУВ-стимулируемого нанотранспортного пузырька была

детально изучена. Стоит заметить, что эффективность совместного действия нанопузырьков и ЭУВ изучали в отношении по меньшей мере двух агрессивных типов рака — анапластического рака щитовидной железы и рака простаты [46–49]. Согласно полученным данным, совместная терапия с использованием нанопузырьков, нагруженных паклитакселом или доцетакселом, и ЭУВ увеличивает цитотоксичность обоих лекарственных средств в двух линиях раковых клеток простаты (PC3 и DU145). В результате исследования дозировка паклитаксела GI50 была уменьшена до 55% от номинала, а доцетаксела — до 45% (рис. 2) [48].

2.4. Магнитные наночастицы

Использование магнитных НЧ делает возможным неинвазивный пространственно-временной контроль процесса адресного переноса лекарственных препаратов и программируемого высвобождения препарата под воздействием внешнего магнитного поля. Чаще всего используемые магнитные НЧ обличаются рядом уникальных магнитных свойств. Большое соотношение поверхности к объему дает огромные возможности для конъюгации с биомолекулами, облегчая таким образом дизайн и разработку, чтобы намеченные «умные» способности таких НЧ (длительно циркулировать в кровотоке и адресно взаимодействовать с тканями) эффективно реализовывались при действии локализованного внешнего магнитного поля. Повышение температуры может быть вызвано разными источниками энергии, чаще всего применяется электромагнитная энергия. Гипертермию, как правило, вызывают высокими частотами (от 13 МГц до 430 МГц в зависимости от глубины опухоли) с использованием антенн с фазированной решеткой, помещаемых вне тела, в то время как частоты 915 МГц или 2,45 ГГц применяются для термоабляции с использованием внутритканевых антенн, помещенных в центр опухоли. Безопасность и эффективность гипертермии и термоабляции были показаны в нескольких клинических испытаниях [50]. Однако для обеих методик отмечены низкая воспроизводимость результатов, а также сложности с контролированием распределения температур внутри опухоли в различных клинических условиях. Проводимые в настоящее время исследования нацелены на увеличение однородности нагревания и специфичности взаимодействия с мишенью, минимизируя при этом инвазивность. Многообещающим способом решения этих задач может стать термолечение с помощью магнитных НЧ, включающее локальное нагревание после инъекции НЧ в ткань и последовательное воздействие внешних магнитных полей. Основным ограничением магнитной термотерапии является низкая эффективность

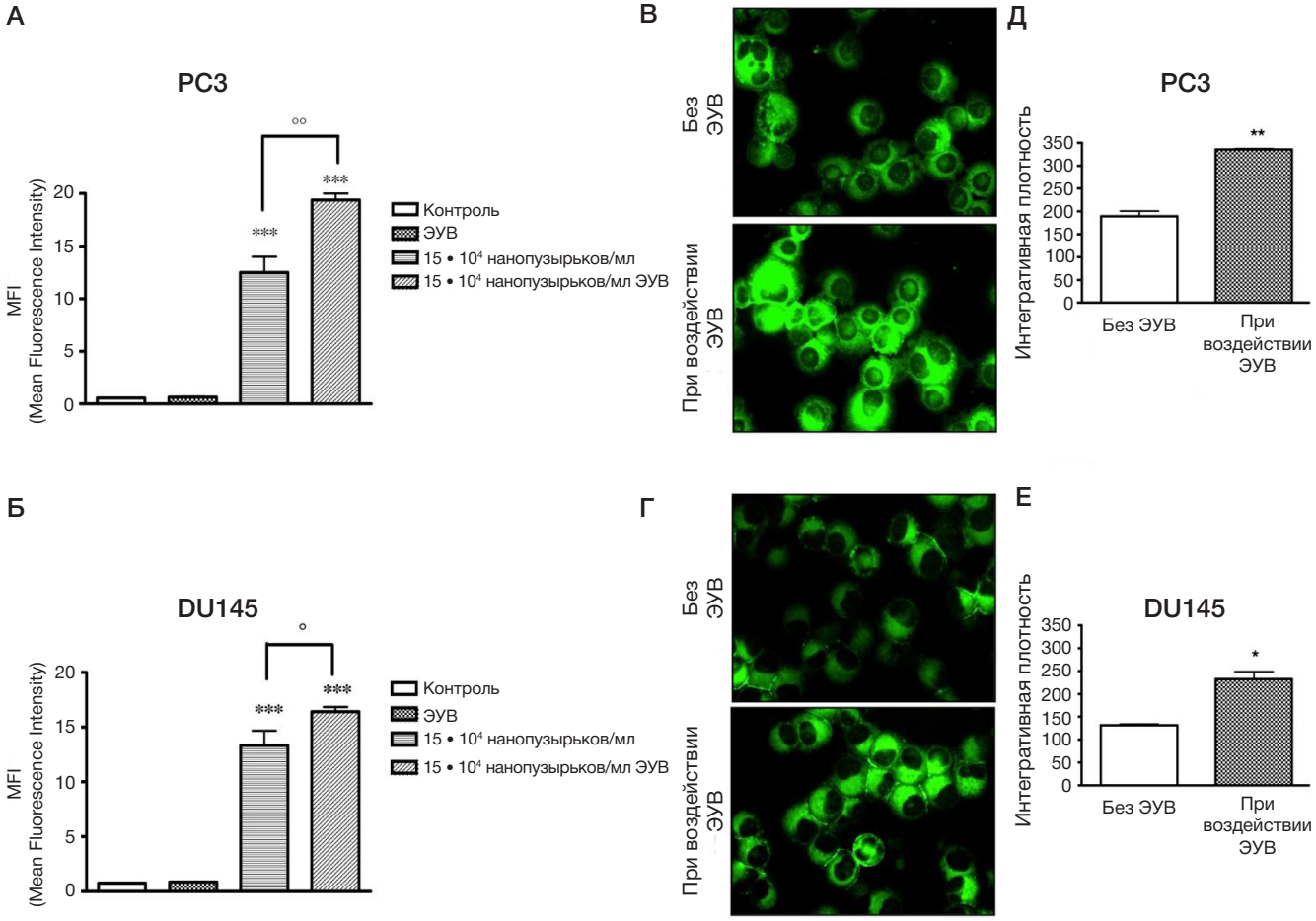


Рис. 2. Вход нанопузырька. Цитофлуориметрический анализ клеточной линии PC3 (**А**) и DU145 (**Б**) через 24 ч после введения 6-кумарин-меченых гликольхитозиновых нанопузырьков (15 • 10^4 нанопузырьков/мл) либо при отсутствии или при использовании ЭУВ, выраженных в единицах средней флуоресцентной интенсивности. Значения для контрольных клеток: p < 0,001 (***); значение для клеток, получивших воздействие ЭУВ: $p < 0,05$ (°); $p < 0,01$ (°°). **Флуоресцентно-микроскопические фотографии** линий PC3 (**В**) и DU145 (**Г**), получивших 6-кумарин-меченный гликольхитозановых нанопузырьков (15 • 10^4 нанопузырьков/мл). Показаны клетки при отсутствии и при воздействии ЭУВ. Увеличение ×200 (масштаб 100 мкм). Фотографии демонстрируют результаты трех независимых экспериментов. Произведен обсчет на 10 полях. Обсчет 6-кумарин-меченных гликольхитозановых нанопузырьков в клеточной линии PC3 (**Д**) и DU145 (**Е**). Значение при воздействии ЭУВ: $p < 0,05$ (*); $p < 0,01$ (**). (По данным: Marano F et al. [48].)

нагревания большинства магнитных наноматериалов, что приводит к тому, что терапевтический эффект наблюдается только при условии введения в опухоль больших количеств магнитных НЧ. В связи с этим основные усилия направлены, соответственно, на оптимизацию эффективности нагревания и биосовместимости, путем подбора размеров частиц с учетом их физических свойств, а также различных материалов покрытия. Разработанные недавно магнитные нанодиски и нанокольца могут стать альтернативой магнитным НЧ, поскольку характеризуются незначительным остаточным намагничиванием и последовательным ослаблением дальнодействующих магнитостатических сил, ответственных за агломерацию частиц. Предварительные исследования продемонстрировали потенциал этих наноструктур как эффективных нанопосредников в термотерапии рака, поскольку они показывают улучшенные характеристики гипертермии относительно изотропных магнитных частиц. Магнитные частицы Ni80Fe20 в форме диска были получены с помощью субмикронной литографии и непосредственно покрыты слоем золота [51]. Авторами была проведена функционализация золотой поверхности частиц цистеин-производным флуоресцеинизотиоцианата (ФИТЦ), чтобы вызвать случайную флуоресценцию для использования в качестве средства оценки попадания внутрь клеток. Процесс намагничивания частиц характеризовался присутствием «завихрений», указывающих на возможную задействованность в процессе доставки лекарственных средств и также при магнитной гипертермии. Стоит отметить, что тесты на цитотоксичность показали более высокую биосовместимость не полностью покрытых золотом частиц по сравнению с непокрытыми нанодисками. Накопление магнитных НЧ в клетках было подтверждено цитофлуорометрически, с использованием конъюгата ФИТЦ на поверхности покрытых золотом частиц [52].

ВЫВОДЫ

Использование в биомедицине «умных» систем адресной доставки лекарственных средств с помощью НЧ оказалось весьма высокоэффективным. Однако до перехода к клиническим испытаниям требуется тщательная всесторонняя оценка их терапевтического потенциала. Ряд стимулчувствительных наносистем в настоящее время проходят клиническую оценку, но пока лишь несколько из них, в частности NanoTherms®, были одобрены для клинического применения, при этом большинство коммерциализировано для использования в научных исследованиях [18]. Будущие исследования в области наносистем адресной доставки лекарственных препаратов должны быть сосредоточены на разработке более легко осуществимых на практике и однотипных методов получения наноносителей, а также переходе к клиническому применению с целью внедрения данных методик в практическое использование. Важнейшей задачей для исследователей в настоящее время является проведение тщательных доклинических испытаний перспективных наносистем с целью улучшения воспроизводимости результатов и последующим переходом к клиническим испытаниям.

Литература

1. Portehault D, Delacroix S, Gouget G, Grosjean R, Chan-Chang T-H-C. Beyond the Compositional Threshold of Nanoparticle-Based Materials. Accounts of Chemical Research. 2018; 51 (4): 930–9.
2. Cravotto G, Boffa L. Preparation of nanomaterials under combined ultrasound/microwave irradiation. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.: 2014; p. 203–26.
3. Martina K, Tagliapietra S, Barge A, Cravotto G. Combined Microwaves/Ultrasound, a Hybrid Technology. Top Curr Chem. 2016; 374 (6): 1–27.
4. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future. Nat Rev Drug Discov. 2004; (3): 1023–35.
5. Barge A, Caporaso M, Cravotto G, Martina K, Tosco P, Aime S et al. Design and Synthesis of a γ1β8-Cyclodextrin Oligomer: A New Platform with Potential Application as a Dendrimeric Multicarrier. Chem Eur J. 2013; 19 (36): 12086–92.
6. Martina K, Baricco F, Berlier G, Caporaso M, Cravotto G. Efficient Green Protocols for Preparation of Highly Functionalized β-Cyclodextrin-Grafted Silica. ACS Sustainable Chem Eng. 2014; 2 (11): 2595–603.
7. Huq R, Mercier L, Kooyman PJ. Incorporation of Cyclodextrin into Mesostructured Silica. Chem Mater. 2001; 13 (12): 4512–9.
8. Lee J-H, Kang S, Ahn M, Jang H, Min D-H. Development of dual-pore coexisting branched silica nanoparticles for efficient gene-chemo cancer therapy. Small. 2018; 14 (7): 1702564.
9. Calcio Gaudino E, Tagliapietra S, Martina K, et al. Novel SWCNT platform bearing DOTA and β-cyclodextrin units. "One shot" multidecoration under microwave irradiation. Org Biomol Chem. 2014; (12): 4708–15.
10. Bosca F, Orio L, Tagliapietra S, Corazzari I, Turci F, Martina K, Pastero L, Cravotto G et al. Microwave-Assisted Synthesis and Physicochemical Characterization of Tetrafuranylporphyrin-Grafted Reduced-Graphene Oxide. Chem Eur J. 2016; (22): 1608–13.
11. Duan S, Li J, Zhao N, Xu F-J. Multifunctional hybrids with versatile types of nanoparticles via self-assembly for complementary tumor therapy. Nanoscale. 2018; (10): 7649–57.
12. Bolden NW, Rangari VK, Jeelani S, Boyoglu S, Singh SR. Synthesis and evaluation of magnetic nanoparticles for biomedical applications. J Nanopart. 2013: 1–9; DOI:10.1155/2013/370812.
13. Güvener N, Appold L, de Lorenzi F, Golombek SK, Rizzo LY, Lammers T, Kiessling F. Recent advances in ultrasound-based diagnosis and therapy with micro-and nanometer-sized formulations. Methods. 2017; (130): 4–13.
14. Cavalli R, Soster M, Argenziano M. Nanobubbles: a promising efficient tool for therapeutic delivery. Ther Deliv. 2016; 7 (2): 117–38.
15. Delalande A, Postema M, Mignet N, Midoux P, Pichon C. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery: recent advances and ongoing challenges. Ther Deliv. 2012; 3 (10): 1199–215.
16. Cavalli R, Bisazza A, Giustetto P, Civra A, Lembo D, Trotta G et al. Preparation and characterization of dextran nanobubbles for oxygen delivery. Int J Pharm. 2009; 381 (2): 160–5.
17. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. Trends Pharmacol Sci. 2009 Nov; 30 (11): 592–9.
18. Alvarez-Lorenzo C1, Concheiro A. Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic. Chem Commun. 2014; 50 (58): 7743–65.
19. Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. Theranostics. 2016 Jun 7; 6 (9): 1306–23.
20. Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials. Chem Soc Rev. 2012 Mar 21; 41 (6): 2323–43.
21. Caldera F, Argenziano M, Trotta F, Dianzani C, Gigliotti L, Tannous M et al. Cyclic nigerosyl-1,6-nigerose-based nanosponges: An innovative pH and time-controlled nanocarrier for improving cancer treatment. Carbohydr Polym. 2018; (194): 111–21.
22. Chen X, Yao X, Wang C, Chen L, Chen X. Mesoporous silica

nanoparticles capped with fluorescence-conjugated cyclodextrin for pH-activated controlled drug delivery and imaging. Microporous Mesoporous Mater. 2015; (217): 46–53.
23. Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. Nat Rev Drug Discov. 2014 Nov; 13 (11): 813–27.
24. Daga M, Ullio C, Argenziano M, Dianzani C, Cavalli R, Trotta F et al. GSH-targeted nanosponges increase doxorubicin-induced toxicity "in vitro" and "in vivo" in cancer cells with high antioxidant defenses. Free Radic Biol Med. 2016; (97): 24–37.
25. Yang J, Lee J, Kang J, Oh SJ, Ko HJ, Son JH et al. Smart drug-loaded polymer gold nanoshells for systemic and localized therapy of human epithelial cancer. Adv Mater. 2009 Nov 20; 21 (43): 4339–42.
26. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. Langmuir. 2005 Nov 8; 21 (23): 10644–54.
27. Schwartz JA, Shetty AM, Price RE, Stafford RJ, Wang JC, Uthamanthil RK et al. Feasibility study of particle-assisted laser ablation of brain tumors in orthotopic canine model. Cancer Res. 2009 Feb 15; 69 (4): 1659–67.
28. Maloney E, Hwang JH. Emerging HIFU applications in cancer therapy. Int J Hyperthermia. 2015; 31 (3): 302–9.
29. Giuntini F, Foglietta F, Marucco AM, Troia A, Dezhkunov NV, Pozzoli A et al. Insight into ultrasound-mediated reactive oxygen species generation by various metal-porphyrin complexes. Free Radic Biol Med. 2018; (121): 190–201.
30. Serpe L, Foglietta F, Canaparo R. Nanosonotechnology: The next challenge in cancer sonodynamic therapy. Nanotechnology Reviews. 2012; 1 (2): 173–82.
31. Cavalli R, Bisazza A, Lembo D. Micro-and nanobubbles: a versatile non-viral platform for gene delivery. Int J Pharm. 2013; 456 (2): 437–45.
32. Canaparo R, Varchi G, Ballestri M, Foglietta F, Sotgiu G, Guerrini A et al. Polymeric nanoparticles enhance the sonodynamic activity of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin in an in vitro neuroblastoma model. Int J Nanomedicine. 2013; (8): 4247–63.
33. Varchi G, Foglietta F, Canaparo R, Ballestri M, Arena F, Sotgiu G et al. Engineered porphyrin loaded core-shell nanoparticles for selective sonodynamic anticancer treatment. Nanomedicine 2015; 10 (23): 3483–94.
34. Brazzale C, Canaparo R, Racca L, Foglietta F, Durando G, Fantozzi R et al. Enhanced selective sonosensitizing efficacy of ultrasound-based anticancer treatment by targeted gold nanoparticles. Nanomedicine. 2016; 11 (23): 3053–70.
35. Kripfgans OD, Fowlkes JB, Miller DL Eldevik OP, Carson PL. Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications. Ultrasound Med Biol. 2000; 6 (7): 1177–89.
36. Prato M, Magnetto C, Jose J, Khadjavi A, Cavallo F, Quaglino E et al. 2H, 3H-decafluoropentane-based nanodroplets: new perspectives for oxygen delivery to hypoxic cutaneous tissues. PLoS One. 2015; 10 (3): e0119769.
37. Basilico N, Magnetto C, D'Alessandro S, Panariti A, Rivolta I, Genova T et al. Dextran-shelled oxygen-loaded nanodroplets reestablish a normoxia-like pro-angiogenic phenotype and behavior in hypoxic human dermal microvascular endothelium, Toxicol Appl Pharmacol. 2015; 288 (3): 330–8.
38. Cavalli R, Bisazza A, Rolfo A, Balbis S, Madonnaripa D, Caniggia I et al. Ultrasound-mediated oxygen delivery from chitosan nanobubbles. Int J Pharm. 2009; 378 (1–2): 215–7.
39. Khadjavi A, Magnetto C, Panariti A, Argenziano M, Gulino GR, Rivolta I et al. Chitosan-shelled oxygen-loaded nanodroplets abrogate hypoxia dysregulation of human keratinocyte gelatinases and inhibitors: new insights for chronic wound healing. Toxicol Appl Pharmacol. 2015; 286 (3): 198–206.
40. Banche G, Prato M, Magnetto C, Allizond V, Giribaldi G, Argenziano M et al. Antimicrobial chitosan nanodroplets: new insights for ultrasound-mediated adjuvant treatment of skin infection. Future Microbiol. 2015; 10 (6): 929–39.
41. Argenziano M, Banche G, Luganini A, Finesso N, Allizond V, Gulino GR et al. Vancomycin-loaded nanobubbles: A new platform for controlled antibiotic delivery against methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Int J Pharm. 2017; 523 (1): 176–88.
42. Bisazza A, Civra A, Donalisio M, Lembo D, Cavalli R. The in vitro characterization of dextran-based nanobubbles as possible DNA transfection agents. Soft Matter. 2011; 7 (22): 10590–3.
43. Cavalli R, Bisazza A, Trotta M, Argenziano M, Civra A, Donalisio M et al. New chitosan nanobubbles for ultrasound-mediated gene delivery: preparation and in vitro characterization. Int J Nanomedicine. 2012; (7): 3309–18.
44. Cavalli R, Occhipinti S, Argenziano M, Bessone F, Guiot C, Giovarelli M. Nanobubble technology-based HER2 immunotherapy through dendritic cells targeting. Presented at "CRS Annual Meeting & Exposition", July 16–19 2017; Boston, Massachusetts, USA.
45. Cavalli R, Argenziano M, Vigna E, Giustetto P, Torres E, Aime S et al. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanobubbles as theranostic agents. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015; (129): 39–46.
46. Marano F, Argenziano M, Frairia R, Adamini A, Bosco O, Rinella L et al. Doxorubicin-loaded nanobubbles combined with extracorporeal shock waves: basis for a new drug delivery tool in anaplastic thyroid cancer. Thyroid. 2016; 26 (5): 705–16.
47. Marano F, Frairia R, Rinella L, Argenziano M, Bussolati B, Grange C et al. Combining doxorubicin-nanobubbles and shockwaves for anaplastic thyroid cancer treatment: preclinical study in a xenograft mouse model. Endocr Relat Cancer. 2017; 24 (6): 275–86.
48. Marano F, Rinella L, Argenziano M, Cavalli R, Sassi F, D'Amelio P et al. Targeting Taxanes to Castration-Resistant Prostate Cancer Cells by Nanobubbles and Extracorporeal Shock Waves. PloS One. 2016; 11 (12): e0168553.
49. Roberta C, Francesca M, Monica A, Alessandra V, Roberto F, Maria Graziella C. Combining Drug-Loaded Nanobubbles and Extracorporeal Shock Waves for Difficult-to-Treat Cancers. Current Drug Delivery. 2017; (14): 1–3.
50. Glazer ES, Curley SA. The ongoing history of thermal therapy for cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2011; 20 (2): 229–35.
51. Kosiorek A, Kandulski W, Glaczynska H, Giersig M. Fabrication of nanoscale rings, dots, and rods by combining shadow nanosphere lithography and annealed polystyrene nanosphere masks. Small. 2005; (1): 439–44.
52. Barrera G, Serpe L, Celegato F, Coïsson M, Martina K, Canaparo R et al. Surface modification and cellular uptake evaluation of Au-coated Ni80Fe20 nanodiscs for biomedical applications. Interface Focus. 2016; 6 (6). DOI: 10.1098/rsfs.2016.0052.

References

1. Portehault D, Delacroix S, Gouget G, Grosjean R, Chan-Chang T-H-C. Beyond the Compositional Threshold of Nanoparticle-Based Materials. Accounts of Chemical Research. 2018; 51 (4): 930–9.
2. Cravotto G, Boffa L. Preparation of nanomaterials under combined ultrasound/microwave irradiation. Pan Stanford Publishing Pte. Ltd.: 2014; p. 203–26.
3. Martina K, Tagliapietra S, Barge A, Cravotto G. Combined Microwaves/Ultrasound, a Hybrid Technology. Top Curr Chem. 2016; 374 (6): 1–27.
4. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceutics: past, present and future. Nat Rev Drug Discov. 2004; (3): 1023–35.
5. Barge A, Caporaso M, Cravotto G, Martina K, Tosco P, Aime S et al. Design and Synthesis of a γ1β8-Cyclodextrin Oligomer: A New Platform with Potential Application as a Dendrimeric Multicarrier. Chem Eur J. 2013; 19 (36): 12086–92.
6. Martina K, Baricco F, Berlier G, Caporaso M, Cravotto G. Efficient Green Protocols for Preparation of Highly Functionalized β-Cyclodextrin-Grafted Silica. ACS Sustainable Chem Eng. 2014; 2 (11): 2595–603.
7. Huq R, Mercier L, Kooyman PJ. Incorporation of Cyclodextrin into

Mesostructured Silica. Chem Mater. 2001; 13 (12): 4512–9.
8. Lee J-H, Kang S, Ahn M, Jang H, Min D-H. Development of dual-pore coexisting branched silica nanoparticles for efficient gene-chemo cancer therapy. Small. 2018; 14 (7): 1702564.
9. Calcio Gaudino E, Tagliapietra S, Martina K, et al. Novel SWCNT platform bearing DOTA and β-cyclodextrin units. "One shot" multidecoration under microwave irradiation. Org Biomol Chem. 2014; (12): 4708–15.
10. Bosca F, Orio L, Tagliapietra S, Corazzari I, Turci F, Martina K, Pastero L, Cravotto G et al. Microwave-Assisted Synthesis and Physicochemical Characterization of Tetrafuranylporphyrin-Grafted Reduced-Graphene Oxide. Chem Eur J. 2016; (22): 1608–13.
11. Duan S, Li J, Zhao N, Xu F-J. Multifunctional hybrids with versatile types of nanoparticles via self-assembly for complementary tumor therapy. Nanoscale. 2018; (10): 7649–57.
12. Bolden NW, Rangari VK, Jeelani S, Boyoglu S, Singh SR. Synthesis and evaluation of magnetic nanoparticles for biomedical applications. J Nanopart. 2013: 1–9; DOI:10.1155/2013/370812.
13. Güvener N, Appold L, de Lorenzi F, Golombek SK, Rizzo LY, Lammers T, Kiessling F. Recent advances in ultrasound-based diagnosis and therapy with micro-and nanometer-sized formulations. Methods. 2017; (130): 4–13.
14. Cavalli R, Soster M, Argenziano M. Nanobubbles: a promising efficient tool for therapeutic delivery. Ther Deliv. 2016; 7 (2): 117–38.
15. Delalande A, Postema M, Mignet N, Midoux P, Pichon C. Ultrasound and microbubble-assisted gene delivery: recent advances and ongoing challenges. Ther Deliv. 2012; 3 (10): 1199–215.
16. Cavalli R, Bisazza A, Giustetto P, Civra A, Lembo D, Trotta G et al. Preparation and characterization of dextran nanobubbles for oxygen delivery. Int J Pharm. 2009; 381 (2): 160–5.
17. Malam Y, Loizidou M, Seifalian AM. Liposomes and nanoparticles: nanosized vehicles for drug delivery in cancer. Trends Pharmacol Sci. 2009 Nov; 30 (11): 592–9.
18. Alvarez-Lorenzo C1, Concheiro A. Smart drug delivery systems: from fundamentals to the clinic. Chem Commun. 2014; 50 (58): 7743–65.
19. Liu D, Yang F, Xiong F, Gu N. The Smart Drug Delivery System and Its Clinical Potential. Theranostics. 2016 Jun 7; 6 (9): 1306–23.
20. Sharifi S, Behzadi S, Laurent S, Forrest ML, Stroeve P, Mahmoudi M. Toxicity of nanomaterials. Chem Soc Rev. 2012 Mar 21; 41 (6): 2323–43.
21. Caldera F, Argenziano M, Trotta F, Dianzani C, Gigliotti L, Tannous M et al. Cyclic nigerosyl-1,6-nigerose-based nanosponges: An innovative pH and time-controlled nanocarrier for improving cancer treatment. Carbohydr Polym. 2018; (194): 111–21.
22. Chen X, Yao X, Wang C, Chen L, Chen X. Mesoporous silica nanoparticles capped with fluorescence-conjugated cyclodextrin for pH-activated controlled drug delivery and imaging. Microporous Mesoporous Mater. 2015; (217): 46–53.
23. Torchilin VP. Multifunctional, stimuli-sensitive nanoparticulate systems for drug delivery. Nat Rev Drug Discov. 2014 Nov; 13 (11): 813–27.
24. Daga M, Ullio C, Argenziano M, Dianzani C, Cavalli R, Trotta F et al. GSH-targeted nanosponges increase doxorubicin-induced toxicity "in vitro" and "in vivo" in cancer cells with high antioxidant defenses. Free Radic Biol Med. 2016; (97): 24–37.
25. Yang J, Lee J, Kang J, Oh SJ, Ko HJ, Son JH et al. Smart drug-loaded polymer gold nanoshells for systemic and localized therapy of human epithelial cancer. Adv Mater. 2009 Nov 20; 21 (43): 4339–42.
26. Shukla R, Bansal V, Chaudhary M, Basu A, Bhonde RR, Sastry M. Biocompatibility of gold nanoparticles and their endocytotic fate inside the cellular compartment: a microscopic overview. Langmuir. 2005 Nov 8; 21 (23): 10644–54.
27. Schwartz JA, Shetty AM, Price RE, Stafford RJ, Wang JC, Uthamanthil RK et al. Feasibility study of particle-assisted laser ablation of brain tumors in orthotopic canine model. Cancer Res. 2009 Feb 15; 69 (4): 1659–67.
28. Maloney E, Hwang JH. Emerging HIFU applications in cancer therapy. Int J Hyperthermia. 2015; 31 (3): 302–9.
29. Giuntini F, Foglietta F, Marucco AM, Troia A, Dezhkunov NV, Pozzoli A et al. Insight into ultrasound-mediated reactive oxygen species generation by various metal-porphyrin complexes. Free Radic Biol Med. 2018; (121): 190–201.
30. Serpe L, Foglietta F, Canaparo R. Nanosonotechnology: The next challenge in cancer sonodynamic therapy. Nanotechnology Reviews. 2012; 1 (2): 173–82.
31. Cavalli R, Bisazza A, Lembo D. Micro-and nanobubbles: a versatile non-viral platform for gene delivery. Int J Pharm. 2013; 456 (2): 437–45.
32. Canaparo R, Varchi G, Ballestri M, Foglietta F, Sotgiu G, Guerrini A et al. Polymeric nanoparticles enhance the sonodynamic activity of meso-tetrakis (4-sulfonatophenyl) porphyrin in an in vitro neuroblastoma model. Int J Nanomedicine. 2013; (8): 4247–63.
33. Varchi G, Foglietta F, Canaparo R, Ballestri M, Arena F, Sotgiu G et al. Engineered porphyrin loaded core-shell nanoparticles for selective sonodynamic anticancer treatment. Nanomedicine 2015; 10 (23): 3483–94.
34. Brazzale C, Canaparo R, Racca L, Foglietta F, Durando G, Fantozzi R et al. Enhanced selective sonosensitizing efficacy of ultrasound-based anticancer treatment by targeted gold nanoparticles. Nanomedicine. 2016; 11 (23): 3053–70.
35. Kripfgans OD, Fowlkes JB, Miller DL Eldevik OP, Carson PL. Acoustic droplet vaporization for therapeutic and diagnostic applications. Ultrasound Med Biol. 2000; 6 (7): 1177–89.
36. Prato M, Magnetto C, Jose J, Khadjavi A, Cavallo F, Quaglino E et al. 2H, 3H-decafluoropentane-based nanodroplets: new perspectives for oxygen delivery to hypoxic cutaneous tissues. PLoS One. 2015; 10 (3): e0119769.
37. Basilico N, Magnetto C, D'Alessandro S, Panariti A, Rivolta I, Genova T et al. Dextran-shelled oxygen-loaded nanodroplets reestablish a normoxia-like pro-angiogenic phenotype and behavior in hypoxic human dermal microvascular endothelium, Toxicol Appl Pharmacol. 2015; 288 (3): 330–8.
38. Cavalli R, Bisazza A, Rolfo A, Balbis S, Madonnaripa D, Caniggia I et al. Ultrasound-mediated oxygen delivery from chitosan nanobubbles. Int J Pharm. 2009; 378 (1–2): 215–7.
39. Khadjavi A, Magnetto C, Panariti A, Argenziano M, Gulino GR, Rivolta I et al. Chitosan-shelled oxygen-loaded nanodroplets abrogate hypoxia dysregulation of human keratinocyte gelatinases and inhibitors: new insights for chronic wound healing. Toxicol Appl Pharmacol. 2015; 286 (3): 198–206.
40. Banche G, Prato M, Magnetto C, Allizond V, Giribaldi G, Argenziano M et al. Antimicrobial chitosan nanodroplets: new insights for ultrasound-mediated adjuvant treatment of skin infection. Future Microbiol. 2015; 10 (6): 929–39.
41. Argenziano M, Banche G, Luganini A, Finesso N, Allizond V, Gulino GR et al. Vancomycin-loaded nanobubbles: A new platform for controlled antibiotic delivery against methicillin-resistant Staphylococcus aureus infections. Int J Pharm. 2017; 523 (1): 176–88.
42. Bisazza A, Civra A, Donalisio M, Lembo D, Cavalli R. The in vitro characterization of dextran-based nanobubbles as possible DNA transfection agents. Soft Matter. 2011; 7 (22): 10590–3.
43. Cavalli R, Bisazza A, Trotta M, Argenziano M, Civra A, Donalisio M et al. New chitosan nanobubbles for ultrasound-mediated gene delivery: preparation and in vitro characterization. Int J Nanomedicine. 2012; (7): 3309–18.
44. Cavalli R, Occhipinti S, Argenziano M, Bessone F, Guiot C, Giovarelli M. Nanobubble technology-based HER2 immunotherapy through dendritic cells targeting. Presented at "CRS Annual Meeting & Exposition", July 16–19 2017; Boston, Massachusetts, USA.
45. Cavalli R, Argenziano M, Vigna E, Giustetto P, Torres E, Aime S et al. Preparation and in vitro characterization of chitosan nanobubbles as theranostic agents. Colloids Surf B Biointerfaces. 2015; (129): 39–46.
46. Marano F, Argenziano M, Frairia R, Adamini A, Bosco O, Rinella L et al. Doxorubicin-loaded nanobubbles combined with extracorporeal shock waves: basis for a new drug delivery tool in anaplastic thyroid cancer. Thyroid. 2016; 26 (5): 705–16.
47. Marano F, Frairia R, Rinella L, Argenziano M, Bussolati B, Grange C et al. Combining doxorubicin-nanobubbles and shockwaves for anaplastic thyroid cancer treatment: preclinical study in a xenograft mouse model. Endocr Relat Cancer. 2017; 24 (6): 275–86.

48. Marano F, Rinella L, Argenziano M, Cavalli R, Sassi F, D'Amelio P et al. Targeting Taxanes to Castration-Resistant Prostate Cancer Cells by Nanobubbles and Extracorporeal Shock Waves. PloS One. 2016; 11 (12): e0168553.
49. Roberta C, Francesca M, Monica A, Alessandra V, Roberto F, Maria Graziella C. Combining Drug-Loaded Nanobubbles and Extracorporeal Shock Waves for Difficult-to-Treat Cancers. Current Drug Delivery. 2017; (14): 1–3.
50. Glazer ES, Curley SA. The ongoing history of thermal therapy for cancer. Surg Oncol Clin N Am. 2011; 20 (2): 229–35.
51. Kosiorek A, Kandulski W, Glaczynska H, Giersig M. Fabrication of nanoscale rings, dots, and rods by combining shadow nanosphere lithography and annealed polystyrene nanosphere masks. Small. 2005; (1): 439–44.
52. Barrera G, Serpe L, Celegato F, Coïsson M, Martina K, Canaparo R et al. Surface modification and cellular uptake evaluation of Au-coated Ni80Fe20 nanodiscs for biomedical applications. Interface Focus. 2016; 6 (6). DOI: 10.1098/rsfs.2016.0052.

ОПРЕДЕЛЕНИЕ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА В БИОЛОГИЧЕСКИХ ЖИДКОСТЯХ С ПОМОЩЬЮ ПЛАТИНОВОГО НАНОЭЛЕКТРОДА АМПЕРОМЕТРИЧЕСКИМ МЕТОДОМ

А. Н. Ванеев[1]✉, А. В. Алова[1], А. С. Ерофеев[1,2], П. В. Горелкин[3], А. Д. Алексашкин[1], О. В. Безнос[4], Н. Б. Чеснокова[4], О. А. Кост[1], А. Г. Мажуга[1,2,5], Ю. Е. Корчев[6,7], Н. Л. Клячко[1]

[1] Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова, Москва
[2] Национальный исследовательский технологический университет «МИСИС», Москва
[3] ООО «Медицинские нанотехнологии», Москва
[4] Научно-исследовательский институт глазных болезней, Москва
[5] Российский химико-технологический университет имени Д. И. Менделеева, Москва
[6] Департамент медицины, Имперский колледж Лондона, Лондон
[7] Институт наноиндустрии WPI (WPI-NanoLSI), Университет Канадзава, Канадзава

Активные формы кислорода (АФК) являются жизненно необходимыми метаболитами в многочисленных биологических функциях. Нарушение клеточных механизмов может привести к перепроизводству АФК и вызвать окислительное повреждение ДНК, белков, клеток и тканей, которое связано с патогенезом ряда нейродегенеративных и воспалительных заболеваний. Понимание взаимосвязи между уровнем АФК и этими нарушениями важно при разработке методов лечения для борьбы с окислительным стрессом. Целью работы было использование разработанного нами метода определения АФК в биологических жидкостях, а именно в слезе и внутриглазной жидкости, с помощью стабильного платинового наноэлектрода, позволяющего оценивать уровень пероксида водорода (H_2O_2) вплоть до 1 мкМ, а также изучение динамики изменения уровня H_2O_2 при антиоксидантной терапии. Показано влияние наночастиц супероксиддисмутазы (СОД) на уровень АФК в биологических жидкостях. После закапывания наночастиц СОД происходило увеличение уровня H_2O_2 в слезе через 10 и 30 мин. В случае с внутриглазной жидкостью рост концентрации H_2O_2 начинается только спустя 30 мин после закапывания, что свидетельствует о постепенном проникновении наночастиц во внутренние структуры глаза. Использование метода представляется эффективным для диагностики и контроля лечения глазных заболеваний.

Ключевые слова: антиоксидантная активность, платиновый наноэлектрод, активные формы кислорода, наносенсор, наночастицы супероксиддисмутазы, окислительный стресс

Финансирование: работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках Соглашения №14.575.21.0147 (Уникальный идентификатор проекта RFMEFI57517X0147).

✉ **Для корреспонденции:** Александр Николаевич Ванеев
Ленинские горы, д. 1, стр. 11Б, г. Москва, 119991; vaneev.aleksandr@gmail.com

Статья получена: 28.06.2018 **Статья принята к печати:** 25.07.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.045

DETECTING REACTIVE OXYGEN SPECIES IN BIOLOGICAL FLUIDS BY PLATINUM NANOELECTRODE APPLYING AMPEROMETRIC METHOD

Vaneev AN[1]✉, Alova AV[1], Erofeev AS[1,2], Gorelkin PV[3], Aleksashkin AD[1], Beznos OV[4], Chesnokova NB[4], Kost OA[1], Majouga AM[1,2,5], Korchev Y[6,7], Klyachko NL[1]

[1] Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia
[2] National University of Science and Technology «MISIS», Moscow, Russia
[3] Medical Nanotechnology LLC, Moscow, Russia
[4] Helmholtz Institute of Ophthalmology, Moscow, Russia
[5] Dmitry Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia
[6] Department of Medicine, Imperial College London, London, United Kingdom
[7] WPI Nano Life Science Institute (WPI-NanoLSI), Kanazawa University, Kanazawa, Japan

Reactive oxygen species (ROS) are vital metabolites in numerous biological functions. Disorders of cellular mechanisms can cause overproduction of ROS and, subsequently, oxidative damage to DNA, proteins, cells and tissues, which is associated with the pathogenesis of a number of neurodegenerative and inflammatory diseases. Development of highly sensitive, relatively simple and fast-to-implement innovative methods to detect oxidative stress requires understanding of how such disorders relate to the level of ROS. This research aimed to apply the biological fluids' ROS detection method we have developed (using the stable platinum nanoelectrode that allows assessing the level of hydrogen peroxide (H_2O_2) down to 1 μM) and determine the level of H_2O_2 in lacrimal and intraocular fluids of rabbits, as well as to investigate how the level of H_2O_2 changes under the influence of antioxidant therapy. The effect superoxide dismutase (SOD) nanoparticles produce on biological fluids' ROS level was shown. The level of H_2O_2 in lacrimal fluid increased 10 and 30 min after instillation of SOD nanoparticles. As for the intraocular fluid, H_2O_2 concentration starts to grow only 30 min after instillation of SOD nanoparticles, which suggests that the they penetrate the internal structures of the eye gradually. The method seems to be of value in the context of eye diseases diagnosing and treatment.

Keywords: antioxidant activity, platinum nanoelectrode, reactive oxygen species, nanosensor, superoxide dismutase nanoparticles, oxidative stress

Funding: the study was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation in the context of the Agreement #14.575.21.0147 (project code RFMEFI57517X0147).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexander N. Vaneev
Leninskie Gory 1, bl. 11B, Moscow, 119991; vaneev.aleksandr@gmail.com

Received: 28.06.2018 **Accepted:** 25.07.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.045

Окислительный стресс в тканях сопровождается чрезмерным образованием активных форм кислорода (АФК) и истощением эндогенных запасов антиоксидантов [1]. В ходе эндогенных метаболических реакций аэробные клетки продуцируют АФК, такие как супероксид-анион ($\bullet O_2^-$), пероксид водорода (H_2O_2), гидроксильный радикал ($\bullet OH$) [2]. Одним из наиболее уязвимых мест в организме являются органы зрения [3]. Ткани глаза достаточно долго находятся под действием света, что приводит к постоянному фотоинициированию радикальных процессов, ведущих к повреждению клеток, к перекисному окислению липидов мембран, к окислительной модификации белков, окислительному повреждению ДНК [4]. С окислительным стрессом связано много глазных патологий: катаракта [5], увеит [6], ретинопатия [7], воспаление роговицы [8]. Все АФК являются окислителями клеточных компонентов и по большей части приводят к необратимым повреждениям клеток. Концентрация АФК в организме контролируется антиоксидантными ферментами (супероксиддисмутазой (СОД), каталазой) и низкомолекулярными антиоксидантами (витаминами А, С, Е, и т. д.) [9].

Получение информации об антиоксидантном профиле слезной и внутриглазной жидкостей, таким образом, представляется важной задачей. Основная проблема современных методов измерения уровня АФК в слезной жидкости в том, что они низкочувствительны, а измерение уровня АФК в большинстве случаев производится непрямыми методами [10]. Существуют также ограничения при необходимости получения объема слезной жидкости у лабораторных животных, поэтому большинство аналитических методов не подходит для решения данной проблемы [11, 12].

Таким образом, для изучения антиоксидантной составляющей слезной и внутриглазной жидкостей необходимы специальные высокоэффективные чувствительные методы, позволяющие определять уровень АФК в небольших объемах и в достаточно малых концентрациях, что важно для диагностики и профилактики глазных заболеваний [13].

Для определения антиоксидантной активности слезной жидкости чаще используют хемолюминесцентные и спектрофотометрические методы [14, 15], в которых с помощью модельных систем можно генерировать АФК и по ингибированию или торможению модельных реакций спектрофотометрически оценивать антиоксидантный уровень в образце. Недостатком таких систем, во-первых, является pH среды, отличающийся от физиологических условий, во-вторых, большинство методов измерения уровня АФК непрямые, что накладывает ряд ограничений и снижает достоверность полученных данных.

Активация свободнорадикальных процессов служит одной из причин новообразования сосудов при воспалительных процессах. Окислительный стресс, таким образом, является важным звеном в патогенезе воспалительных процессов. Основными причинами развития воспаления могут быть инфекции, системные аутоиммунные заболевания, травматические повреждения глаз, ожоги, гормональный дисбаланс и нарушение метаболизма [16, 17]. Так, воспаление сосудистой оболочки глаза, или увеит, часто затрагивает и другие структуры этого органа, приводя к различным проблемам со зрением [18]. Пусковым механизмом для развития нарушения является сенсибилизация тканей глаза инфекционным или иным антигеном с дальнейшим проникновением нейтрофилов к очагу патологического процесса. Нейтрофилы уничтожают микроорганизмы, вырабатывая АФК за счет НАДФ•Н-оксидазы. В условиях воспаления, независимо от этиологии заболевания, основными источниками АФК помимо нейтрофилов являются и макрофаги [19]. Поэтому для лечения воспалительных процессов наряду с противовоспалительными препаратами целесообразно применение антиоксидантов. Основная роль в развитии осложнений при воспалительных глазных процессах принадлежит активации реакций свободнорадикального окисления и накоплению АФК [3].

Перспективным подходом в данном случае представляется использование наночастиц в качестве систем доставки, так как они способны значительно увеличивать биодоступность лекарственного препарата [20]. Так, наночастицы СОД на основе блок-иономерных комплексов нетоксичны, неиммуногенны и биосовместимы. Антиоксидантные ферменты обладают наибольшей эффективностью по сравнению с низкомолекулярными антиоксидантами в связи с повторной многократной реакцией с субстратом. Основное преимущество наночастиц СОД в том, что они обладают большим временем циркуляции в тканях глаза по сравнению с нативным ферментом. В экспериментах *in vivo* было показано, что наночастицы СОД весьма эффективны при лечении иммуногенного увеита и химического ожога глаза [21].

Целью данной работы было определение АФК в слезной и внутриглазной жидкостях кроликов амперометрическим методом с использованием платинового наноэлектрода, а также исследование влияния наночастиц СОД на динамику концентрации АФК в слезной и внутриглазной жидкостях интактных кроликов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Наночастицы СОД получали по методике, описанной в работе [22]. Суть методики заключается в самопроизвольной послойной самосборке противоположно заряженных полиионов, приводящей к стехиометрическим комплексам со 100%-й эффективностью загрузки. Для этого к раствору СОД в 0,01 М фосфатном буфере PBS (pH = 7,4) (Ферментные технологии; Россия), преимущественно отрицательно заряженной в физиологических условиях, добавляли протамин (Sigma; США), положительно заряженный при pH = 7,4, далее добавляли отрицательно заряженный блок-сополимер полиэтиленгликоля и поли-L-глутаминовой кислоты (Alamanda Polymers; США), с последующей сшивкой с помощью глутарового альдегида (Sigma; США).

Объектами исследования были образцы слезной и внутриглазной жидкостей кроликов, предоставленные сотрудниками Института глазных болезней им. Гельмгольца. В эксперименте было задействовано 25 кроликов породы шиншилла массой 2,0–2,5 кг. Содержание и уход соответствовали «Санитарным правилам по содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденным МЗ СССР 6 июля 1973 г. и приказа МЗ СССР № 755 от 12 августа 1977 г. Все процедуры по рутинному уходу за животными выполняли в соответствии с СОП лаборатории. Животных содержали при 18–26 °С в комнатах с 12-часовым циклом освещения, относительной влажностью 30–70%, 100% вентилированием без рециркуляции со сменой воздуха 7–12 объемов комнаты в час, по одному в клетках, укомплектованных поильниками и кормушками. Кролики получали «Комбикорм гранулированный для кроликов универсальный» (Провими-Волосово; Ленинградская обл.).

Лабораторные животные до начала исследования содержались 14 дней для адаптации. Во время этого периода у животных контролировали признаки отклонения от нормального состояния здоровья. Перед формированием групп проводился подробный осмотр. Каждому животному был присвоен индивидуальный номер. В экспериментальные группы случайным образом были отобраны животные без внешних отклонений.

В данном исследовании в качестве тест-системы использовали кроликов линии серая шиншилла. Ее представителей наиболее часто используют для фармакологических исследований действия лекарственных веществ на ткани глаза.

Выбор данного вида лабораторных животных обусловлен крупным размером глаз, обеспечивающим удобство оценки клинических проявлений заболевания, и возможностью отбора достаточного количества влаги передней камеры глаза.

Работа с экспериментальными животными проведена в соответствии с приказом министерства Здравоохранения № 755 от 12 августа 1977 г. и положениями Хельсинской декларации. Все процедуры с животными одобрены локальным этическим комитетом ФГБУ МНИИ ГБ им. Гельмгольца Минздрава России.

Всем кроликам одновременно закапывали по 30 мкл раствора наночастиц (2 мг/мл) в один глаз, другой глаз — контроль. Далее с промежутками 10, 30, 60, 120 мин отбирали слезную и внутриглазную жидкости.

Образцы слезной жидкости были получены с помощью нескольких кружков фильтровальной бумаги диаметром 5 мм. Кружки помещали в нижний свод конъюнктивального мешка на 5 мин, затем вынимали и помещали в 300 мкл раствора PBS на 20 мин. Элюат центрифугировали в течение 10 мин при 4000 об./мин на центрифуге (Labsystems; Финляндия) и надосадочную жидкость использовали непосредственно для измерений.

Забор внутриглазной жидкости осуществляли путем прокола роговицы в районе лимба (парацентез). После осуществления забора животному проводили эвтаназию с помощью воздушной эмболии.

Определение уровня АФК осуществляли амперометрическим методом. Для этого в образцах биологических жидкостей использовали углеродные наноэлектроды, покрытые платиной, и хлорсеребряный электрод сравнения.

Регистрацию разности потенциалов между платиновым микроэлектродом и электродом сравнения осуществляли patch-clamp усилителем Model 2400 (A-M Systems; США). Передачу и запись измерений на компьютер проводили с помощью АЦП–ЦАП преобразователя USB-6211 (National instruments; США) и программы WinWCP. Для подведения наносенсора использовали микроманипулятор PatchStar (Scientifica; Великобритания). Все манипуляции проводили на столике инвертированного микроскопа (Nikon; Япония).

Концентрацию АФК, а именно концентрацию H_2O_2, оценивали при потенциале +800 мВ относительно хлорсеребряного электрода [23]. При данных условиях протекает реакция $2H_2O_2 \leftrightarrow {}_2H_2O + O_2$, которая катализируется платиной; поскольку супероксид-радикал довольно быстро превращается в растворе в пероксид водорода, то суммарная концентрация H_2O_2 определяет общий фон окислительных процессов [24]. Уровень кислорода оценивали при потенциале –800 мВ.

Для изготовления платиновых электродов использовали кварцевые заготовки с внутренним и внешним диаметрами 0,9 мм и 1,2 мм соответственно (рис. 1). Заготовки вытягивали на лазерном пуллере (Sutter; США), в результате чего получали два нанокапилляра с диаметром отверстия 100–500 нм. На полученные нанокапилляры осаждали пиролитический углерод посредством термического разложения бутана в бескислородной среде.

Нанокапилляр заполняли бутаном через резиновую трубку, плотно прилегающую к широкому концу кварцевого нанокапилляра. Затем острый конец нанокапилляра вводили в аналогичную кварцевую заготовку соответствующего размера. Через эту заготовку осуществляли подачу ламинарного потока аргона. Далее поступательным движением от острого конца нанокапилляра производили термическую обработку с помощью бутан-пропановой горелки на расстояние 1 см в течение 15 с.

Мы использовали электрохимический метод создания полостей в углеродных наноэлектродах с последующим осаждением платины [25–27]. В растворе, содержащем 0,1 мМ NaOH и 10 мМ KCl, осуществляли травление электрода. Наноэлектрод и электрод сравнения погружали в раствор; на электрод сравнения подавали переменное напряжение симметричной V-образной формы с амплитудой 1,5–2 В. Возрастание амплитуды регистрируемого сигнала свидетельствовало об увеличении тока, протекающего через наноэлектрод, и, соответственно, увеличении площади поверхности углерода в кончике кварцевой трубки. В момент достижения достаточной амплитуды сигнала травление останавливали.

После протравливания в растворе 0.1 М KCl /10 мМ NaOH обработанные заготовки переносили в 2 мМ раствор гексахлорплатиновой кислоты (H_2PtCl_6) для дальнейшего электрохимического осаждения платины на кончике капилляра, подавали на электрод сравнения потенциал симметричной пилообразной формы с амплитудой 0,8 В. Различия циклических вольтамперограмм наноэлектрода в ферроценметаноле в области отрицательных потенциалов до и после осаждения платины свидетельствуют об успешном осаждении платины на электрод (рис. 2А).

Полученные вольт-амперные характеристики были обработаны с помощью программы OriginPro 8 (OriginLab; 2018). Были получены средние значения тока при +800 мВ (пропорционален концентрации H_2O_2) относительно уровня тока при нулевом потенциале.

С использованием платинового электрода производили измерения уровня H_2O_2 в полученных образцах слезной

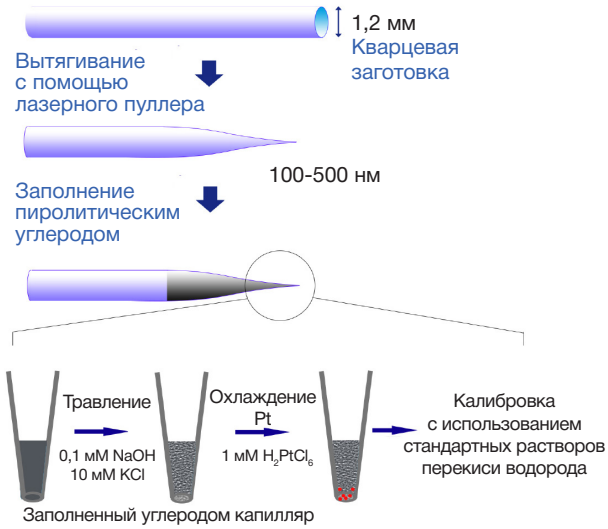


Рис. 1. Схема изготовления платиновых электродов

и внутриглазной жидкостей, погружая электрод и электрод сравнения в емкость с образцом. Фотография наноэлектродов представлена на рис. 2Б.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Перед измерениями каждый платиновый электрод калибровали с использованием ряда стандартных растворов H_2O_2, строили калибровочную кривую, по которой определяли уровень H_2O_2 в образцах (рис. 2В)

Согласно калибровке, чем выше значение тока, тем больше концентрация H_2O_2 в образце. В левый глаз производили закапывание наночастиц СОД, в правый глаз в качестве контроля закапывали 0,01 М буфер PBS (pH = 7,4). Данные представлены для каждого кролика для 5 интервалов времени: до закапывания (контроль) и спустя 10, 30, 60 и 120 мин после последнего закапывания. Наблюдается некоторая вариативность в пределах одной временной группы в виду индивидуальных особенностей каждого подопытного кролика. Для всех животных характерно уменьшение уровня H_2O_2 с увеличением интервала времени, прошедшего после закапывания наночастиц.

Для визуализации динамики во времени ввиду значительной вариабельности параметров среди подопытных животных для каждого кролика были рассчитаны разностные значения уровня H_2O_2 для образцов слезной жидкости из глаза, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали буфер. Полученные данные были усреднены и представлены для 5 кроликов в виде средних значений со стандартными ошибками (рис. 3). Показатели свидетельствует о том, что в первые 30 мин после окончания введения лекарства наблюдается увеличение уровня H_2O_2 в глазу, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали PBS. Затем уровень АФК в обоих глазах становится примерно одинаковым.

Далее были измерены ионные токи для образцов внутриглазной жидкости. В левый глаз производили закапывание наночастиц СОД, в правый глаз в качестве контроля закапывали 0,01 М буфер PBS (pH = 7,4). После закапывания препарата наблюдали повышение уровня H_2O_2 во внутриглазной жидкости подопытных животных. С течением времени после воздействия наночастиц значительно увеличивалась вариативность исследуемого параметра в пределах одной временной группы. Полученные разностные данные были усреднены и представлены для 5 кроликов в виде средних значений со стандартными ошибками (рис. 4). Спустя 10 мин после окончания введения лекарства каких-либо достоверных отличий с контролем не наблюдали, однако через 30 мин начиналось увеличение уровня H_2O_2 в глазу, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали PBS.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Увеличение H_2O_2 в образцах слезной и внутриглазной жидкостей обусловлено действием СОД, катализирующей реакцию $2O_2^- + 2H_3O^+ \leftrightarrow O_2 + H_2O_2 + 2H_2O$.

Увеличение уровня H_2O_2 через 10 и 30 мин после начала закапывания и возвращение к исходному уровню спустя 1 ч в образцах слезной жидкости (куполообразный график) отличаются от динамики уровня АФК во внутриглазной жидкости, для которой характерен рост концентрации H_2O_2 только через 30 мин после добавления лекарства. Проникновение СОД во внутриглазную жидкость затруднено, поэтому наблюдается латентный период, длящийся около 30 мин.

При увеличении концентрации СОД в слезной жидкости концентрация супероксид-радикалов значительно снижается, при этом увеличивается концентрация H_2O_2 (рис. 3).

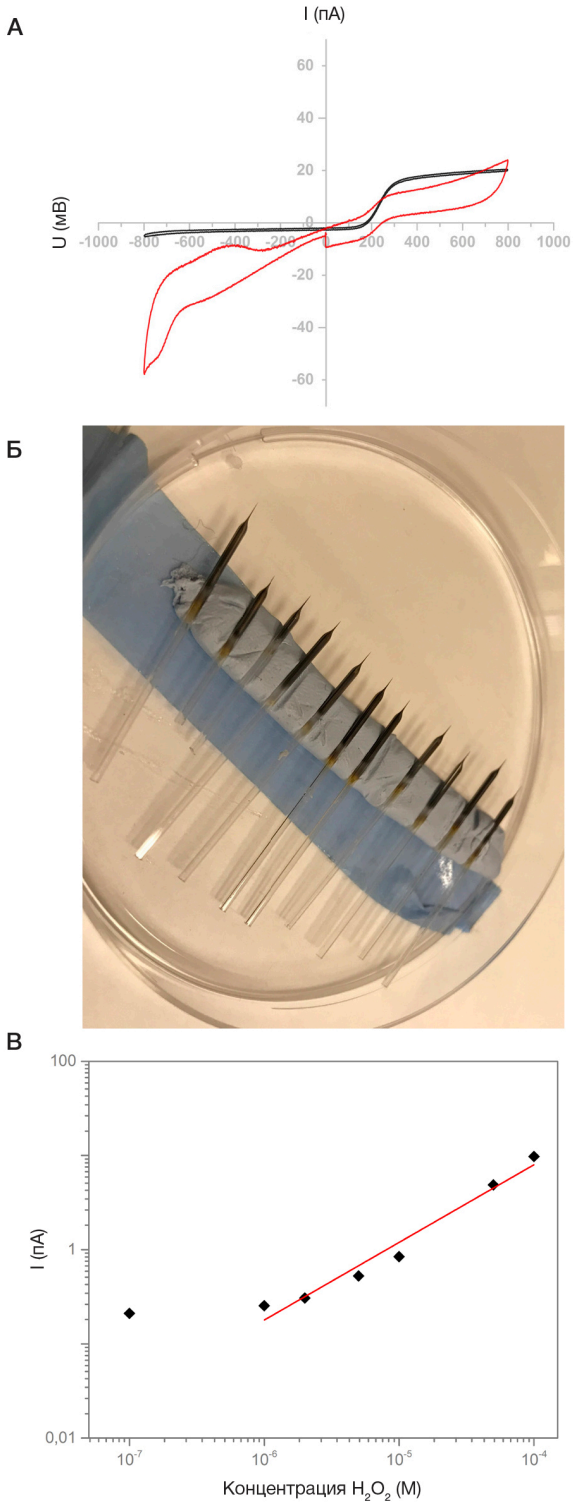


Рис. 2. А. Вольтамперные характеристики для наноэлектрода относительно Ag/AgCl (1 В/с). Циклические вольтамперограммы измерены в 1 мМ растворе ферроцен метанола. *Черным* показана вольтамперная характеристика для углеродного наноэлектрода, *красным* — после осаждения платины. **Б**. Фотография изготовленных наноэлектродов. **В**. Калибровочная прямая платинового электрода, используемого для определения концентрации H_2O_2 в образцах слезной и внутриглазной жидкостей

Максимальное увеличение концентрации H_2O_2 возникает через 30 мин, что свидетельствует о сдвиге равновесия реакции дисмутации супероксид-радикала в сторону образования H_2O_2. Концентрация H_2O_2 через 1 ч возвращается к исходному уровню вследствие двух совместных процессов, протекающих в слезной жидкости: во-первых, концентрация наночастиц СОД спустя 1 ч значительно сокращается из-за вымывания с поверхности глаза, и снижается скорость образования H_2O_2; во-вторых, под воздействием антиоксидантной системы, присутствующей в слезной жидкости, протекают процессы разложения H_2O_2 до воды и кислорода.

Стоит отметить еще раз, что время жизни супероксид-радикалов из-за их реакционной способности достаточно мало и составляет около 10^{-6} с. Будучи нуклеофильным соединением, O_2^- способен окислять липопротеины и фосфолипиды мембран, что приводит к разрушению клеток [28]. Помимо дисмутации супероксид-радикала с образованием H_2O_2, супероксид-радикал участвует в реакции Габера–Вайсса ($O_2^- + H_2O_2 \leftrightarrow OH^- + OH\bullet + {}^1O_2$). Поэтому сразу после отбора слезной жидкости генерация супероксид-радикалов в образце невозможна, поэтому все измерения основаны на изменении концентрации относительно устойчивой в физиологических условиях H_2O_2.

В слезной жидкости достаточная концентрация препарата достигается сразу после закапывания, а во внутриглазную наночастицы поступают с задержкой, поэтому увеличение концентрации H_2O_2 тоже происходит с небольшой задержкой.

Влияние местного применения обычных лекарств сильно затруднено защитными физиологическими барьерами глаза, которые эффективно уменьшают концентрацию препарата в месте введения [29]. Стабильность фермента, поглощенного клетками в форме наночастиц, значительно возрастает, по-видимому, из-за стабилизации молекулы фермента против метаболической деградации и / или лизосомного разрушения, благодаря чему увеличивается время циркуляции в области глазных тканей, по сравнению с нативным ферментом [30].

В дальнейшем существует возможность измерения уровня H_2O_2 непосредственно в глазных тканях с помощью наноэлектродов. Поскольку наноэлектроды имеют очень малый размер (100–500 нм), с их помощью можно проникнуть как в изолированные клетки, так и в область глазных тканей для измерения в режиме реального времени.

ВЫВОДЫ

Исследования с помощью платинового наноэлектрода могут иметь диагностическое значение в оценке протекания глазных патологий, связанных с воспалительными процессами. Оценка уровня H_2O_2 предложенным способом

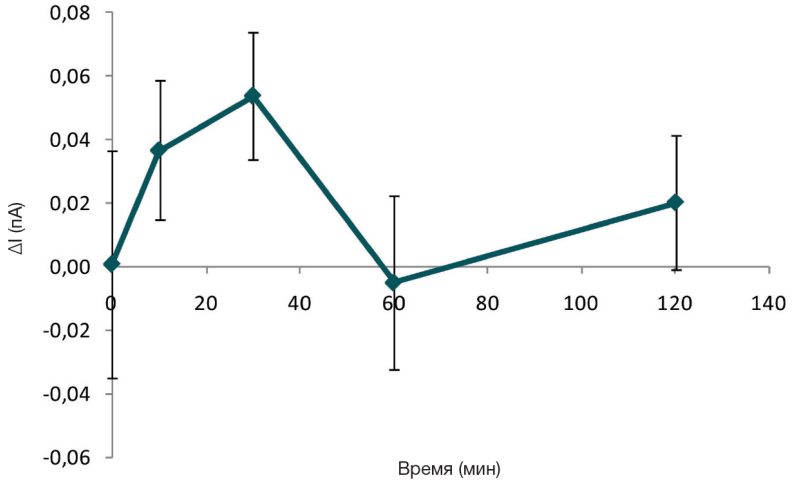


Рис. 3. Кинетика изменений АФК в образцах слезы кроликов после закапывания наночастиц СОД. Представлены усредненные данные для 5 кроликов со стандартными ошибками. Приведены разностные значения уровня АФК ΔI для образцов слезной жидкости из глаза, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали PBS-буфер

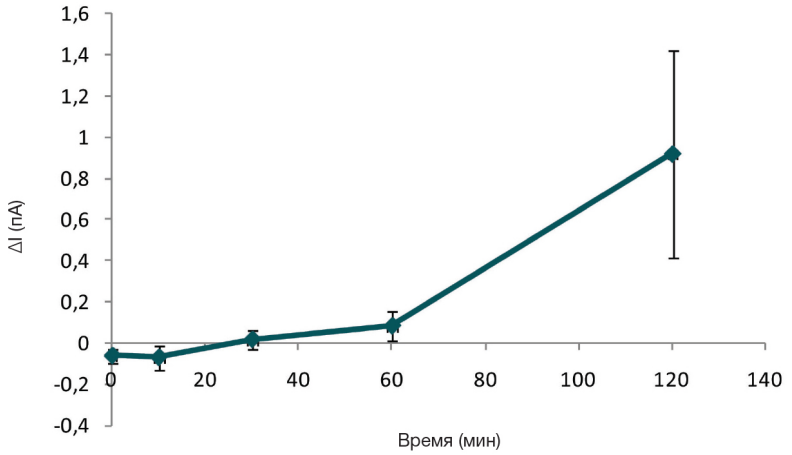


Рис. 4. Кинетика изменений АФК в образцах внутриглазной жидкости кроликов после закапывании наночастиц СОД. Представлены усредненные данные для 5 кроликов со стандартными ошибками. Приведены разностные значения уровня АФК ΔI для образцов слезной жидкости из глаза, в который закапывали наночастицы, по отношению к глазу, в который закапывали PBS-буфер

позволяет обоснованно применять антиоксидантные препараты в лечении воспалений глаза. Технология проста и достаточно чувствительна, а эффективность по стоимости делает ее очень перспективной для биомедицинского применения. В работе показано, как производить чувствительные платиновые наноэлектроды, которые могут быть использованы для определения АФК в биологических жидкостях. Мы пришли к выводу, что этот прямой метод более чувствителен и является перспективным в биологических прикладных исследованиях.

Литература

1. Зенков Н. К, Ланкин В. З, Меньщикова Е. Б. Окислительный стресс: Биохимический и патофизиологический аспекты. М.: Наука/Интерпериодика, 2001; 343 с.
2. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science. 1978; 201 (4359): 875–80.
3. Кравчук Е. Л. Роль свободнорадикального окисления в патогенезе заболеваний глаз. Вестник офтальмологии. 2004; 120 (5): 48–51.
4. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. Front Biosci (Schol Ed). 2011; (3): 52–60.
5. Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of action. The FASEB Journal. 1995; 9 (12): 1173–82.
6. Чеснокова Н. Б., Нероев В. В., Безнос О. В. , Бейшенова Г.А., Никольская И. И., Кост О. А., и др. Окислительный стресс при увеите и его коррекция антиоксидантным ферментом супероксиддисмутазой (экспериментальное исследование). Вестник офтальмологии. 2014; 130 (5): 30–5.
7. Niesman MR, Johnson KA, Penn JS. Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. Neurochemical research. 1997; 22 (5): 597–605.
8. Alio JL, Ayala MJ, Mulet ME, Artola A, Ruiz JM, Bellot J. Antioxidant therapy in the treatment of experimental acute corneal inflammation. Ophthalmic research. 1995; 27 (3): 136–43.
9. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. Journal of pineal research. 2004; 36 (1): 1–9.
10. Гулидова О. В., Любицкий О. Б., Клебанов Г. И., Чеснокова Н. Б. Изменение антиокислительной активности слезной жидкости при экспериментальной ожоговой болезни глаз. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 1999; 128 (11): 571–4.
11. Choy CKM, Benzie IFF, Cho P. Ascorbic acid concentration and total antioxidant activity of human tear fluid measured using the FRASC assay. Investigative ophthalmology & visual science. 2000; 41 (11): 3293–8.
12. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of clinical pathology. 2001; 54 (5): 356–61.
13. Crouch RK, Goletz P, Snyder A, Coles WH. Antioxidant enzymes in human tears. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 1991; 7 (3): 253–8.
14. Грицук А. И. , Сирота Т. В. , Дравица Л. В. , Крэддок Е. А.. Оценка состояния антиоксидантной активности слезной жидкости. Биомедицинская химия. 2006; 52 (6): 601–7.
15. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. The FEBS Journal. 1974; 47 (3): 469–74.
16. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. International journal of molecular sciences. 2011; 12 (5): 3117–32.
17. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radical Biology and Medicine. 2010; 49 (11): 1603–16.
18. Yamada M, Shichi H, Yuasa T, Tanouchi Y, Mimura Y. Superoxide in ocular inflammation: human and experimental uveitis. Journal of free radicals in biology & medicine. 1986; 2 (2): 111–7.
19. Ishimoto S, Wu G-S, Hayashi S, Zhang J, Rao NA. Free radical tissue damages in the anterior segment of the eye in experimental autoimmune uveitis. Investigative ophthalmology & visual science. 1996; 37 (4): 630–6.
20. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. Drug discovery today. 2008; 13 (3–4): 144–51.
21. Kost OA, Beznos O V, Davydova NG, Manickam DS, Nikolskaya II, Guller AE, et al. Superoxide dismutase 1 nanozyme for treatment of eye inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016; 2016 (1): 1–13.
22. Nukolova NV, Aleksashkin AD, Abakumova TO, Morozova AY, Gubskiy IL, Kirzhanova EA, et al. Multilayer polyion complex nanoformulations of superoxide dismutase 1 for acute spinal cord injury. Journal of Controlled Release. 2018; (270): 226–36.
23. Amatore C, Arbault S, Bouton C, Coffi K, Drapier J, Ghandour H, et al. Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization. ChemBioChem. 2006; 7 (4): 653–61.
24. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annual review of pharmacology and toxicology. 1983; 23 (1): 239–57.
25. Clausmeyer J, Actis P, Córdoba AL, Korchev Y, Schuhmann W. Nanosensors for the detection of hydrogen peroxide. Electrochemistry Communications. 2014; (40): 28–30.
26. Actis P, Tokar S, Clausmeyer J, Babakinejad B, Mikhaleva S, Cornut R, et al. Electrochemical nanoprobes for single-cell analysis. Acs Nano. 2014; 8 (1): 875–84.
27. Erofeev A, Gorelkin P, Garanina A, Alova A, Efremova M, Vorobyeva N, et al. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles. Scientific reports. 2018; 8 (1): 7462.
28. Deby C, Boes M, Pincemail J, Bourdon-Neuray J, Deby-Dupont G. Degradation of membrane phospholipids by a direct nucleophilic action of superoxide anion. In: Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids. Springer, 1990; p. 105–13.
29. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. Journal of pharmaceutical sciences. 1998; 87 (12): 1479–88.
30. Manickam DS, Brynskikh AM, Kopanic JL, Sorgen PL, Klyachko NL, Batrakova EV, et al. Well-defined cross-linked antioxidant nanozymes for treatment of ischemic brain injury. Journal of controlled release. 2012; 162 (3): 636–45.

References

1. Zenkov NK, Lankin VZ, Men'shchikova EB. Okislitel'nyy stress: Biokhimicheskiy i patofiziologicheskiy aspekty. Moskva: Nauka/Interperiodika, 2001; 343 p.
2. Fridovich I. The biology of oxygen radicals. Science. 1978; 201 (4359): 875–80.
3. Kravchuk EL. Rol' svobodnoradikal'nogo okisleniya v patogeneze zabolevaniy glaz. Vestnik oftal'mologii. 2004; 120 (5): 48–51.
4. Catala A. Lipid peroxidation of membrane phospholipids in the vertebrate retina. Front Biosci (Schol Ed). 2011; (3): 52–60.
5. Spector A. Oxidative stress-induced cataract: mechanism of

action. The FASEB Journal. 1995; 9 (12): 1173–82.
6. Chesnokova NB, Neroev VV, Beznos OV, Beyshenova GA, Nikol'skaya II, Kost OA, et al. Okislitel'nyy stress pri uveite i ego korrektsiya antioksidantnym fermentom superoksiddismutazoy (eksperimental'noe issledovanie). Vestnik oftal'mologii. 2014; 130 (5): 30–5.
7. Niesman MR, Johnson KA, Penn JS. Therapeutic effect of liposomal superoxide dismutase in an animal model of retinopathy of prematurity. Neurochemical research. 1997; 22 (5): 597–605.
8. Alio JL, Ayala MJ, Mulet ME, Artola A, Ruiz JM, Bellot J. Antioxidant therapy in the treatment of experimental acute corneal inflammation. Ophthalmic research. 1995; 27 (3): 136–43.
9. Rodriguez C, Mayo JC, Sainz RM, Antolin I, Herrera F, Martin V, et al. Regulation of antioxidant enzymes: a significant role for melatonin. Journal of pineal research. 2004; 36 (1): 1–9.
10. Gulidova OV, Lyubitskiy OB, Klebanov GI, Chesnokova NB. Izmenenie antiokislitel'noy aktivnosti sleznoy zhidkosti pri eksperimental'noy ozhogovoy bolezni glaz. Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny. 1999; 128 (11): 571–4.
11. Choy CKM, Benzie IFF, Cho P. Ascorbic acid concentration and total antioxidant activity of human tear fluid measured using the FRASC assay. Investigative ophthalmology & visual science. 2000; 41 (11): 3293–8.
12. Koracevic D, Koracevic G, Djordjevic V, Andrejevic S, Cosic V. Method for the measurement of antioxidant activity in human fluids. Journal of clinical pathology. 2001; 54 (5): 356–61.
13. Crouch RK, Goletz P, Snyder A, Coles WH. Antioxidant enzymes in human tears. Journal of Ocular Pharmacology and Therapeutics. 1991; 7 (3): 253–8.
14. Gritsuk AI, Sirota TV, Dravitsa LV, Kreddok EA. Otsenka sostoyaniya antioksidantnoy aktivnosti sleznoy zhidkosti. Biomeditsinskaya khimiya. 2006; 52 (6): 601–7.
15. Marklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. The FEBS Journal. 1974; 47 (3): 469–74.
16. Fernández-Sánchez A, Madrigal-Santillán E, Bautista M, Esquivel-Soto J, Morales-González Á, Esquivel-Chirino C, et al. Inflammation, oxidative stress, and obesity. International journal of molecular sciences. 2011; 12 (5): 3117–32.
17. Reuter S, Gupta SC, Chaturvedi MM, Aggarwal BB. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? Free Radical Biology and Medicine. 2010; 49 (11): 1603–16.
18. Yamada M, Shichi H, Yuasa T, Tanouchi Y, Mimura Y. Superoxide in ocular inflammation: human and experimental uveitis. Journal of free radicals in biology & medicine. 1986; 2 (2): 111–7.
19. Ishimoto S, Wu G-S, Hayashi S, Zhang J, Rao NA. Free radical tissue damages in the anterior segment of the eye in experimental autoimmune uveitis. Investigative ophthalmology & visual science. 1996; 37 (4): 630–6.
20. Sahoo SK, Dilnawaz F, Krishnakumar S. Nanotechnology in ocular drug delivery. Drug discovery today. 2008; 13 (3–4): 144–51.
21. Kost OA, Beznos O V, Davydova NG, Manickam DS, Nikolskaya II, Guller AE, et al. Superoxide dismutase 1 nanozyme for treatment of eye inflammation. Oxidative medicine and cellular longevity. 2016; 2016 (1): 1–13.
22. Nukolova NV, Aleksashkin AD, Abakumova TO, Morozova AY, Gubskiy IL, Kirzhanova EA, et al. Multilayer polyion complex nanoformulations of superoxide dismutase 1 for acute spinal cord injury. Journal of Controlled Release. 2018; (270): 226–36.
23. Amatore C, Arbault S, Bouton C, Coffi K, Drapier J, Ghandour H, et al. Monitoring in real time with a microelectrode the release of reactive oxygen and nitrogen species by a single macrophage stimulated by its membrane mechanical depolarization. ChemBioChem. 2006; 7 (4): 653–61.
24. Fridovich I. Superoxide radical: an endogenous toxicant. Annual review of pharmacology and toxicology. 1983; 23 (1): 239–57.
25. Clausmeyer J, Actis P, Córdoba AL, Korchev Y, Schuhmann W. Nanosensors for the detection of hydrogen peroxide. Electrochemistry Communications. 2014; (40): 28–30.
26. Actis P, Tokar S, Clausmeyer J, Babakinejad B, Mikhaleva S, Cornut R, et al. Electrochemical nanoprobes for single-cell analysis. Acs Nano. 2014; 8 (1): 875–84.
27. Erofeev A, Gorelkin P, Garanina A, Alova A, Efremova M, Vorobyeva N, et al. Novel method for rapid toxicity screening of magnetic nanoparticles. Scientific reports. 2018; 8 (1): 7462.
28. Deby C, Boes M, Pincemail J, Bourdon-Neuray J, Deby-Dupont G. Degradation of membrane phospholipids by a direct nucleophilic action of superoxide anion. In: Free Radicals, Lipoproteins, and Membrane Lipids. Springer, 1990; p. 105–13.
29. Prausnitz MR, Noonan JS. Permeability of cornea, sclera, and conjunctiva: a literature analysis for drug delivery to the eye. Journal of pharmaceutical sciences. 1998; 87 (12): 1479–88.
30. Manickam DS, Brynskikh AM, Kopanic JL, Sorgen PL, Klyachko NL, Batrakova EV, et al. Well-defined cross-linked antioxidant nanozymes for treatment of ischemic brain injury. Journal of controlled release. 2012; 162 (3): 636–45.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ ДЛЯ ТЕРАПИИ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Е. М. Мерзляк[1,2] ✉, Д. С. Сырко[2], Е. А. Мусаткина[2], М. Израельсон[1,2]

[1] Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова Российской академии наук, Москва

[2] Научно-исследовательский институт трансляционной медицины,
Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Москва

В последнее время в терапии аутоиммунных заболеваний стали активно применять моноклональные антитела (МА). Мишенью этих антител служат провоспалительные цитокины и собственно Т- и В-клетки, потенциально участвующие в патогенезе заболевания. В данной статье сделана попытка систематизировать используемые препараты и привести основные механизмы, лежащие в основе такого рода терапии, описаны нежелательные побочные действия. Потенциальными путями и перспективами развития биологиксов в лечении аутоиммунных заболеваний, по нашему мнению, являются МА, которые узнают и элиминируют клоны Т- и В-клеток, обусловливающие патогенез аутоиммунного заболевания. Поиск аутореактивных клонов является одной из сложных и актуальных задач современной биомедицины.

Ключевые слова: аутоиммунные заболевания, биологиксы, терапевтические антитела для лечения аутоиммунных заболеваний, механизм действия моноклональных антител

Финансирование: работа выполнена при поддержке Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60716X0158).

✉ **Для корреспонденции:** Екатерина Марковна Мерзляк
ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10, г. Москва, 117997; ekaterin99@mail.ru

Статья получена: 06.12.2018 **Статья принята к печати:** 20.12.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.094

THE USE OF MONOCLONAL ANTIBODIES IN AUTOIMMUNITY TREATMENT

Merzlyak EM[1,2] ✉, Syrko DS[2], Musatkina EA[2], Israelson MA[1,2]

[1]Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow

[2] Research Institute of Translational Medicine,
Pirogov Russian National Research Medical University, Moscow

Recently, monoclonal antibodies (MA) have gained popularity as therapeutic agents for the treatment of autoimmune disorders. These antibodies target proinflammatory cytokines, as well as T and B cells potentially involved in the pathogenesis of such conditions. In the present work we attempt to give a systematic description of available therapeutic MA, highlight their key mechanisms of action and pinpoint their adverse effects. We believe that MA that are capable of recognizing and eliminating pathogenic T- and B-cell clones hold the most promise for medical application as biologics. Detection and identification of autoreactive lymphocyte clones is one of the most serious challenges of contemporary medicine.

Keywords: autoimmune disorders, biologics, therapeutic antibodies for autoimmunity treatment, mechanism of action of monoclonal antibodies

Funding: this work was supported by the Ministry of Science and Higher Education of the Russian Federation (ID RFMEFI60716X0158).

✉ **Correspondence should be addressed:** Ekaterina M. Merzlyak
Miklouho-Maclay, 16/10, Moscow, 117997; ekaterin99@mail.ru

Received: 06.12.2018 **Accepted:** 20.12.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.094

По мере углубления наших знаний о природе адаптивного иммунитета, формируются представления о тех ключевых точках, в которых может происходить сбой работы иммунной системы, приводящий к развитию аутоиммунных заболеваний. Спектр аутоиммунных расстройств крайне широк и затрагивает практически все ткани организма. Патогенез этих заболеваний обусловлен как появлением аутоиммунных антител, так и размножением эффекторных Т-клонов, узнающих собственные антигены и, как следствие, провоцирующих воспалительные процессы, в отдельном органе или в целой системе. Аутореактивные Т-клоны могут присутствовать в крови и здоровых доноров [1], но находятся в состоянии иммунологической толерантности — анергии, контролируемой регуляторными Т-клетками (Tregs). Нарушение численности Tregs или их функциональной активности наблюдается при многих аутоиммунных заболеваниях и может служить одной из причин развития воспалительных процессов.

На сегодняшний день для лечения аутоиммунных нарушений применяют подходы, которые обеспечивают общую иммуносупрессию за счет препаратов, напрямую или косвенно снижающих воспаление (рис.). В данной работе рассмотрены виды терапии аутоиммунных заболеваний с применением моноклональных антител (МА). В англоязычной литературе такие МА вместе с другими генно-инженерными препаратами для клинических целей получили название «биологиксы». Целый ряд МА эффективно применяют для лечения разных аутоиммунных

заболеваний. Многие препараты еще находятся на стадии клинических испытаний.

Терапевтические МА могут значительно различаться по способу действия. Они могут связываться с растворимым лигандом, ингибируя его активность, или с рецептором на мембране клетки-мишени, блокируя взаимодействие рецептора с лигандом, модулируя поступающий через этот рецептор сигнал или вызывая апоптоз (рис.).

Механизм деплеции целевой популяции клеток с помощью МА различен. Деплеция, обусловленная Fc-фрагментом антитела, может вызывать апоптоз целевой клетки, гибель клетки по механизму антителозависимой или комплементзависимой цитотоксичности (ADCC/CDC), либо антигензависимый фагоцитоз. Принципиально иные механизмы запускаются при блокировке поверхностных костимуляторных рецепторов, что приводит к отсутствию сигнала в ответ на стимуляцию антигеном, либо к «перепрограммированию» эффекторных Т-клеток в Tregs.

Ремиссии при терапии, приводящие к снижению уровня воспалительных цитокинов (IFNɣ, TNF, IL17 и т. п.) или экранированию рецепторов цитокинов, носят временный характер и зависят от скорости выведения терапевтического антитела. Подходы, основанные на деплеции популяции, обогащенной аутореактивными Т-клетками, нам кажутся наиболее перспективными, так как устраняют причину заболевания. Внимания заслуживает также стратегия функциональной активации регуляторных Т-клеток, ведущая к увеличению экспрессии супрессорных цитокинов (IL10).

Общие представления о структуре терапевтических антител и их применении

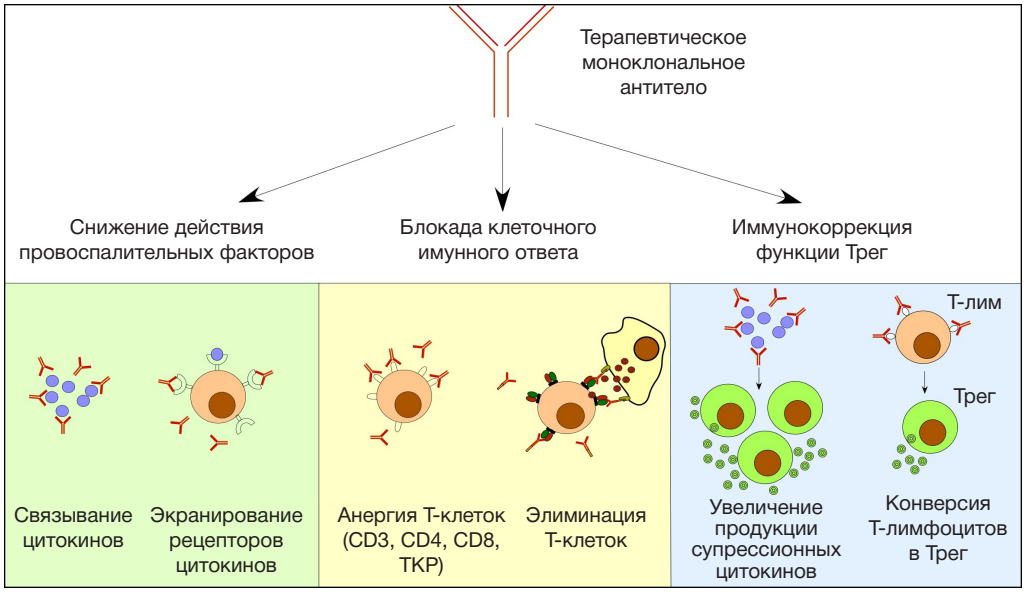
За последние несколько лет значительно расширился список терапевтических антител, относящихся к препаратам, модифицирующим течение заболевания (DMT) и обладающим селективным механизмом действия. Около 40 МА одобрено Управлением по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств США (FDA) для лечения различных заболеваний, в том числе аутоиммунных.

Как правило, первично полученные МА требуют дальнейшей оптимизации. Существуют разные стратегии оптимизации антител: модификация Fc-фрагмента для увеличения времени полужизни антитела, гуманизация (т. е. введение аминокислотных замен, которые делают антитела похожими на человеческие для снижения риска иммунного ответа на вводимый препарат), наработка антител в специализированных клеточных линиях, дефицитных по ферментам гликозилирования для усиления цитотоксических свойств. Так, терапевтические нефукозилированные антитела обладают в 500–1000 раз более высокой цитотоксичной активностью, чем такие же антитела с высокой степенью гликозилирования [2]. В последнее время в литературе обсуждается вопрос об использовании антител с нарушенным Fc-фрагментом, так как при гибели большого количества эффекторных клеток (например, при использовании антител к поверхностным маркерам, которые представлены на широком спектре клеток) наблюдается выброс воспалительных цитокинов, приводящий к проявлению широкого спектра неблагоприятных побочных реакций.

Моноклональные антитела против цитокинов и факторов воспаления

Первыми МА, одобренными FDA для лечения воспалительных заболеваний, в основном аутоиммунных (2002 г.), были препараты, содержащие МА к фактору некроза опухоли (ФНО). За последнее время список терапевтических мишеней пополнился целым рядом цитокинов (такими как IL1, IL6, IL12, IL15, IL17, IL18 и IL23), ассоциированных с патогенезом аутоиммунных заболеваний. Эффективность этих препаратов в отношении различных аутоиммунных заболеваний подробно описана в ряде обзорных работ [3, 4].

ФНО является одним из первых индукторов воспаления в цитокиновом каскаде, поэтому при использовании ингибиторов ФНО можно наблюдать неспецифическое снижение воспалительных реакций у пациентов, страдающих аутоиммунными расстройствами (ревматоидный артрит (РА), анкилозирующий спондилит, псориаз, болезнь Крона и др.). На сегодняшний день доступно четыре препарата МА к ФНО, отличающиеся степенью гуманизации и сайтом посадки МА (инфликсимаб, голимумаб, цертолизумаб, адалимумаб). Данные препараты широко используются



Использование моноклональных антител для терапии аутоиммунных заболеваний

при ревматоидных аутоиммунных заболеваниях, в том числе для лечения пациентов с болезнью Бехтерева. Применение ингибиторов ФНО позволяет замедлить развитие анкилоза, но не предотвратить его. Однако не у всех пациентов можно наблюдать эффективный ответ на анти-ФНО терапию. Так, у трети людей с РА не произошло улучшения состояния, а при рассеянном склерозе терапия блокаторами ФНО оказалась неэффективной.

Использование анти-ФНО МА повышает риск возникновения онкологических и инфекционных заболеваний. На модели экспериментального РА у мышей были получены данные о том, что блокировка ФНО не приводит к снижению уровня IL1, который активно вовлечен в процессы деструкции хрящевой ткани и эрозии суставов [5].

Провоспалительный цитокин IL1 тоже служит мишенью для направленной терапии. Но, на наш взгляд, использование антител против IL1 не может иметь широкого применения, в отличие от анакинра (anakinra) — антагониста IL1-рецептора. Так, препарат гевокизумаб (gevokizumab), МА против IL1β, был признан неэффективным для лечения неинфекционных увеитов при болезни Бехчета. В то же время недавно была проведена III фаза клинических испытаний полностью человеческого МА против IL1β, канакинумаба (IgG1, canakinumab) [6]. В ходе испытаний на терапию ответили менее половины пациентов с РА и ювенильным идиопатическим артритом (ЮИА) [7]. Тем не менее препарат был разрешен FDA для лечения ЮИА, а также некоторых аутовоспалительных синдромов (cryopyrin-associated periodic syndrome (CAPS)). У 97% пациентов с CAPS уже после однократного введения препарата развивалась полная и стойкая ремиссия на фоне незначительных побочных эффектов [8, 9].

Другой эффективной стратегией лечения аутоиммунных заболеваний является блокировка цитокинов, которые вовлечены в активацию или дифференцировку популяций Th1- и Th17-лимфоцитов, ассоциированных с патогенезом многих аутоиммунных болезней. К таким провоспалительным факторам относится IL6, который в совокупности с IL23 и TGFβ запускает дифференцировку наивных $CD4^+$-лимфоцитов в Th17-клетки [10]. В норме Th17-клетки участвуют в иммунном ответе на бактериальные и грибковые инфекции, но чрезмерная активность Th17, которая выражается в виде суперпродукции IL17, GM-CSF, IL21, вызывает воспаление. Нарушение баланса Th17/Treg наблюдается при системной волчанке (systemic lupus erythematosus, SLE), в периферической крови пациентов с РА, в местах воспаления при ЮИА, при диабете 1-го типа и болезни Крона [11, 12].

К одним из эффективных препаратов, блокирующих действие IL6, относится тоцилизумаб (IgG1, tocilizumab). Это моноклональное антитело к β-цепи рецептора IL6, действие которого обусловлено конкурентным связыванием с рецептором и экранированием места посадки IL6. Доказаны его высокая эффективность и безопасность при лечении РА и ЮИА. С такой же эффективностью работает гуманизированное антитело олокизумаб (olokizumab) против самого цитокина IL6, прошедшее в 2017 г. II фазу клинических испытаний, для терапии РА.

Блокировка IL6 как на мышиной модели EAE, так и у пациентов с РА, приводит к увеличению процентной доли Tregs в популяции $CD4^+$-лимфоцитов, что коррелирует с выраженной ремиссией у пациентов и является следствием воздействия препарата тоцилизумаб [13]. Такое действие МА против IL6 связано с тем, что IL6 вызывает метилирование промотора Foxp3, в результате чего снижается функциональная активность Tregs [14]. В норме IL6 играет важную роль в иммунном ответе организма на бактериальные инфекции, кроме того, обладает защитными свойствами при травмах печени и нервной ткани. При долгом приеме МА против IL6 могут возрасти чувствительность организма к бактериальным и вирусным инфекциям, а также риск смертельного исхода у людей с циррозом печени и при инсультах.

Применение МА, блокирующих интерлейкины и их рецепторы, может быть более эффективным, чем лечение метотрексатом или другими иммунодепрессантами, но ассоциировано с рядом нежелательных побочных эффектов (инфекционными заболеваниями, фарингитами и др.). Описанные выше препараты снимают симптомы заболевания, в некоторых случаях значительно замедляют его развитие, однако не устраняют причину возникновения болезни и приводят лишь к временной ремиссии.

Блокада клеточного ответа

Ингибирование аутоиммунной реакции на клеточном уровне осуществляется с помощью МА, специфично узнающих уникальные рецепторы, выделяющие определенные клеточные популяции (CD2, CD3, CD4, CD8, CD19, CD20, CD22). Данная стратегия, однако, ведет к ингибированию целой популяции лимфоцитов, затрагивая в большой степени нормально функционирующий клеточный компартмент, и приводит к значительной иммуносупрессии.

CD3

Использование МА против CD3, в модельных мышиных системах аутоиммунных заболеваний, таких как аутоиммунный энцефалит, TNP-KLH-индуцированный колит, коллаген-индуцированный артрит, показало хорошие результаты. Для объяснения появления терапевтического эффекта МА против CD3 было предложено несколько не противоречащих друг другу механизмов. МА анти-CD3 связывает ξ-субъединицу CD3, после чего CD3-комплекс интернализуется или экранируется. В результате Т-клетка временно перестает отвечать на представляемые ей антигены. Было также показано, что это антитело вызывает апоптоз активированных Т-клеток [15].

Применение таких МА, как теплизумаб (teplizumab) и отеликсизумаб (ChAglyCD3, otelixizumab), способствовало временной приостановке гибели продуцирующих инсулин β-клеток при диабете 1-го типа [16]. Проходит III фаза клинических испытаний (TrialNet) теплизумаба для профилактики диабета, в которой участвуют более 500 человек со 2-й стадией диабета.

Недеплецирующие антитела к CD4 и CD8

Недавно появились работы, в которых показано использование недеплецирующих моноклональных антител к корецепторам иммунного ответа CD4 и CD8. Их эффективность была показана в отношении диабета 1-го типа в модельной мышиной системе [17]. В основе действия МА лежит специфичное взаимодействие с поверхностным рецептором лимфоцита, которое препятствует активации иммунного ответа. Отсутствие деплецирующего эффекта связано с тем, что Fc-фрагмент МА не способен связываться с Fc-рецептором реципиента

и, соответственно, оно не вызывает гибели клетки. В описанном эксперименте у мышей, получавших МА, наблюдалась длительная ремиссия (более 200 дней), в течение которой снизилась супер-продукция цитокинов: IL2 и IFNγ.

Анти-CD20

Высокоэффективным в отношении некоторых аутоиммунных заболеваний, например аутоиммунных васкулитов, антифосфолипидного синдрома, миастении, РА, системной волчанки и рассеянного склероза, оказался препарат на основе МА к CD20 ритуксимаб (rituximab, мабтера). Эффект препарата, заключающийся в деплеции В-клеток, длится временно (в среднем 6 месяцев). Терапия ритуксимабом у многих пациентов имела отложенный эффект: ответ мог наблюдаться через несколько месяцев после введения препарата. Предложено несколько объяснений: 1) скорость выведения В-клеток из организма может варьировать от пациента к пациенту; 2) время полужизни плазматической клетки может влиять на скорость ответа, так как она не несет CD20 на поверхности и продолжает секретировать антитела; 3) у некоторых пациентов аутоиммунные антитела могут приводить к патологизации даже в очень низких концентрациях, что может отсрочить ответ на терапию, пока антитела не будут выведены. Эффективность ритуксимаба оценивается как такая же, а в некоторых случаях даже выше, чем эффективность химических иммунодепрессантов (циклофосфамида, азотиоприна и др.). Однако длительная ремиссия наблюдается только у 20% пациентов. В качестве побочных эффектов описаны повышенная чувствительность к различным инфекциям, гипогаммаглобулинемия, нейтрофилопения [18, 19]. Стоит отметить, что препарат назначали при тяжелых формах РА в тех случаях, когда базисная терапия (глюкокортикоидная и цитотоксическая) не давала положительного эффекта. Одно из возможных объяснений действия ритуксимаба при РА может заключаться в том, что помимо деплеции В-клеток элиминируются также $CD20^+$-Th17-эффекторные клетки, процент которых достаточно высок в крови пациентов с РА [20]. Другой механизм действия анти-CD20-терапии заключается в том, что В-клетки также могут активно продуцировать IL6, который приводит к дифференцировке предшественников Т-клеток в Th17 и блокирует созревание предшественников в Treg [21, 22]. Гуманизированное МА анти-CD20 окрелизумаб (ocrelizumab) прошло клинические испытания и одобрено FDA для лечения рассеянного склероза; при его приеме показано значимое снижение очагов поражения и замедление развития заболевания [23].

Иммунокоррекция: «перепрограммирование» Т-лимфоцитов в Tregs

Клетки Treg обеспечивают толерантность на периферии, т. е. «заглушают» иммунный ответ и соответственно останавливают аутоиммунные реакции [24]. Они секретируют ингибирующие воспаление цитокины IL10, TGFβ, IL35, индуцируют гранзим/перфориновый апоптоз эффекторных клеток, ингибируют функции дендритных клеток. С одной стороны, одним из подходов к лечению аутоиммунных заболеваний можно считать увеличение Treg в крови, либо к увеличению суперпродукции супрессионных цитокинов. С другой стороны, высокая активность Treg ведет к супрессии иммунного ответа и способствует злокачественному росту. В 2016 г. опробирован препарат трегализумаб (tregalizumab), недеплецирующее МА, которое связывает уникальный эпитоп на молекуле CD4, в результате чего $CD4^+$-лимфоциты дифференцируются в Treg.

Предпочтительной стратегией при лечении аутоиммунных заболеваний, по нашему мнению, может быть комбинированная терапия, включающая таргетную элиминацию Т- или В-клеточных клонов, ассоциированных с аутоиммунными процессами. Такая терапия может сочетать последовательное применение нескольких биологиксов, воздействующих на различные звенья иммунного ответа. Например, в качестве первой линии было предложено использовать цитокиновые блокаторы или МА, деплецирующие патогенные клеточные популяции, а в качестве второй линии — агенты, блокирующие медиаторы CD28 костимуляции или ингибирующие гомеостатические цитокины [25]. Недавно проведенные исследования показывают, что ингибирование таких гомеостатических цитокинов, как IL15, IL7, может оказаться перспективным подходом к терапии аутоиммунных заболеваний [26].

До настоящего времени не решена проблема идентификации уникальных маркеров аутоиммунного воспаления. Такими маркерами могут служить Т- и В-клеточные рецепторы (ТКР и ВКР) на поверхности аутоиммунных лимфоцитов. Секвенирование репертуаров ТКР и ВКР лимфоцитов периферической крови, а также лимфоцитов, выделенных из области воспаления, и последующий сравнительный анализ репертуаров здоровых и больных доноров — это пути к решению задачи по поиску сцепленных с заболеванием иммунных рецепторов. На сегодняшний день удалось установить структуру потенциально аутоиммунных ТКР для двух заболеваний: целиакии и анкилозирующего спондилита [27–29]. Так, нашим научным коллективом получена структура ТКР, ассоциированного с анкилозирующим спондилитом [28], которая была независимо подтверждена результатами исследования, проведенного английскими коллегами [29]. Патологический Т-клеточный клон содержит вариабельный генный сегмент TRBV9. Мы получили МА, специфично узнающие и деплецирующие *in vitro* Т-клетки, несущие на своей поверхности ТКР, ассоциированные с анкилозирующим спондилитом [30]. Описанный выше подход к разработке новых препаратов и собственно описанное нами МА, кажется нам хорошей платформой для создания новых лекарственных средств для лечения аутоиммунных заболеваний и болезни Бехтерева, в частности.

ВЫВОДЫ

Широкомасштабное массированное секвенирование иммунных репертуаров здоровых доноров и пациентов с такими тяжелыми аутоиммунными заболеваниями, как рассеянный склероз, диабет 1-го типа, а также последовательное HLA-типирование открывают возможности к идентификации новых мишеней для направленной иммунотерапии.

Литература

1. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. J Immunol. 2004; (172): 5967–2.
2. Konno Y, Kobayashi Y, Takahashi K, Takahashi E, Sakae S, Wakitani M, et al. Fucose content of monoclonal antibodies can be controlled by culture medium osmolality for high antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cytotechnology. 2012; (64): 249–65.
3. Lai Y, Dong C. Therapeutic antibodies that target inflammatory cytokines in autoimmune diseases. Int Immunol. 2016; (28): 181–8.
4. Nasonov EL, Denisov LN, Stanislav ML. Interleukin-17 is a new target for anti-cytokine therapy of immune inflammatory rheumatic diseases. Rheumatology Science and Practice. 2013; (51): 545.
5. van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, van De Loo FA. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. Ann Rheum Dis. 1999; 58 (Suppl 1): I40–8.
6. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. Nat Rev Drug Discov. 2012; (11): 633–52.
7. Ruperto N, Brunner HI, Quartier P, Constantin T, Wulffraat NM, Horneff G, et al. Canakinumab in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis and active systemic features: results from the 5-year long-term extension of the phase III pivotal trials. Ann Rheum Dis. 2018; (77): 1710–9.
8. Georgiev K, Georgieva M. Pharmacological properties of monoclonal antibodies directed against interleukins. In: Metodiev K, editor. Immunopathology and Immunomodulation. IntechOpen; 2015; p. 261–86. DOI: 10.5772/61774.
9. Goh AXH, Bertin-Maghit S, Ping Yeo S, Ho AWS, Derks H, Mortellaro A, et al. A novel human anti-interleukin-1β neutralizing monoclonal antibody showing in vivo efficacy. MAbs. 2014; (6): 765–73.
10. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL23-IL17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. Nat Rev Immunol. 2014; (14): 585–600.
11. Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The role of IL17 and Th17 lymphocytes in autoimmune diseases. Arch Immunol Ther Exp. 2015; (63): 435–49.
12. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. Int J Mol Sci. 2018; 19 (3): 730. DOI:10.3390/ijms19030730.
13. Kikuchi J, Hashizume M, Kaneko Y, Yoshimoto K, Nishina N, Takeuchi T. Peripheral blood CD4(+)CD25(+)CD127(low) regulatory T cells are significantly increased by tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis: increase in regulatory T cells correlates with clinical response. Arthritis Res Ther. 2015; (17): 10.
14. Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. J Immunol. 2009; (182): 259–73.
15. Kuhn C, Weiner HL. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. Immunotherapy. 2016; (8): 889–906.
16. Guglielmi C, Williams SR, Del Toro R, Pozzilli P. Efficacy and safety of otelixizumab use in new-onset type 1 diabetes mellitus. Expert Opin Biol Ther. 2016; (16): 841–6.
17. Yi Z, Diz R, Martin AJ, Morillon YM, Kline DE, Li L et al. Long-term remission of diabetes in NOD mice is induced by nondepleting anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. Diabetes. 2012; (61): 2871–80.
18. Randall KL. Rituximab in autoimmune diseases. Aust Prescr. 2016; (39): 131–4.
19. Looney RJ. B cells as a therapeutic target in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis. Rheumatology. 2005; 44 (Suppl 2): ii13–ii17.
20. Mélet J, Mulleman D, Goupille P, Ribourtout B, Watier H, Thibault G. Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response. Arthritis Rheum. 2013; (65): 2783–90.
21. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6–producing B cells. J Exp Med. 2012; 209 (5): 1001–10. DOI: 10.1084/jem.20111675.
22. Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, Awasthi A, Dardalhon VA, Galileos G et al. IL6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; (105): 18460–5.
23. Mulero P, Midaglia L, Montalban X. Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. Ther Adv Neurol Disord. 2018; (11): 1756286418773025. DOI: 10.1177/1756286418773025.
24. König M, Rharbaoui F, Aigner S, Dälken B, Schüttrumpf J. Tregalizumab — A Monoclonal Antibody to Target Regulatory T Cells. Front Immunol. 2016; (7): 11.
25. Smilek DE, Ehlers MR, Nepom GT. Restoring the balance: immunotherapeutic combinations for autoimmune disease. Dis Model Mech. 2014; (7): 503–13.
26. Chen Y, Chauhan SK, Tan X, Dana R. Interleukin-7 and -15 maintain pathogenic memory Th17 cells in autoimmunity. J Autoimmun. 2017; (77): 96–103.
27. Yohannes DA, Freitag TL, de Kauwe A, Kaukinen K, Kurppa K, Wacklin P et al. Deep sequencing of blood and gut T-cell receptor β-chains reveals gluten-induced immune signatures in celiac disease. Sci Rep. 2017; (7): 17977.
28. Komech EA, Pogorelyy MV, Egorov ES, Britanova OV, Rebrikov DV, Bochkova AG et al. CD8+ T cells with characteristic T cell receptor beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. Rheumatology. 2018; (57): 1097–104.
29. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T Cell Receptor β Motifs Specific to HLA--B27--Positive Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. Arthritis & Rheumatology. Wiley Online Library; 2017; (69): 774–84.
30. Израельсон М. А., Степанов А. В., Староверов Д. Б., Шагина И. А., Мисорин А. К., Евстратьева А. В. и др. Тестирование моноклональных антител к Т-клеточному рецептору, ассоциированному с анкилозирующим спондилитом. Вестник РГМУ. 2018; (5): 83–92. DOI: 10.24075/vrgmu.2018.064.

References

1. Danke NA, Koelle DM, Yee C, Beheray S, Kwok WW. Autoreactive T cells in healthy individuals. J Immunol. 2004; (172): 5967–2.
2. Konno Y, Kobayashi Y, Takahashi K, Takahashi E, Sakae S, Wakitani M, et al. Fucose content of monoclonal antibodies can be controlled by culture medium osmolality for high antibody-dependent cellular cytotoxicity. Cytotechnology. 2012; (64): 249–65.
3. Lai Y, Dong C. Therapeutic antibodies that target inflammatory cytokines in autoimmune diseases. Int Immunol. 2016; (28): 181–8.
4. Nasonov EL, Denisov LN, Stanislav ML. Interleukin-17 is a new target for anti-cytokine therapy of immune inflammatory rheumatic diseases. Rheumatology Science and Practice. 2013; (51): 545.
5. van den Berg WB, Joosten LA, Kollias G, van De Loo FA. Role of tumour necrosis factor alpha in experimental arthritis: separate activity of interleukin 1beta in chronicity and cartilage destruction. Ann Rheum Dis. 1999; 58 (Suppl 1): I40–8.
6. Dinarello CA, Simon A, van der Meer JWM. Treating inflammation by blocking interleukin-1 in a broad spectrum of diseases. Nat Rev Drug Discov. 2012; (11): 633–52.
7. Ruperto N, Brunner HI, Quartier P, Constantin T, Wulffraat NM, Horneff G, et al. Canakinumab in patients with systemic juvenile idiopathic arthritis and active systemic features: results from the 5-year long-term extension of the phase III pivotal trials. Ann Rheum Dis. 2018; (77): 1710–9.
8. Georgiev K, Georgieva M. Pharmacological properties of monoclonal antibodies directed against interleukins. In: Metodiev K, editor. Immunopathology and Immunomodulation. IntechOpen; 2015; p. 261–86. DOI: 10.5772/61774.
9. Goh AXH, Bertin-Maghit S, Ping Yeo S, Ho AWS, Derks H,

Mortellaro A, et al. A novel human anti-interleukin-1β neutralizing monoclonal antibody showing in vivo efficacy. MAbs. 2014; (6): 765–73.
10. Gaffen SL, Jain R, Garg AV, Cua DJ. The IL23-IL17 immune axis: from mechanisms to therapeutic testing. Nat Rev Immunol. 2014; (14): 585–600.
11. Tabarkiewicz J, Pogoda K, Karczmarczyk A, Pozarowski P, Giannopoulos K. The role of IL17 and Th17 lymphocytes in autoimmune diseases. Arch Immunol Ther Exp. 2015; (63): 435–49.
12. Lee GR. The Balance of Th17 versus Treg Cells in Autoimmunity. Int J Mol Sci. 2018; 19 (3): 730. DOI:10.3390/ijms19030730.
13. Kikuchi J, Hashizume M, Kaneko Y, Yoshimoto K, Nishina N, Takeuchi T. Peripheral blood CD4(+)CD25(+)CD127(low) regulatory T cells are significantly increased by tocilizumab treatment in patients with rheumatoid arthritis: increase in regulatory T cells correlates with clinical response. Arthritis Res Ther. 2015; (17): 10.
14. Lal G, Zhang N, van der Touw W, Ding Y, Ju W, Bottinger EP, et al. Epigenetic regulation of Foxp3 expression in regulatory T cells by DNA methylation. J Immunol. 2009; (182): 259–73.
15. Kuhn C, Weiner HL. Therapeutic anti-CD3 monoclonal antibodies: from bench to bedside. Immunotherapy. 2016; (8): 889–906.
16. Guglielmi C, Williams SR, Del Toro R, Pozzilli P. Efficacy and safety of otelixizumab use in new-onset type 1 diabetes mellitus. Expert Opin Biol Ther. 2016; (16): 841–6.
17. Yi Z, Diz R, Martin AJ, Morillon YM, Kline DE, Li L et al. Long-term remission of diabetes in NOD mice is induced by nondepleting anti-CD4 and anti-CD8 antibodies. Diabetes. 2012; (61): 2871–80.
18. Randall KL. Rituximab in autoimmune diseases. Aust Prescr. 2016; (39): 131–4.
19. Looney RJ. B cells as a therapeutic target in autoimmune diseases other than rheumatoid arthritis. Rheumatology. 2005; 44 (Suppl 2): ii13–ii17.
20. Mélet J, Mulleman D, Goupille P, Ribourtout B, Watier H, Thibault G. Rituximab-induced T cell depletion in patients with rheumatoid arthritis: association with clinical response. Arthritis Rheum. 2013; (65): 2783–90.
21. Barr TA, Shen P, Brown S, Lampropoulou V. B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6–producing B cells. J Exp Med. 2012; 209 (5): 1001–10. DOI: 10.1084/jem.20111675.
22. Korn T, Mitsdoerffer M, Croxford AL, Awasthi A, Dardalhon VA, Galileos G et al. IL6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2008; (105): 18460–5.
23. Mulero P, Midaglia L, Montalban X. Ocrelizumab: a new milestone in multiple sclerosis therapy. Ther Adv Neurol Disord. 2018; (11): 1756286418773025. DOI: 10.1177/1756286418773025.
24. König M, Rharbaoui F, Aigner S, Dälken B, Schüttrumpf J. Tregalizumab — A Monoclonal Antibody to Target Regulatory T Cells. Front Immunol. 2016; (7): 11.
25. Smilek DE, Ehlers MR, Nepom GT. Restoring the balance: immunotherapeutic combinations for autoimmune disease. Dis Model Mech. 2014; (7): 503–13.
26. Chen Y, Chauhan SK, Tan X, Dana R. Interleukin-7 and -15 maintain pathogenic memory Th17 cells in autoimmunity. J Autoimmun. 2017; (77): 96–103.
27. Yohannes DA, Freitag TL, de Kauwe A, Kaukinen K, Kurppa K, Wacklin P et al. Deep sequencing of blood and gut T-cell receptor β-chains reveals gluten-induced immune signatures in celiac disease. Sci Rep. 2017; (7): 17977.
28. Komech EA, Pogorelyy MV, Egorov ES, Britanova OV, Rebrikov DV, Bochkova AG et al. CD8+ T cells with characteristic T cell receptor beta motif are detected in blood and expanded in synovial fluid of ankylosing spondylitis patients. Rheumatology. 2018; (57): 1097–104.
29. Faham M, Carlton V, Moorhead M, Zheng J, Klinger M, Pepin F et al. Discovery of T Cell Receptor β Motifs Specific to HLA--B27--Positive Ankylosing Spondylitis by Deep Repertoire Sequence Analysis. Arthritis & Rheumatology. Wiley Online Library; 2017; (69): 774–84.
30. Israelson MA, Stepanov AV, Staroverov DB, Shagina IA, Misorin AK, Evstratieva AV, Merzlyak EM, Bogdanova EA, Britanova OV, Lukyanov SA. Testing of monoclonal antibodies against the T-cell receptor associated with ankylosing spondylitis. Bulletin of RSMU. 2018; (5): 71–9. DOI: 10.24075/brsmu.2018.064.

ЭКСПРЕССИЯ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА В НАТУРАЛЬНЫХ КИЛЛЕРАХ ЛИНИИ NK-92 ПУТЕМ ТРАНСДУКЦИИ ЛЕНТИВИРУСНЫМИ ЧАСТИЦАМИ, ПСЕВДОТИПИРОВАННЫМИ ПОВЕРХНОСТНЫМИ ГЛИКОПРОТЕИНАМИ ВАКЦИННОГО ШТАММА ВИРУСА КОРИ

Ю. Е. Кравченко, Д. И. Гагаринская, Е. И. Фролова, С. П. Чумаков ✉

Институт биоорганической химии имени М. М. Шемякина и Ю. А. Овчинникова РАН, Москва

Клеточная иммунотерапия с использованием химерных антигенных рецепторов (ХАР) является одним из перспективных направлений развития современной онкологии. Собственные Т-лимфоциты пациента с приданной специфичностью в отношении неоантигенов опухолей за счет экспрессии ХАР демонстрируют клиническую эффективность, однако стоимость такой терапии чрезвычайно высока. В качестве более доступной альтернативы могут быть использованы унифицированные носители ХАР на основе линии клеток натуральных киллеров NK-92. Эта культура отличается устойчивостью к лентивирусной трансдукции; однако для трансдукции первичных иммунных клеток недавно начали успешно применять лентивирусные векторы, псевдотипированные поверхностными гликопротеинами вакцинного штамма вируса кори. Целью работы было определить эффективность трансдукции клеток NK-92 лентивирусами, псевдотипированными гликопротеинами F и H вируса кори, а также условия селекции NK-92, трансдуцированных химерным рецептором против CD20, и оценить их цитотоксическое действие. Результаты исследования показали, что максимальный трансфекционный титр достигается при использовании варианта белка H (HΔ18) в сочетании с вариантом белка F (FΔ30), а применение BX795 (ингибитора TBK1/IKKε) дополнительно позволяет добиться трехкратного увеличения инфекционного титра. ХАР-экспрессирующие клетки NK-92 оказались способными подавлять пролиферацию $CD20^+$-клеток линии Raji в меньшей дозе, по сравнению с немодифицированными клетками NK-92.

Ключевые слова: клеточная иммунотерапия, химерные антигенные рецепторы, ХАР, лентивирусные векторы, натуральные киллеры, линейные клеточные носители, псевдотипирование, гликопротеины кори

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке Министерства образования и науки РФ, уникальный код проекта RFMEFI60716X0156.

✉ **Для корреспонденции:** Степан Петрович Чумаков
ул. Миклухо-Маклая, 16/10, г. Москва, 117997; hathkul@gmail.com

Статья получена: 27.11.2018 **Статья принята к печати:** 20.12.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.091

CHIMERIC ANTIGEN RECEPTOR EXPRESSION IN NATURAL KILLER CELL LINE NK-92 BY TRANSDUCTION WITH LENTIVIRAL PARTICLES PSEUDOTYPED WITH THE SURFACE GLYCOPROTEINS OF THE MEASLES VIRUS VACCINE STRAIN

Kravchenko YE, Gagarinskaya DI, Frolova EI, Chumakov SP ✉

Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of the Russian Academy of Sciences, Moscow

Cancer immunotherapy with T-cells that carry chimeric antigen receptors is currently on cutting edge of modern oncology. Autotransplantation of T-lymphocytes with chimeric receptor specific for certain tumor antigen proves to be clinically effective, but costly. Linear carriers of chimeric antigen receptors based on natural killer NK-92 cell culture may be an affordable alternative, however, this culture is resistant to lentiviral transduction. Recently, lentiviral vectors, pseudotyped with surface glycoproteins of the measles virus vaccine strain, have recently been successfully applied for transduction of primary immune cells. The aim of the work was to assess the efficiency of transduction of NK-92 cells with lentivirus vectors, pseudotyped with measles F and H surface glycoproteins, as well as to establish optimal conditions for selection of NK-92 transduced with the chimeric receptor against CD20 and to evaluate the culture's cytotoxic potential. The results showed that the maximum infectious titer is achieved using the HΔ18 variant in combination with FΔ30, and the use of the TBK1/IKKε inhibitor BX795 results in additional 3-fold increase in the infectious titer. CAR-expressing NK-92 were able to suppress the proliferation of $CD20^+$ cell line Raji in lower effector-to-target ratios than unmodified NK-92.

Keywords: cellular immunotherapy, chimeric antigen receptors, CAR, lentiviral vectors, natural killer cells, linear cellular carriers, pseudotyping with measles glycoproteins

Funding: this work was funded by MESR (project code RFMEFI60716X0156).

✉ **Correspondence should be addressed:** Stepan P. Chumakov
Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117997; hathkul@gmail.com

Received: 27.11.2018 **Accepted:** 20.12.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.091

Совершенствование методов клеточной иммунотерапии для борьбы со злокачественными новообразованиями является одним из ключевых направлений развития современной онкологии. Введение в организм иммунных клеток, нацеленных на опухолевые антигены, позволяет добиться высокой специфичности действия и эффективности лечения при низкой частоте развития нежелательных эффектов [1]. В исследовательских работах и при клинических испытаниях часто используют собственные цитотоксические Т-лимфоциты пациента, которым искусственно придается специфичность в отношении определенного опухолевого антигена или их комбинации. Подобные модификации осуществляют за счет экспрессии химерного антигенного рецептора (ХАР), состоящего из нескольких внутриклеточных сигнальных доменов для активации Т-лимфоцита, и внеклеточного участка, распознающего опухолевый антиген [2]. Для введения конструкций, экспрессирующих ХАР, применяют химическую трансфекцию клеток [3], электропорацию [4] или трансдукцию вирусными векторами [5]. После трансдукции клеточная популяция может быть пассирована в культуре для получения необходимого количества клеток. Препараты ХАР-Т-клеток демонстрируют неплохую клиническую эффективность, однако стоимость терапии с их использованием чрезвычайно высока, что объясняется необходимостью производства персонализированной популяции Т-клеток для каждого пациента. Другой причиной невозможности массового применения ХАР-Т-клеток служит ограниченная доступность собственных Т-лимфоцитов у тяжелых онкологических больных. Преодолеть эти барьеры можно, но это потребует существенного совершенствования технологий получения клеточных препаратов.

В качестве менее дорогой и более доступной альтернативы ХАР-Т-клеточным препаратам могут быть использованы унифицированные носители ХАР — линии клеток натуральных киллеров. Из 11 установленных и широко доступных линий натуральных киллеров, полученных от пациентов с различными лимфопролиферативными заболеваниями, только две — KHYG-1 [6] и NK-92 [7] — обладают выраженной способностью подавлять рост опухолевых клеток за счет цитотоксического действия, при отсутствии экспрессии на своей поверхности Т-клеточных рецепторов [8]. Обе клеточные линии способны пролиферировать в присутствии IL2 в культуральной среде, а для NK-92 была показана способность избирательно уничтожать клетки лимфомы линии K-562, культивируемые в смеси с нормальными периферическими мононуклеарными клетками. Клетки линии NK-92 также оказались способными сохранять цитотоксичность после γ-облучения дозой 10 Гр при утрате способности к пролиферации, что позволяет использовать их для терапии онкологических заболеваний [9].

Для усиления цитотоксических свойств NK-92 были созданы генетически модифицированные варианты, экспрессирующие собственные IL2, IL15 [10]; или дополнительные рецепторы CD16 для нацеливания на опухолевые клетки при помощи антител, либо ХАР для прямого распознавания опухолевых антигенов [11]. Функционально ХАР-экспрессирующие NK-92 аналогичны ХАР-Т-клеткам, при этом стоимость терапии может быть значительно ниже, так как линейные клетки можно культивировать в промышленных масштабах, а подготовительные процедуры для лечения пациента будут заключаться лишь в размораживании ампулы готового препарата [12]. Помимо использования для терапии, клетки NK-92 могут служить в качестве клеточной платформы для тестирования различных вариантов химерных рецепторов *in vitro* и *in vivo*. Основное препятствие при работе с клетками этой линии заключается в их чувствительности к условиям культивации, а также высокой устойчивости к лентивирусной трансдукции: вирусные векторы, псевдотипированные G-белком вируса везикулярного стоматита (VSV), неэффективно заражают клетки NK-92, а при повышении количества вирусных частиц в среде клетки теряют жизнеспособность [13]. Для проведения лентивирусной трансдукции периферических Т-лимфоцитов и иммунных клеток миелоидного ряда не так давно были испытаны лентивирусные векторные частицы, псевдотипированные поверхностными гликопротеинами вакцинного штамма вируса кори [14]. Было показано, что по сравнению с обычными лентивирусными векторами, псевдотипированными белком G вируса везикулярного стоматита, они обладают более высокой способностью трансдуцировать иммунные клетки, не вызывая при этом стимулирования клеточных делений, смены фенотипа и изменения профиля секретируемых цитокинов [15]. Целью настоящей работы было определить эффективность трансдукции клеток NK-92 лентивирусами, псевдотипированными гликопротеинами F и H вируса кори, определить условия выделения и очистки клеток NK-92, трансдуцированных химерным рецептором, направленным против антигена CD20, а также оценить их цитотоксический потенциал.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Плазмиды и конструкции

Для упаковки лентивирусных векторов, псевдотипированных VSV-G, использовали упаковочные плазмиды psPAX2 (содержит структурные белки лентивируса) и pMD2-G (кодирует G-белок вируса везикулярного стоматита). Обе плазмиды были любезно предоставлены Дидьером Троно (Addgene plasmid # 12260; http://n2t.net/addgene:12260; RRID:Addgene_12260 и Addgene plasmid #12259; http://n2t.net/addgene:12259; RRID:Addgene_12259). Для псевдотипирования гликопротеинами кори, вместо pMD2-G использовали плазмиду pMD2-FΔ30, кодирующую фрагмент F-белка вируса кори вакцинного штамма ЭШЧ с укороченным на 30 аминокислот цитоплазматическим доменом. Для ревертирования РНК вируса кори и амплификации целевого фрагмента генома применяли праймеры Fdelta30 dir EcoRI (AGAGGAATTCACCACCATGTCC ATCATGGGTCTCAAGGTGAACGTCTCTG) и Fdelta30 rev EcoRI (AGAGAGAATTCTCAACGCCCCCTGCAGCAACATATTAAAG CG), клонирование производили в вектор pMD2-G по сайтам EcoRI. В сочетании с pMD2-FΔ30 была использована плазмида pCG-HcΔ18, предоставленная Джейкобом Рейзером (Addgene plasmid # 84817; http://n2t.net/addgene:84817; RRID:Addgene_84817), а также ее варианты, в которых делетированы 24 N-концевых аминокислоты H-белка (pCG-HcΔ24), либо содержащие перед укороченным H-белком дополнительные 4 аминокислотных остатка аланина (pCG-4AHcΔ24). Плазмиды были получены путем клонирования в исходный вектор фрагментов H-белка, амплифицированных с праймерами Hd24 BamHI dir (AGAGAGGGATCCAGGGTG CAAGATCATCCACAATGAACCGGGAGCACCTGATG) и H rev (CTGATGTCTATTTCACACTAGTACAAAC), либо с праймерами Hd24 4a BamHI dir (AGAGAGGGATCCAGGGTGCAAGATCATC

CACAATGGCCGCTGCAGCCAACCGGGAGCACCTGATG) и H rev соответственно по сайтам BamHI и SpeI. Для отработки условий трансдукции и испытания цитотоксического действия применяли лентивирусные векторы pLCMV-tagRFP-puro, который содержит последовательность красного флуоресцентного белка tagRFP (Евроген; Россия) под контролем цитомегаловирусного промотора, и pLSF-@CD20-229-tagRFP, содержащий последовательность химерного рецептора третьего поколения против поверхностного антигена CD20 (лидерный пептид CD8, ScFv из гибридомы HB-9645, эпитоп DYKDDDDK, линкерный участок 229 аминокислот, трансмембранный домен CD28 и сигнальные домены CD28, CD137, CD3z) и tagRFP, экспрессирующиеся полицистронно при помощи сигнальной последовательности T2A под контролем промотора SFFV.

Культуры клеток

Для получения препаратов вируса использовали клетки линии HEK-293T, которые культивировали в среде DMEM-F12 (PAA; Австрия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка, 2 мМ аланил-глутамина (ПанЭко; Россия), 20 мМ HEPES и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина.

Культивацию NK-92 проводили в питательной среде RPMI-1640 (PAA; Австрия) с добавлением 20% эмбриональной сыворотки теленка и сыворотки крови лошади в равных пропорциях, 2 мМ аланил-глутамина (ПанЭко; Россия), 20 мМ HEPES, 0,2 мМ инозитола, 0,1 мМ 2-меркаптоэтанола, 1 мкМ водорастворимого гидрокортизона (Sigma-Aldrich; США), 20 мкМ фолиевой кислоты и рекомбинантного IL2 в конечной концентрации 100 мкг/мл.

В качестве мишеней для XAP-экспрессирующих клеток NK-92 в работе использовали клетки линии Raji (лимфома Беркитта) (ATCC; США), экспрессирующие флуоресцентный белок GFP. Клетки культивировали в среде RPMI-1640 (ПанЭко; Россия) с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка, 2 мМ аланил-глутамина (ПанЭко; Россия), 20 мМ HEPES и по 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина. Все клетки содержали в условиях 5%-го CO_2 при 37 °C.

Трансфекция и вирусная трансдукция

Трансфекцию проводили на 6-луночных планшетах в среде для культивации OptiMEM (Invitrogen; США) с использованием полиэтиленимина 25кДА (PEI-25, Polysciences; США) на клетках HEK-293T в плотности 40–60% от монослоя, рассеянных накануне.

Для лентивирусных векторов, псевдотипированных VSV-G, была приготовлена смесь из следующих плазмид: pLCMV-tagRFP-puro, содержащей маркерный белок (1,5 мкг), psPAX2 (0,9 мкг) и pMD2-G (0,6 мкг) в соотношении 5 : 3 : 2 соответственно. Для псевдотипирования гликопротеинами кори использовали плазмиды pLCMV-tagRFP-puro либо pLSF-@CD20-229-tagRFP (0,9 мкг), psPAX2 (0,9 мкг), pMD2-FΔ30 (0,79 мкг), pCG-HcΔ18 (0,11 мкг) или ее вариации pCG-HcΔ24 (0,11 мкг) и pCG-4AHcΔ24 (0,11 мкг) в соотношении 8 : 8 : 7 : 1. После трехчасовой инкубации клеток с трансфекционной смесью среда была заменена на RPMI с содержанием заменителя сыворотки (Serum Replacement Solution, PeproTech; США), 2 мМ аланил-глутамина (ПанЭко; Россия), 20 мМ HEPES и 4 мМ кофеина, в которой HEK-293T инкубировали в течение 24 ч для наработки вирусного препарата. Вирусную трансдукцию проводили в течение 8–12 ч на клетках NK-92, взятых в количестве не менее $5 \cdot 10^5$ в 1 мл. В содержащую вирус среду предварительно добавили полибрен в концентрации 8 мкг/мл и недостающие питательные добавки, входящие в состав среды для культивации клеток NK-92, а также BX795 в концентрации 3 мкМ. Затем среду заменили на обычную для клеток NK-92. Результат трансдукции оценивали через 48 ч. Инфекционный титр вирусных частиц и эффективность трансдукции определяли с помощью проточного цитометра посредством оценки tagRFP-положительной фракции.

Определение цитотоксичности

Для оценки цитотоксичности клетки NK-92 смешивали с клетками Raji, экспрессирующими GFP, в различных соотношениях. После совместной культивации в течение 48 ч на проточном цитометре оценивали долю и количество GFP-положительных клеток.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Определение оптимального соотношения упаковочных плазмид

Для оценки эффективности трансдукции клеток линии NK-92 были использованы препараты лентивирусных частиц, псевдотипированные белком G вируса VSV, либо тремя различными вариантами H-белка вируса кори в сочетании с F-белком (H/F-псевдотипированные). В литературных источниках приводится противоречивая информация об оптимальном соотношении упаковочных плазмид, приводящем к получению наибольших титров вируса [15–19]. Соотношения, известные из литературы, а также полученные путем экстраполяции применяемых для упаковки VSV-G-псевдотипированных лентивирусных векторов (вектор : psPAX2 : pMD2-G как 5 : 3 : 2), были использованы для получения препаратов лентивирусов и последующего определения их инфекционного титра (рис. 1). Результаты показали, что соотношения плазмид 8 : 8 : 7 : 1 и 15 : 9 : 2 : 1 для векторов pLCMV-tagRFP-puro : psPAX2 : pMD2-Fd30 : pCG-HΔ18 демонстрировали наиболее эффективную упаковку лентивирусных частиц для варианта белка HΔ18. Для всех дальнейших экспериментов было использовано соотношение 8 : 8 : 7 : 1.

Сравнение вариантов белка H

Характерной особенностью псевдотипирования H/F-белками является образование синцитиев в культуре клеток-упаковщиков. Длина цитоплазматических участков белков H и F непосредственно влияет на интенсивность этого процесса, и чем менее активно формируются синцитии, тем дольше клетки-упаковщики могут быть использованы для сбора лентивирусных частиц. Избыточное укорачивание цитоплазматических доменов приводит к резкому падению трансфекционного титра. Приводятся данные, что вариант белка HΔ18 в сочетании с белком FΔ30 производит лентивирусные векторные препараты с максимальным транфекционным титром, при этом укорочение до HΔ24 практически полностью подавляет продукцию векторного вируса, а добавление четырех аланиновых остатков на N-конец такого мутанта восстанавливает трансфекционный титр до максимальных

значений [16]. В другой работе использовали вариант белка HΔ24 для получения высококонцентрированных лентивирусных препаратов [15]. Результаты проведенного нами сравнения трех вариантов белка H показали, что размер и скорость образования синцитиев максимальны для варианта белка HΔ18, существенно ниже у варианта 4A-HΔ24 и минимальны у HΔ24 (рис. 2); трансфекционный титр также был максимален при использовании варианта HΔ18, однако для варианта 4A-HΔ24 полученный трансфекционный титр лишь незначительно уступал варианту HΔ18, а для варианта HΔ24 был, как минимум, на 2 порядка ниже, чем у варианта HΔ18. В дальнейших опытах использовали лентивирусные частицы, псевдотипированные белками HΔ18/FΔ30. При измерении на клетках HEK-293 средний вирусный титр H/F-псевдотипированных лентивирусных препаратов был в 15–20 раз ниже, чем при псевдотипировании белком G вируса VSV (таблица).

Оптимизация условий трансдукции клеток NK-92

Использование VSV-G-псевдотипированных лентивирусных препаратов для трансдукции клеток NK-92 показало, что превышение титра ~10^5 и. е. на 1 мл среды в течение 8 ч приводит к существенному падению жизнеспособности культуры. Кроме того, клетки NK-92 гораздо менее эффективно трансдуцировались такими лентивирусами, различие в трансфекционном титре по сравнению с HEK-293 составляло более 3-х порядков. Для повышения эффективности трансдукции натуральных киллеров предложено применять ингибитор TBK1/IKKε BX795 в концентрации 6–8 мкМ [20]. Оценка влияния BX795 на жизнеспособность клеток NK-92 показала, что они сохраняют жизнеспособность при концентрациях до 3 мкМ (рис. 3). Применение BX795 позволило снизить разницу в эффективности трансдукции VSV-G-псевдотипированными

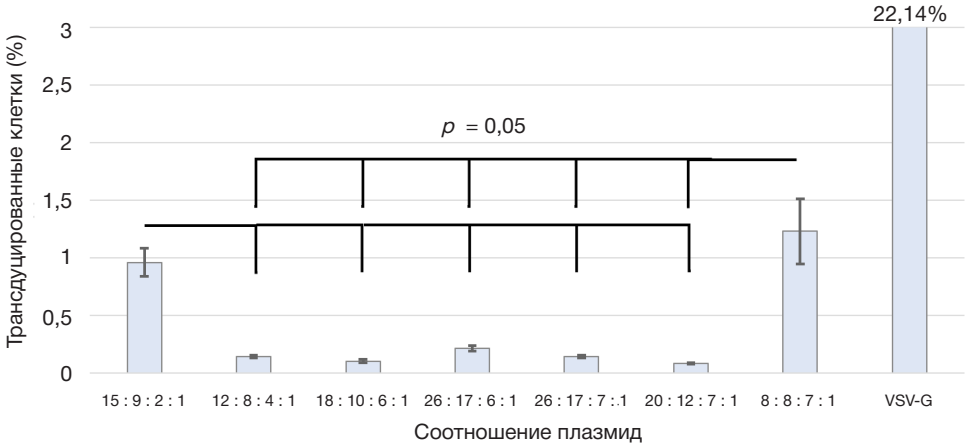


Рис. 1. Доля флуоресцирующих клеток HEK-293, оцененная через 48 ч после трансдукции клеточной популяции H/F-псевдотипированными и VSV-G-псевдотипированными лентивирусными векторами. Ось X — соотношение плазмид вектор : psPAX2 : pMD2-FΔ30 : pCG-HΔ18

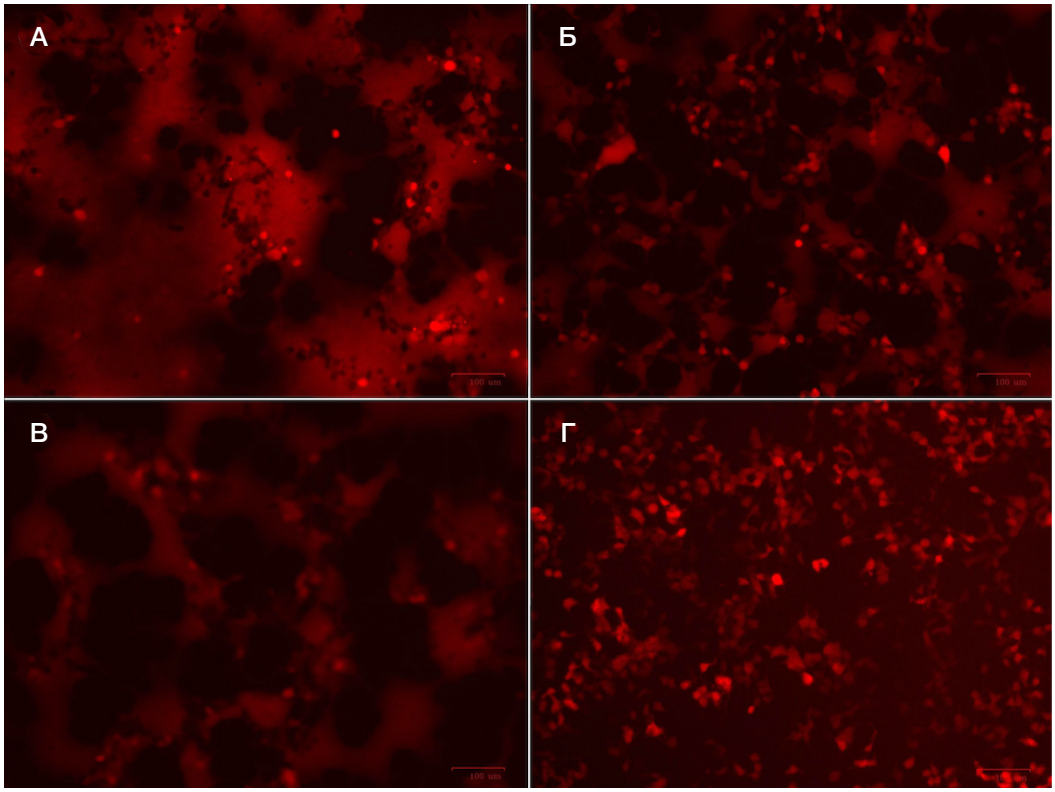


Рис. 2. Синцитии, образуемые клетками HEK-293T после трансфекции смесью плазмид для продукции H/F-псевдотипированных лентивирусных частиц. **А**. pCG-HcΔ18 + pMD2-FΔ30. **Б**. pCG-HcΔ24 + pMD2-FΔ30. **В**. pCG-4A-HcΔ24 + pMD2-FΔ30. **Г**. pMD2-G

вирусными частицами в 300 раз. В тех же условиях трансдукции H/F-псевдотипированные лентивирусные препараты оказались способными трансдуцировать клетки NK-92 в три раза менее эффективно по сравнению с клетками HEK-293.

Оценка цитотоксического действия ХАР-трансдуцированных клеток NK-92

Поскольку клетки NK-92 плохо поддаются культивации в низкой плотности, использованные величины соотношения клетка : инфекционная единица не позволяли получить достаточно высокую долю трансдуцированных клеток. Выделение фракции, экспрессирующей tagRFP, при помощи проточного сортировщика позволило получить небольшие фракции ХАР-экспрессирующих клеток, однако сопутствующий стресс приводил к существенной потере жизнеспособности. Для решения этой проблемы мы применили сортировку ХАР-экспрессирующих клеток при помощи магнитных частиц, покрытых моноклональными антителами к эпитопу DYKDDDDK. Такой подход оказался более щадящим и не приводил к подавлению пролиферации клеток NK-92. Полученные фракции ХАР-экспрессирующих клеток были протестированы на способность подавлять рост GFP-экспрессирующих CD20⁺ клеток Raji. По сравнению с немодифицированными клетками, @CD20-NK-92 оказались способны подавлять пролиферацию клеток Raji в меньшей дозе (рис. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В ходе сравнения различных вариантов H-гликопротеинов мы установили, что укорочение цитоплазматического домена более чем на 20 аминокислот нецелесообразно

Таблица. Титры инфекционных вирусных препаратов, полученных с применением различных вариантов H-белка. Приведены значения, нормализованные на 10^6 клеток-упаковщиков

	HEK-293	NK-92
HΔ18/FΔ30	**~6,15 • 10^4**	**~2,1 • 10^4**
HΔ24/FΔ30	**<2 • 10^2**	**<2 • 10^2**
4A-HΔ24/FΔ30	**~4,3 • 10^4**	**~1,6 • 10^4**
VSV-G	**~1,1 • 10^6**	**~3,5 • 10^3**

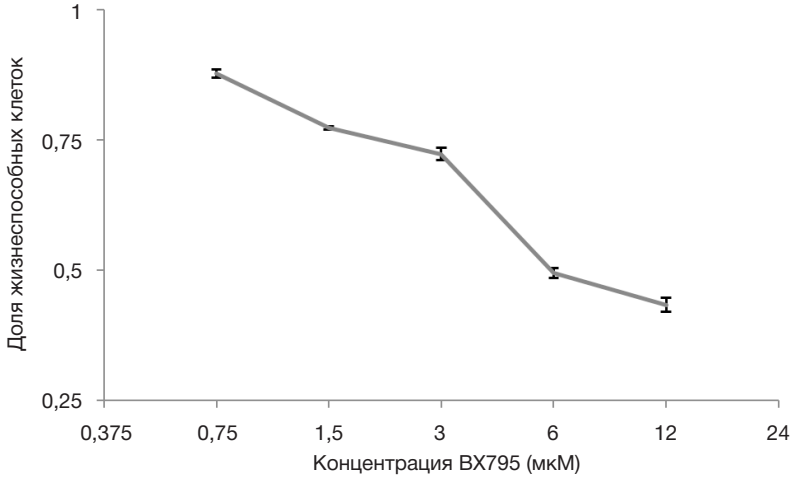


Рис. 3. Пролиферативная активность клеток NK-92, измеренная через 48 ч после добавления в питательную среду BX795 в различных концентрациях. Приведены значения, нормализованные относительно контрольных (необработанная культура). Значения ниже 0,5 характеризуют культуру, не пролиферировавшую с момента добавления препарата

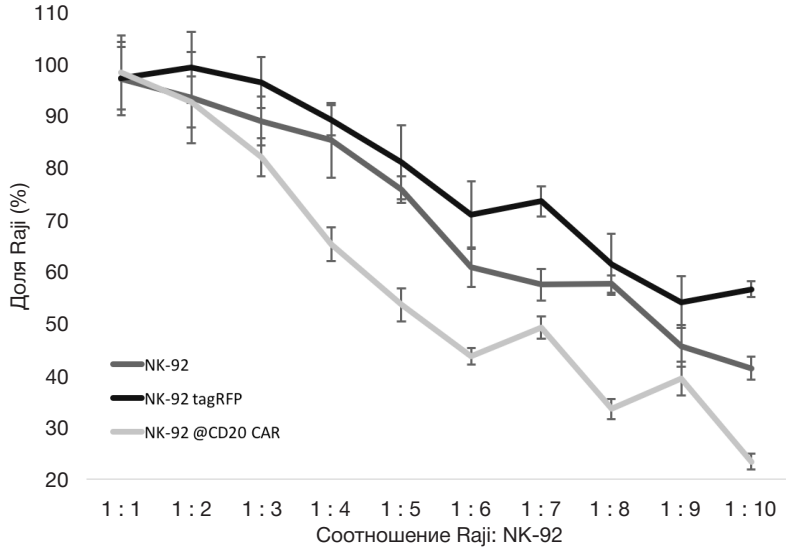


Рис. 4. Подавление пролиферации клеток линии Raji при кокультивировании с клетками NK-92. По шкале Y — процентная доля присутствовавших в образце клеток Raji с нормальным фенотипом (FSC/SSC) после двух дней совместного культивирования, относительно контрольного образца, в котором клетки Raji культивировались без клеток NK-92. Серии: нетрансдуцированные клетки NK-92; клетки NK-92, трансдуцированные экспрессором tagRFP (без селекции); клетки NK-92, трансдуцированные экспрессором ХАР к CD20 и прошедшие селекцию

ввиду сильного падения трансфекционного титра. H/F-псевдотипированные лентивирусные частицы отличались существенно меньшей эффективностью упаковки по сравнению с лентивирусными частицами, псевдотипированными белком VSV-G, однако этот фактор компенсировался большей эффективностью на обычно сложных для трансдукции клетках NK-92. В ходе экспериментов нами было отмечено, что обработка H/F-псевдотипированными вирусными векторами приводит к менее значительному подавлению пролиферации клеток NK-92, позволяя использовать большие концентрации вирусных частиц для трансдукции и приводя к дополнительному повышению ее эффективности. Так же важно, что применительно к клеткам NK-92, BX795 оказался активен во вдвое меньших дозах, чем при трансдукции первичных культур. В целом, использование сочетания H/F-псевдотипированных лентивирусных векторов, BX795 и последующей сортировки трансдуцированных фракций на магнитных микросферах позволило нам стабильно получать популяции XAP-экспрессирующих NK-92, демонстрирующие высокие уровни цитотоксичности против антиген-экспрессирующих клеток-мишеней.

Клетки NK-92 отличаются требовательностью к условиям культивирования и, как показали наши результаты, повышенной устойчивостью к трансдукции лентивирусными векторами. Однако сложности, связанные с получением XAP-экспрессирующих клеток NK-92, в дальнейшем могут быть скомпенсированы большей универсальностью применения таких культур для клеточной иммунотерапии, либо в качестве компонентов комплексных терапевтических подходов, например в качестве клеточных носителей для доставки онколитических вирусов.

ВЫВОДЫ

Оптимальным вариантом белка H вируса кори для получения H/F-псевдотипированных лентивирусов является HΔ18 (с точки зрения трансфекционного титра) и 4A-HΔ24 (с точки зрения продолжительности продукции вирусных частиц), наибольшие трансфекционные титры были достигнуты при использовании соотношения плазмид 8 : 8 : 7 : 1. Полученные препараты H/F-псевдотипированных лентивирусных частиц обладали в 15–20 раз меньшим трансфекционным титром, по сравнению с VSV-G-псевдотипированными, при этом разница в титрах при трансдукции клеток NK-92 достигала приблизительно соотношения 5 : 1 в пользу H/F-псевдотипированных частиц. Определена оптимальная концентрация ингибитора TBK1/IKKε BX795, составившая 3 мкМ; использование BX795 позволило почти в 3 раза повысить эффективность трансдукции. Трансдуцированные клетки XAP-NK-92 были успешно изолированы путем связывания с компонентом химерного рецептора и отличались высокой способностью подавлять пролиферацию $CD20^+$-клеток Raji.

Литература

1. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. Nat Rev Immunol. 2012; 12 (4): 269–81. DOI: 10.1038/nri3191. PubMed PMID: 22437939.
2. Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. Cancer immunology research. 2016; 4 (6): 498–508. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231. PubMed PMID: 27059623.
3. Olden BR, Cheng Y, Yu JL, Pun SH. Cationic polymers for non-viral gene delivery to human T cells. J Control Release. 2018; (282): 140–7. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.02.043. PubMed PMID: 29518467.
4. Zhang Z, Qiu S, Zhang X, Chen W. Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. BMC Biotechnol. 2018; 18 (1): 4. DOI: 10.1186/s12896-018-0419-0. PubMed PMID: 29378552.
5. Tumaini B, Lee DW, Lin T, Castiello L, Stroncek DF, Mackall C et al. Simplified process for the production of anti-CD19-CAR-engineered T cells. Cytotherapy. 2013; 15 (11): 1406–15. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.003. PubMed PMID: 23992830.
6. Yagita M, Huang CL, Umehara H, Matsuo Y, Tabata R, Miyake M et al. A novel natural killer cell line (KHYG-1) from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53 point mutation. Leukemia. 2000; 14 (5): 922–30. PubMed PMID: 10803526.
7. Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia. 1994; 8 (4): 652–8. PubMed PMID: 8152260.
8. Matsuo Y, Drexler HG. Immunoprofiling of cell lines derived from natural killer-cell and natural killer-like T-cell leukemia-lymphoma. Leuk Res. 2003; 27 (10): 935–45. PubMed PMID: 12860014.
9. Klingemann HG, Wong E, Maki G. A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. Biol Blood Marrow Transplant. 1996; 2 (2): 68–75. PubMed PMID: 9118301.
10. Zhang J, Sun R, Wei H, Zhang J, Tian Z. Characterization of interleukin-15 gene-modified human natural killer cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. Haematologica. 2004; 89 (3): 338–47. PubMed PMID: 15020274.
11. Chen Y, You F, Jiang L, Li J, Zhu X, Bao Y et al. Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB-zeta or CD64-BB-zeta receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody. Oncotarget. 2017; 8 (23): 37128–39. DOI: 10.18632/oncotarget.16201. PubMed PMID: 28415754.
12. Suck G, Odendahl M, Nowakowska P, Seidl C, Wels WS, Klingemann HG et al. NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2016; 65 (4): 485–92. DOI: 10.1007/s00262-015-1761-x. PubMed PMID: 26559813.
13. Boissel L, Betancur M, Lu W, Wels WS, Marino T, Van Etten RA et al. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens. Leuk Lymphoma. 2012; 53 (5): 958–65. DOI: 10.3109/10428194.2011.634048. PubMed PMID: 22023526.
14. Humbert JM, Frecha C, Amirache Bouafia F, N'Guyen TH, Boni S, Cosset FL et al. Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors are highly superior to vesicular stomatitis virus G pseudotypes for genetic modification of monocyte-derived dendritic cells. J Virol. 2012; 86 (9): 5192–203. DOI: 10.1128/JVI.06283-11. PubMed PMID: 22345444.
15. Frecha C, Costa C, Negre D, Gauthier E, Russell SJ, Cosset FL et al. Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. Blood. 2008; 112 (13): 4843–52. DOI: 10.1182/blood-2008-05-155945. PubMed PMID: 18812471.
16. Funke S, Maisner A, Muhlebach MD, Koehl U, Grez M, Cattaneo R et al. Targeted cell entry of lentiviral vectors. Mol Ther. 2008; 16 (8): 1427–36. DOI: 10.1038/mt.2008.128. PubMed PMID: 18578012.
17. Kneissl S, Abel T, Rasbach A, Brynza J, Schneider-Schaulies J,

Buchholz CJ. Measles virus glycoprotein-based lentiviral targeting vectors that avoid neutralizing antibodies. PLoS ONE. 2012; 7 (10): e46667. DOI: 10.1371/journal.pone.0046667. PubMed PMID: 23071609.
18. Ou W, Marino MP, Suzuki A, Joshi B, Husain SR, Maisner A et al. Specific targeting of human interleukin (IL)-13 receptor alpha2-positive cells with lentiviral vectors displaying IL13. Human gene therapy methods. 2012; 23 (2): 137–47. DOI: 10.1089/hgtb.2012.054. PubMed PMID: 22612657.
19. Marino MP, Panigaj M, Ou W, Manirarora J, Wei CH, Reiser J. A scalable method to concentrate lentiviral vectors pseudotyped with measles virus glycoproteins. Gene Ther. 2015; 22 (3): 280–5. DOI: 10.1038/gt.2014.125. PubMed PMID: 25608718.
20. Sutlu T, Nystrom S, Gilljam M, Stellan B, Applequist SE, Alici E. Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. Hum Gene Ther. 2012; 23 (10): 1090–100. DOI: 10.1089/hum.2012.080. PubMed PMID: 22779406.

References

1. Restifo NP, Dudley ME, Rosenberg SA. Adoptive immunotherapy for cancer: harnessing the T cell response. Nat Rev Immunol. 2012; 12 (4): 269–81. DOI: 10.1038/nri3191. PubMed PMID: 22437939.
2. Zah E, Lin MY, Silva-Benedict A, Jensen MC, Chen YY. T Cells Expressing CD19/CD20 Bispecific Chimeric Antigen Receptors Prevent Antigen Escape by Malignant B Cells. Cancer immunology research. 2016; 4 (6): 498–508. DOI: 10.1158/2326-6066.CIR-15-0231. PubMed PMID: 27059623.
3. Olden BR, Cheng Y, Yu JL, Pun SH. Cationic polymers for non-viral gene delivery to human T cells. J Control Release. 2018; (282): 140–7. DOI: 10.1016/j.jconrel.2018.02.043. PubMed PMID: 29518467.
4. Zhang Z, Qiu S, Zhang X, Chen W. Optimized DNA electroporation for primary human T cell engineering. BMC Biotechnol. 2018; 18 (1): 4. DOI: 10.1186/s12896-018-0419-0. PubMed PMID: 29378552.
5. Tumaini B, Lee DW, Lin T, Castiello L, Stroncek DF, Mackall C et al. Simplified process for the production of anti-CD19-CAR-engineered T cells. Cytotherapy. 2013; 15 (11): 1406–15. DOI: 10.1016/j.jcyt.2013.06.003. PubMed PMID: 23992830.
6. Yagita M, Huang CL, Umehara H, Matsuo Y, Tabata R, Miyake M et al. A novel natural killer cell line (KHYG-1) from a patient with aggressive natural killer cell leukemia carrying a p53 point mutation. Leukemia. 2000; 14 (5): 922–30. PubMed PMID: 10803526.
7. Gong JH, Maki G, Klingemann HG. Characterization of a human cell line (NK-92) with phenotypical and functional characteristics of activated natural killer cells. Leukemia. 1994; 8 (4): 652–8. PubMed PMID: 8152260.
8. Matsuo Y, Drexler HG. Immunoprofiling of cell lines derived from natural killer-cell and natural killer-like T-cell leukemia-lymphoma. Leuk Res. 2003; 27 (10): 935–45. PubMed PMID: 12860014.
9. Klingemann HG, Wong E, Maki G. A cytotoxic NK-cell line (NK-92) for ex vivo purging of leukemia from blood. Biol Blood Marrow Transplant. 1996; 2 (2): 68–75. PubMed PMID: 9118301.
10. Zhang J, Sun R, Wei H, Zhang J, Tian Z. Characterization of interleukin-15 gene-modified human natural killer cells: implications for adoptive cellular immunotherapy. Haematologica. 2004; 89 (3): 338–47. PubMed PMID: 15020274.
11. Chen Y, You F, Jiang L, Li J, Zhu X, Bao Y et al. Gene-modified NK-92MI cells expressing a chimeric CD16-BB-zeta or CD64-BB-zeta receptor exhibit enhanced cancer-killing ability in combination with therapeutic antibody. Oncotarget. 2017; 8 (23): 37128–39. DOI: 10.18632/oncotarget.16201. PubMed PMID: 28415754.
12. Suck G, Odendahl M, Nowakowska P, Seidl C, Wels WS, Klingemann HG et al. NK-92: an 'off-the-shelf therapeutic' for adoptive natural killer cell-based cancer immunotherapy. Cancer Immunol Immunother. 2016; 65 (4): 485–92. DOI: 10.1007/s00262-015-1761-x. PubMed PMID: 26559813.
13. Boissel L, Betancur M, Lu W, Wels WS, Marino T, Van Etten RA et al. Comparison of mRNA and lentiviral based transfection of natural killer cells with chimeric antigen receptors recognizing lymphoid antigens. Leuk Lymphoma. 2012; 53 (5): 958–65. DOI: 10.3109/10428194.2011.634048. PubMed PMID: 22023526.
14. Humbert JM, Frecha C, Amirache Bouafia F, N'Guyen TH, Boni S, Cosset FL et al. Measles virus glycoprotein-pseudotyped lentiviral vectors are highly superior to vesicular stomatitis virus G pseudotypes for genetic modification of monocyte-derived dendritic cells. J Virol. 2012; 86 (9): 5192–203. DOI: 10.1128/JVI.06283-11. PubMed PMID: 22345444.
15. Frecha C, Costa C, Negre D, Gauthier E, Russell SJ, Cosset FL et al. Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. Blood. 2008; 112 (13): 4843–52. DOI: 10.1182/blood-2008-05-155945. PubMed PMID: 18812471.
16. Funke S, Maisner A, Muhlebach MD, Koehl U, Grez M, Cattaneo R et al. Targeted cell entry of lentiviral vectors. Mol Ther. 2008; 16 (8): 1427–36. DOI: 10.1038/mt.2008.128. PubMed PMID: 18578012.
17. Kneissl S, Abel T, Rasbach A, Brynza J, Schneider-Schaulies J, Buchholz CJ. Measles virus glycoprotein-based lentiviral targeting vectors that avoid neutralizing antibodies. PLoS ONE. 2012; 7 (10): e46667. DOI: 10.1371/journal.pone.0046667. PubMed PMID: 23071609.
18. Ou W, Marino MP, Suzuki A, Joshi B, Husain SR, Maisner A et al. Specific targeting of human interleukin (IL)-13 receptor alpha2-positive cells with lentiviral vectors displaying IL13. Human gene therapy methods. 2012; 23 (2): 137–47. DOI: 10.1089/hgtb.2012.054. PubMed PMID: 22612657.
19. Marino MP, Panigaj M, Ou W, Manirarora J, Wei CH, Reiser J. A scalable method to concentrate lentiviral vectors pseudotyped with measles virus glycoproteins. Gene Ther. 2015; 22 (3): 280–5. DOI: 10.1038/gt.2014.125. PubMed PMID: 25608718.
20. Sutlu T, Nystrom S, Gilljam M, Stellan B, Applequist SE, Alici E. Inhibition of intracellular antiviral defense mechanisms augments lentiviral transduction of human natural killer cells: implications for gene therapy. Hum Gene Ther. 2012; 23 (10): 1090–100. DOI: 10.1089/hum.2012.080. PubMed PMID: 22779406.

СОВРЕМЕННОЕ СОСТОЯНИЕ ХИРУРГИИ АНЕВРИЗМ: «ПРОМИКРОХИРУРГИЧЕСКИЙ» ВЗГЛЯД

А. В. Дубовой[1], А. В. Бервицкий[1,2], А. Спаллоне[3] ✉

[1] Федеральный центр нейрохирургии, Новосибирск

[2] Московский медико-стоматологический университет имени Е. И. Евдокимова, Москва

[3] NCL- Neuromed, Институт нейрологии, Рим, Италия

Современные способы лечения пациентов с внутричерепными аневризмами являются предметом дискуссий между сторонниками традиционной микрохирургической техники и относительно нового эндоваскулярного лечения. В статье представлен опыт нейрохирургов — сторонников открытой микрохирургии. Сложные аневризмы задней циркуляции в настоящее время, как правило, оперируются эндоваскулярно, в то время как аневризмы переднего бассейна могут быть вылечены обоими методами, а для аневризм средней мозговой артерии и дистальных аневризм передней мозговой артерии лучше подходит микрохирургия. Техническое усовершенствование и, вероятно, снижение стоимости эндоваскулярных устройств будут способствовать тенденции к использованию эндоваскулярного метода. Однако потребность в хорошо подготовленных микрососудистых хирургах, на наш взгляд, останется, и надлежащая подготовка будущих поколений таких специалистов в условиях снижения числа пациентов и случаев открытых хирургических вмешательств представляет собой серьезную проблему для нейрохирургического сообщества, решение которой предстоит найти.

Ключевые слова: внутричерепные аневризмы, микрохирургия, реваскуляризация головного мозга, эндоваскулярное лечение

✉ **Для корреспонденции:** Альдо Спаллоне
ул. Патрика, д. 15, г. Рим, Италия, 00178; segreteria1@nclroma.it

Статья получена: 28.06.2018 **Статья принята к печати:** 21.09.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.093

MODERN ANEURYSM SURGERY: A PRO-OPEN SURGERY VIEW

Dubovoy AV[1], Bervitskiy AV[2], Spallone A[3] ✉

[1] Federal Neurosurgical Center, Novosibirsk, Novosibirsk

[2] Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry, Moscow

[3] NCL-Neuromed Institute of Neurological Sciences, Rome, Italy

Modern management of intracranial aneurysms is matter of great debate between supporters of “traditional” microsurgical treatment and those of relatively new endovascular management. This paper briefly reports the experience of two experienced microvascular “traditional” neurosurgeons who shares the same management philosophy favouring open microsurgery in the modern era in which endovascular management is becoming fashionable. Difficult posterior circulation aneurysms are nowadays as a rule managed endovascularly, whilst anterior circulation aneurysms can be treated with both techniques, and MCA as well as distal ACA aneurysms are better treated microsurgically. Technical refinement and — hopefully- lower cost of endovascular devices will favour a trend of prevailing use of endovascular method in the future. However the need for well-prepared microvascular surgeon will always be there, and proper training of future generations of microvascular surgeons in a setting of decreasing number of patients and open surgical casuistics represents a big challenge for the neurosurgical community, to which an answer should be given.

Keywords: Intracranial aneurysms, microsurgery, cerebral revascularization, endovascular treatment, flow diverters, management guidelines, training

✉ **Correspondence should be addressed:** Aldo Spallone
Via Patrica 15, Rome, Italy, 00178; segreteria1@nclroma.it

Received: 28.06.2018 **Accepted:** 21.09.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.093

Оптимальное лечение пациентов с внутричерепными аневризмами по-прежнему остается предметом дискуссии. Введение в клиническую практику эндоваскулярных методов после пионерской работы Сербиненко [1] и его группы [2–5] стимулировало, как исследователей, так и индустрию, к разработке все более сложных технологических элементов, спиралей [6] и позднее поток-перенаправляющих стентов [7–9] с целью выключения аневризмы из кровотока и/или создания условий для ее тромбирования одновременно со снижением стресса у пациента и инвазивности вмешательства.

Однако, несмотря на несколько крупных клинических исследований, окончательного заключения не было сделано [6, 10–18]. На самом деле опыт лечащего хирурга, будь то «классический» сосудистый нейрохирург или эндоваскулярный хирург, по-видимому, является важнейшим определяющим фактором для выбора лечебной стратегии в каждом конкретном случае.

Личный опыт открытых вмешательств в сложной сосудистой нейрохирургии, по-видимому, является необходимым условием для конкуренции с «восходящими эндоваскулярными звездами». Это положение дел может измениться в будущем: если количество оперированных открыто пациентов будет уменьшаться, возникнут затруднения с адекватной подготовкой будущих сосудистых нейрохирургов, работающих открытым способом, и это

сформирует замкнутый круг, после чего открытая хирургия аневризм будет постепенно исчезать из практики.

Тем не менее это необязательно должно произойти. Один из авторов (AC) был участником *Cooperative Study on aneurysm surgery* в 1980-е гг. [19] и считает, что открытая хирургия будет также играть большую роль в лечении пациентов с аневризмами. После опыта совместной работы с нейрохирургами Федерального центра нейрохирургии г. Новосибирска (Россия) он смог проанализировать результаты лечебного протокола, который отдает предпочтение открытой хирургии для пациентов с аневризмами, что совпадает с его практикой в Риме.

Результаты философии лечения большой серии пациентов с аневризмами

За 3,5-летний период, начиная с января 2014 г., авторы прооперировали 925 пациентов. Все операции были выполнены одним из авторов: либо АД, либо старшим AS. В табл. 1 представлены основные демографические данные пациентов.

Лечебный протокол был схожим в обоих учреждениях, предпочтение отдавалось открытой хирургии. Разорвавшиеся аневризмы, когда это было возможно, оперировали в остром периоде. Эндоваскулярный койлинг с баллон- или стент-ассистенцией и, в последнее время, имплантации поток-перенаправляющих стентов проводили опытные эндоваскулярные специалисты, которые рутинно участвовали в планировании лечения, на консультативной основе (в Риме) или в качестве непосредственного исполнителя (в Новосибирске).

Эндоваскулярное лечение было в основном зарезервировано почти для всех аневризм задней циркуляции. Исключение из этого правила составили аневризмы задней нижней мозжечковой артерии (ЗНМА), которые оперировали микрохирургически, хотя иногда (шесть случаев) их лечили и эндоваскулярно. Для лечения пациентов с аневризмами переднего отдела виллизиева круга, как правило, использовали открытый метод, если не было соматических противопоказаний к краниотомии. Фузиформные и гигантские аневризмы подвергали тщательной оценке в каждом конкретном случае и лечили поток-перенаправляющими стентами, если невозможно было применить треппинг или резекцию аневризмы с предшествующей реваскуляризацией дистального русла. В частности, гигантские аневризмы кавернозного отдела внутренней сонной артерии (ВСА) выключали путем перевязки сонной артерии с предшествующим созданием экстра-интракраниального микроанастомоза, если были обнаружены признаки компрессии черепно-мозговых нервов (ЧМН) в кавернозном синусе, а если они были бессимптомными, то применяли поток-перенаправляющие стенты. Аневризмы передней соединительной артерии (ПСА) лечили эндоваскулярно только в избранных случаях.

Что касается реваскуляризации, то если поверхностная височная артерия (ПВА) была достаточного размера, то выполняли микроанастомоз ПВА–М3 в глубине латеральной щели. В противном случае проводили высокопоточное шунтирование с использованием трансплантата лучевой артерии либо в М2-сегмент средней мозговой артерии (СМА) (28 случаев), либо в Р2-сегмент задней мозговой артерии (ЗМА) (1 случай). У четырех пациентов был выполнен анастомоз бок в бок между А3, и у одного пациента был сформирован анастомоз ЗНМА–ЗНМА. Как правило, формирование анастомозов проводили перед окклюзией несущей артерии, треппингом аневризмы или для дополнения кровотока в случае ожидаемого длительного временного пережатия несущей аневризму артерии.

Поток-перенаправляющие стенты в случаях сложных поражений базилярной артерии применяли только после взвешенного обсуждения всех альтернативных вариантов лечения — из-за известного риска компрометирования перфорантных артерий с использованием этой техники. На рис. 1 представлен алгоритм принятия решения, используемый в настоящее время.

Как правило, эндоваскулярное лечение принимали возможным, только если соотношение купол-шейка было не меньше 2 : 1. В противном случае открытое лечение считали обязательным. Очевидно, что другие гемодинамические и геометрические факторы также учитывали при принятии решения о том, какой тип операции будет лучшим для пациента.

Исходы хирургического лечения оценивались через год после операции посредством очного осмотра или телефонного звонка с использованием модифицированной шкалы Ренкина (mRS). Хорошим исход считали в случае, если оценка по mRS равна 0–2 балла, неудовлетворительным — 3–5 баллов.

Характеристики пациентов и исходы

Среди пациентов было 312 (33,7%) мужчин и 613 (66,3%) женщин. Возраст варьировал от 1 до 84 лет и составлял в среднем 58 лет. Разрыв аневризмы был установлен у 286 пациентов (30,9%) и 64 из них (6,9%) были оперированы в остром периоде. У 184 пациентов (19,9%) были выявлены множественные аневризмы, таким образом, всего пролечено 1162 пациента с аневризмами, из которых 119 (12,8%) можно отнести к большим и гигантским. Аневризмы были локализованы на ВСА в 480 случаях (41,3%), в комплексе передней мозговой — передней соединительной артерий (ПМА–ПСА) — в 231 случае (19,8%), на СМА — в 290 случаях (24,9%), на ЗМА — в 20 случаях (1,7%), на основной артерии (ОА) — в 95 случаях (8,1%), на верхней мозжечковой артерии (ВМА) — в 23 случаях (2%), на передней нижней мозжечковой артерии (ПНМА) — в 4 случаях (0,5%) и на ЗНМА — в 19 случаях (1,7%). Для 417 аневризм (36%) применили эндоваскулярный метод, для 740 (63,6%) — микрохирургию, в 5 (0,4%) случаях — комбинированное лечение (эндоваскулярная окклюзия + реваскуляризация). Выключение аневризмы в 99 (10,7%) случаях было дополнено проведением реваскуляризации посредством 106 различных анастомозов: у 15 пациентов были выполнены интра-интракраниальные микроанастомозы (ИИКМА), у 60 — анастомоз ПВА-М3, у 2 сформирован анастомоз между верхнечелюстной артерией (ВЧА) и СМА со вставочным шунтом из лучевой артерии, а в 29 случаях выполнен высокопоточный обходной шунт.

Таблица 1. Демографические данные пациентов

Возраст (годы)	58,1 (184 года)
Пол (м/ж)	312 (33,7%) / 613 (66,3%)
С разрывом	286 (30,9%)
Без разрыва	640 (69,1%)
Острое САК	64 (6,9%)

Примечание: САК — субарахноидальное кровоизлияние.

Результаты хирургического лечения оценивали через год. Среди 861 пациента без разрыва 842 (97,8%) пациента имели оценку по mRS 0–2 балла, у 17 (2%) пациентов 3–5, двое пациентов умерло (0,2%). Из 64 пациентов, оперированных в остром периоде САК, хороший результат (0–2 балла по mRS) был достигнут в 51 случае (79,6%), 9 пациентов (14%) остались инвалидами (3–5 баллов по mRS) и 4 пациента (6,4%) умерли. Основные характеристики аневризм, данные об условиях лечения и результатах представлены в табл. 2.

Обсуждение

В последнее десятилетие развития сосудистой нейрохирургии шла активная дискуссия на тему лучшего способа лечения пациентов с внутричерепными аневризмами: открытым доступом или эндоваскулярно. Усовершенствование технологии вместе с увеличением опыта [7–9] значительно склонило мнение общей нейрохирургической аудитории к тому, что открытая хирургия аневризм близится к своему концу. Это приводит к двум очевидным последствиям: уменьшению числа случаев, оперируемых открыто; и как следствие, уменьшению появления возможностей для адекватного обучения новых поколений хирургов основам и тонкостям сосудистой нейрохирургии. С одной стороны, тщательная оценка результатов эндоваскулярной хирургии даже при использовании самых современных технологий показывает, что этот способ не панацея и еще можно рассмотреть альтернативные методы лечения, в частности в случае возникновения сложных аневризм.

Оба автора статьи (АД, АС) осознают, что эндоваскулярное лечение может в будущем стать методом выбора для лечения пациентов с этой патологией, но при этом потребуется дальнейшее технологическое развитие устройств, а также, что немаловажно, значительное снижение издержек.

С другой стороны, на сегодняшний день открытая хирургия по-прежнему играет значительную, возможно, ведущую роль, по крайней мере, для лечения пациентов с аневризмами переднего отдела виллизиева круга [20–23]. Следовательно, адекватная подготовка будущих специалистов, возможно, унификация критериев обучения между различными странами вкупе с надлежащим подбором обучаемых, которые должны быть достаточно одаренными и умелыми для сложной микрохирургии, являются обязанностью нынешнего нейрохирургического сообщества.

В задачи данной статьи не входит подробное обсуждение конкретных аспектов протокола лечения, используемого на сегодняшний день. Хотелось только подчеркнуть, что он основан на доступной эпидемиологии и клинических рекомендациях, предоставляет концептуальный приоритет микрохирургии с ее техническими возможностями, включая различные методы реваскуляризации. Эндоваскулярная техника при этом может быть использована в случаях с определенными показаниями.

Современное состояние

Изложенные результаты были вполне сопоставимы с результатами недавно проведенного хирургического лечения крупнейших серий пациентов с внутричерепными аневризмами, в которых были использованы оба метода. Например, с результатами лечения большой серии пациентов с внутричерепными аневризмами, выключенных микрохирургическим путем, значительная часть которых имела большой и гигантский размер [24]. На тот момент хирургическая реваскуляризация считалась вехой в лечении пациентов со сложными аневризмами. Основной момент — это появление своего рода соглашения между специалистами по микрохирургии и эндоваскулярными хирургами, в котором главенствующая роль в лечении пациентов с такой сложной патологией отводится открытой хирургии. В нашей среде было достигнуто согласие в отношении того, что эндоваскулярное лечение будет использовано для пациентов с аневризмами неблагоприятной

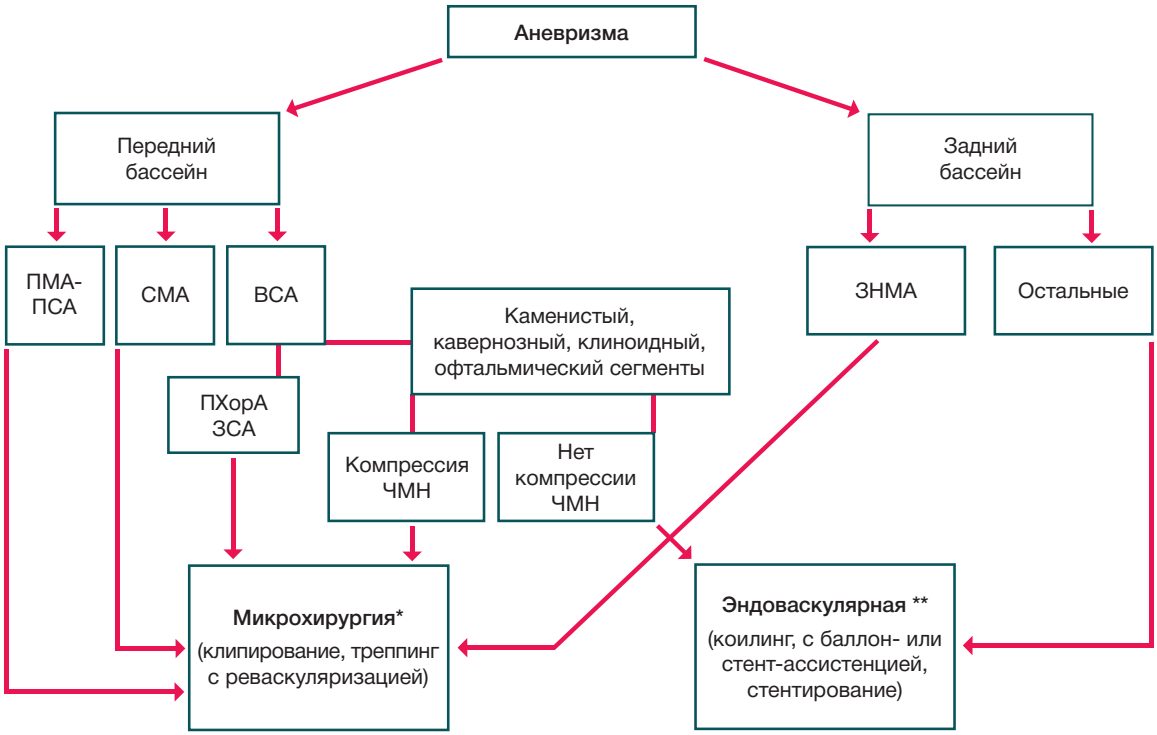


Рис. 1. Алгоритм принятия решения, основанный на локализации аневризм. * — за исключением случаев соматических противопоказаний к открытой хирургии или индивидуального выбора пациента; ** — кроме случаев аллергических реакций на контраст; ПхорА — передняя хороидальная артерия

геометрии (для которых выполнение реваскуляризации не могло гарантировать отсутствие возникновения отсроченных ишемических осложнений), а также для аневризм задней циркуляции.

Можно утверждать, что применение конкретного алгоритма отбора пациентов привело к уменьшению количества операций по поводу разорвавшихся аневризм, в частности в остром периоде кровоизлияния. Однако, если все же анализировать группу пациентов, оперированных в остром периоде, результаты остаются очень хорошими. Опять стоит отметить, что мы не можем недооценивать роль правильно применяемых методов реваскуляризации при лечении пациентов со сложными аневризмами, что подчеркивается в ранних работах [24] и подтверждено совсем недавно [25]. Такой подход, на наш взгляд, позволил нам получить хорошие результаты в ряде очень сложных случаев. При этом ключевое значение надлежащей практической подготовки специалистов нельзя переоценить.

В одном из недавно опубликованных критических обзоров современных подходов лечения пациентов с аневризмами авторы предположили, что «баланс должен поддерживаться между технической виртуозностью и безопасностью процедуры как при открытых, так и при эндоваскулярных операциях» [26]. Актуальной остается проблема организации качественной подготовки специалистов, так как для этого требуется достаточное количество пациентов, а на сегодняшний день наблюдается тенденция к снижению числа открытых процедур. Опыт показывает, что хорошо подготовленные сосудистые нейрохирурги могут достичь хороших результатов, сравнимых с опубликованными результатами серий операций пациентов с аневризмами, даже если преимущество при выборе отдается открытому методу.

Микрохирургия: рекомендации на будущее

Возрастные изменения, влияющие на мануальные навыки, обусловлены физиологически, но их проявление индивидуально, поэтому способность оперировать сохраняется у всех по-разному и возраст, до которого нейрохирурги могут заниматься микрохирургией, варьирует. Старший автор (АС) 1952 г. рождения решил отказаться от микрохирургических вмешательств около двух лет назад. Возможно, что-либо подобное критерию «самоконтроля степени тремора» можно было бы рассмотреть для объективной проверки технической способности каждого отдельного хирурга безопасно выполнять деликатные микрососудистые процедуры, но это предложение не получило бы широкого признания. Кроме того, относительно обучения в целом, следует отметить, что первый автор добился объективно высокого уровня технических навыков, долго тренировавшись на биологическом и трупном материале. При отборе кандидатов на роль «открытого» нейрохирурга необходимо очень тщательно оценивать индивидуальные характеристики (твердая рука, уравновешенность, сильный эмоциональный контроль). Следует также рассмотреть возможность введения курса обучения по объединенной специальности на открытого и эндоваскулярного хирурга, как эксперта по сосудистой нейрохирургии, сочетающего достоинства обоих методов. Но опять стоит повторить, что для обучения открытой сосудистой нейрохирургии по-прежнему будет необходимо достаточное количество материала, в том числе потому, что в настоящее время нет никакой адекватной лабораторной модели, позволяющей имитировать реальный клинический случай хирургии аневризмы.

ВЫВОДЫ

Открытая сосудистая нейрохирургия, если она проводится по показаниям хорошо подготовленными нейрохирургами, еще далека от своего исчезновения. Подготовка новых поколений врачей — непростая задача. В будущем, когда ожидается значительное техническое усовершенствование эндоваскулярных устройств, оптимальным решением будет по-прежнему оставить место для «открытых» сосудистых нейрохирургов или развития «двойной» специальности как открытого, так и эндоваскулярного эксперта.

Таблица 2. Характеристики аневризм, проведенные операции и результаты

Общее число аневризм	1162			
Большие и гигантские аневризмы	119 (12,8%)			
Локализация	Всего	Эндоваскулярно	Микрохирургия	Комбинированно
ВСА	480 (41,3%)	251	228	1
ПМА-ПСА	231 (19,8%)	16	215	
СМА	290 (24,9%)	23	264	3
ЗМА	20 (1,7%)	18	2	
ОА	95 (8,1%)	84	10	1
ВМА	23 (2%)	15	8	
ПНМА	4 (0,4%)	4		
ЗНМА	19 (1,7%)	6	13	
Реваскуляризация				
ИИКМА	15			
ЭИКМА	60			
С ВЧА	2			
Высокопоточные	29			
Результаты	Всего	Без разрыва (n = 861)	Острое САК (n = 64)	
0–2 балла по mRS	893	842	51	
3–5 балла по mRS	26	17	9	
Летальный исход	6	2	4	

Литература

1. Serbinenko FA. Balloon catheterization and occlusion of major cerebral vessels. J Neurosurg. 1974 Aug; 41 (2): 125–45.
2. Serbinenko FA. Balloon occlusion of saccular aneurysms of the cerebral arteries. [Article in Russian] Vopr Neirokhir. 1974 Jul-Aug; (4): 8–15.
3. Serbinenko FA. 7-year experience in endovascular surgery [Article in German]. Zentralbl Neurochir. 1977; 38 (2): 141–4.
4. Serbinenko FA. Six hundred endovascular neurosurgical procedures in vascular pathology. A ten-year experience. Acta Neurochir Suppl (Wien). 1979; 28 (1): 310–1.
5. Serbinenko FA, Filatov JM, Spallone A, Tchurilov MV, Lazarev VA. Management of giant intracranial ICA aneurysms with combined extracranial-intracranial anastomosis and endovascular occlusion. J Neurosurg. 1990 Jul; 73 (1): 57–63.
6. Li H, Pan R, Wang H, Rong X, Yin Z, Milgrom DP et al. Clipping versus coiling for ruptured intracranial aneurysms: a systematic review and meta-analysis. Stroke. 2013 Jan; 44 (1): 29–37.
7. Kabbasch C, Mpotsaris A, Behme D, Dorn F, Stavrinou P, Liebig T. Pipeline Embolization Device for Treatment of Intracranial Aneurysms-The More, the Better? A Single-center Retrospective Observational Study. J Vasc Interv Neurol. 2016 Oct; 9 (2): 14–20.
8. Raymond J, Gentric JC, Darsaut TE, Iancu D, Chagnon M, Weill A et al. Flow diversion in the treatment of aneurysms: a randomized care trial and registry. J Neurosurg. 2017 Sep; 127 (3): 454–62. DOI: 10.3171/2016.4.JNS152662. Epub 2016 Nov 4.
9. Brinjikji W, Lanzino G, Cloft HJ, Siddiqui AH, Kallmes DF. Risk Factors for Hemorrhagic Complications following Pipeline Embolization Device Treatment of Intracranial Aneurysms: Results from the International Retrospective Study of the Pipeline Embolization Device. AJNR Am J Neuroradiol. 2015 Dec; 36 (12): 2308–13.
10. Zhang X, Li L, Hong B, Xu Y1, Liu Y, Huang Q et al. A Systematic Review and Meta-analysis on Economic Comparison between Endovascular Coiling versus Neurosurgical Clipping for Ruptured Intracranial Aneurysms. World Neurosurg. 2018 Feb 21; pii: S1878-8750(18)30349-8.
11. Alreshidi M, Cote DJ, Dasenbrock HH, Acosta M, Can A, Doucette J et al. Coiling Versus Microsurgical Clipping in the Treatment of Unruptured Middle Cerebral Artery Aneurysms: A Meta-Analysis. Neurosurgery. 2018 Feb 9. DOI: 10.1093/neuros/nyx623. [Epub ahead of print]
12. Fotakopoulos G, Tsianaka E, Fountas K, Makris D, Spyrou M, Hernesniemi J. Clipping Versus Coiling in Anterior Circulation Ruptured Intracranial Aneurysms: A Meta-Analysis. World Neurosurg. 2017 Aug; (104): 482–8.
13. Xia ZW, Liu XM, Wang JY, Cao H, Chen FH, Huang J et al. Coiling Is Not Superior to Clipping in Patients with High-Grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review and Meta-Analysis. World Neurosurg. 2017 Feb; (98): 411–20.
14. Ruan C, Long H, Sun H, He M, Yang K, Zhang H et al. Endovascular coiling vs. surgical clipping for unruptured intracranial aneurysm: A meta-analysis. Br J Neurosurg. 2015; 29 (4): 485–92.
15. Suzuki M, Yoneda H, Ishihara H, Shirao S, Nomura S, Koizumi H et al. Adverse events after unruptured cerebral aneurysm treatment: a single-center experience with clipping/coil embolization combined units. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2015 Jan; 24 (1): 223–31.
16. Hwang US, Shin HS, Lee SH, Koh JS. Decompressive Surgery in Patients with Poor-grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Clipping with Simultaneous Decompression Versus Coil Embolization Followed by Decompression. J Cerebrovasc Endovasc Neurosurg. 2014 Sep; 16 (3): 254–61.
17. Frontera JA, Moatti J, de los Reyes KM, McCullough S, Moyle H, Bederson JB et al. Safety and cost of stent-assisted coiling of unruptured intracranial aneurysms compared with coiling or clipping. J Neurointerv Surg. 2014 Jan; 6 (1): 65–71.
18. Brunken M, Kehler U, Fiehler J, Leppien A, Eckert B. Coiling vs. clipping: hospital stay and procedure time in intracranial aneurysm treatment. [Article in German] Rofo. 2009 Oct; 181 (10): 989–95.
19. Pasqualin A, Kassel NF, Torner JC, Benedetti A, Da Pian R, Guidetti B et al. Results of treatment (Article). Journal of Neurosurgical Sciences. 1988; 32 (1): 25–38.
20. McDougall CG, Spetzler RF, Zabramski JM, Partovi S, Hills NK, Nakaji P et al. The Barrow Ruptured Aneurysm Trial. J Neurosurg. 2012 Jan; 116 (1): 135–44.
21. Spetzler RF1, McDougall CG, Albuquerque FC, Zabramski JM, Hills NK, Partovi S et al. The Barrow Ruptured Aneurysm Trial: 3-year results J Neurosurg. 2013 Jul; 119 (1): 146–57.
22. Spetzler RF, McDougall CG, Zabramski JM, Albuquerque FC, Hills NK et al. The Barrow Ruptured Aneurysm Trial: 6-year results. J Neurosurg. 2015 Sep; 123 (3): 609–17.
23. Spetzler RF, Zabramski JM, McDougall CG, Albuquerque FC, Hills NK, Wallace RC et al. Analysis of saccular aneurysms in the Barrow Ruptured Aneurysm Trial. J Neurosurg. 2018 Jan; 128 (1): 120–12.
24. Cantore G, Santoro A, Guidetti G, Delfinis CP, Colonnese C, Passacantilli E. Surgical treatment of giant intracranial aneurysms: current viewpoint. Neurosurgery. 2008 Oct; 63 (4) (Suppl 2): 279–90.
25. Tayebi Meybodi A, Huang W, Benet A, Kola O, Lawton MT. Bypass surgery for complex middle cerebral artery aneurysms: an algorithmic approach to revascularization. J Neurosurg. 2017 Sep; 127 (3): 463–79.
26. Rahal JP, Malek AM. Clip occlusion versus coil embolization for the treatment of cerebral aneurysms. J Neurosurg Sci. 2012 Sep; 56 (3): 175–90.

References

1. Serbinenko FA. Balloon catheterization and occlusion of major cerebral vessels. J Neurosurg. 1974 Aug; 41 (2): 125–45.
2. Serbinenko FA. Balloon occlusion of saccular aneurysms of the cerebral arteries. [Article in Russian] Vopr Neirokhir. 1974 Jul-Aug; (4): 8–15.
3. Serbinenko FA. 7-year experience in endovascular surgery [Article in German]. Zentralbl Neurochir. 1977; 38 (2): 141–4.
4. Serbinenko FA. Six hundred endovascular neurosurgical procedures in vascular pathology. A ten-year experience. Acta Neurochir Suppl (Wien). 1979; 28 (1): 310–1.
5. Serbinenko FA, Filatov JM, Spallone A, Tchurilov MV, Lazarev VA. Management of giant intracranial ICA aneurysms with combined extracranial-intracranial anastomosis and endovascular occlusion. J Neurosurg. 1990 Jul; 73 (1): 57–63.
6. Li H, Pan R, Wang H, Rong X, Yin Z, Milgrom DP et al. Clipping versus coiling for ruptured intracranial aneurysms: a systematic review and meta-analysis. Stroke. 2013 Jan; 44 (1): 29–37.
7. Kabbasch C, Mpotsaris A, Behme D, Dorn F, Stavrinou P, Liebig T. Pipeline Embolization Device for Treatment of Intracranial Aneurysms-The More, the Better? A Single-center Retrospective Observational Study. J Vasc Interv Neurol. 2016 Oct; 9 (2): 14–20.
8. Raymond J, Gentric JC, Darsaut TE, Iancu D, Chagnon M, Weill A et al. Flow diversion in the treatment of aneurysms: a randomized care trial and registry. J Neurosurg. 2017 Sep; 127 (3): 454–62. DOI: 10.3171/2016.4.JNS152662. Epub 2016 Nov 4.
9. Brinjikji W, Lanzino G, Cloft HJ, Siddiqui AH, Kallmes DF. Risk Factors for Hemorrhagic Complications following Pipeline Embolization Device Treatment of Intracranial Aneurysms: Results from the International Retrospective Study of the Pipeline Embolization Device. AJNR Am J Neuroradiol. 2015 Dec; 36 (12): 2308–13.
10. Zhang X, Li L, Hong B, Xu Y1, Liu Y, Huang Q et al. A Systematic

Review and Meta-analysis on Economic Comparison between Endovascular Coiling versus Neurosurgical Clipping for Ruptured Intracranial Aneurysms. World Neurosurg. 2018 Feb 21; pii: S1878-8750(18)30349-8.
11. Alreshidi M, Cote DJ, Dasenbrock HH, Acosta M, Can A, Doucette J et al. Coiling Versus Microsurgical Clipping in the Treatment of Unruptured Middle Cerebral Artery Aneurysms: A Meta-Analysis. Neurosurgery. 2018 Feb 9. DOI: 10.1093/neuros/nyx623. [Epub ahead of print]
12. Fotakopoulos G, Tsianaka E, Fountas K, Makris D, Spyrou M, Hernesniemi J. Clipping Versus Coiling in Anterior Circulation Ruptured Intracranial Aneurysms: A Meta-Analysis. World Neurosurg. 2017 Aug; (104): 482–8.
13. Xia ZW, Liu XM, Wang JY, Cao H, Chen FH, Huang J et al. Coiling Is Not Superior to Clipping in Patients with High-Grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Systematic Review and Meta-Analysis. World Neurosurg. 2017 Feb; (98): 411–20.
14. Ruan C, Long H, Sun H, He M, Yang K, Zhang H et al. Endovascular coiling vs. surgical clipping for unruptured intracranial aneurysm: A meta-analysis. Br J Neurosurg. 2015; 29 (4): 485–92.
15. Suzuki M, Yoneda H, Ishihara H, Shirao S, Nomura S, Koizumi H et al. Adverse events after unruptured cerebral aneurysm treatment: a single-center experience with clipping/coil embolization combined units. J Stroke Cerebrovasc Dis. 2015 Jan; 24 (1): 223–31.
16. Hwang US, Shin HS, Lee SH, Koh JS. Decompressive Surgery in Patients with Poor-grade Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage: Clipping with Simultaneous Decompression Versus Coil Embolization Followed by Decompression. J Cerebrovasc Endovasc Neurosurg. 2014 Sep; 16 (3): 254–61.
17. Frontera JA, Moatti J, de los Reyes KM, McCullough S, Moyle H, Bederson JB et al. Safety and cost of stent-assisted coiling of unruptured intracranial aneurysms compared with coiling or clipping. J Neurointerv Surg. 2014 Jan; 6 (1): 65–71.
18. Brunken M, Kehler U, Fiehler J, Leppien A, Eckert B. Coiling vs. clipping: hospital stay and procedure time in intracranial aneurysm treatment. [Article in German] Rofo. 2009 Oct; 181 (10): 989–95.
19. Pasqualin A, Kassel NF, Torner JC, Benedetti A, Da Pian R, Guidetti B et al. Results of treatment (Article). Journal of Neurosurgical Sciences. 1988; 32 (1): 25–38.
20. McDougall CG, Spetzler RF, Zabramski JM, Partovi S, Hills NK, Nakaji P et al. The Barrow Ruptured Aneurysm Trial. J Neurosurg. 2012 Jan; 116 (1): 135–44.
21. Spetzler RF1, McDougall CG, Albuquerque FC, Zabramski JM, Hills NK, Partovi S et al. The Barrow Ruptured Aneurysm Trial: 3-year results. J Neurosurg. 2013 Jul; 119 (1): 146–57.
22. Spetzler RF, McDougall CG, Zabramski JM, Albuquerque FC, Hills NK et al. The Barrow Ruptured Aneurysm Trial: 6-year results. J Neurosurg. 2015 Sep; 123 (3): 609–17.
23. Spetzler RF, Zabramski JM, McDougall CG, Albuquerque FC, Hills NK, Wallace RC et al. Analysis of saccular aneurysms in the Barrow Ruptured Aneurysm Trial. J Neurosurg. 2018 Jan; 128 (1): 120–12.
24. Cantore G, Santoro A, Guidetti G, Delfinis CP, Colonnese C, Passacantilli E. Surgical treatment of giant intracranial aneurysms: current viewpoint. Neurosurgery. 2008 Oct; 63 (4) (Suppl 2): 279–90.
25. Tayebi Meybodi A, Huang W, Benet A, Kola O, Lawton MT. Bypass surgery for complex middle cerebral artery aneurysms: an algorithmic approach to revascularization. J Neurosurg. 2017 Sep; 127 (3): 463–79.
26. Rahal JP, Malek AM. Clip occlusion versus coil embolization for the treatment of cerebral aneurysms. J Neurosurg Sci. 2012 Sep; 56 (3): 175–90.

ИДЕНТИФИКАЦИЯ BRCA1/2-МУТАЦИЙ ПРИ РАКЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ ТЕХНОЛОГИИ ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНОГО СЕКВЕНИРОВАНИЯ

И. Ф. Стеценко[1], А. Ю. Красненко[1,2], У. С. Станоевич[3], А. А. Мещеряков[4], И. К. Воротников[4], О. С. Дружиловская[1], В. А. Белова[1], А. В. Чуров[1,5] ✉

[1] Институт общей генетики имени Н. И. Вавилова РАН, Москва
[2] ООО «Генотек», Москва
[3] Российский научный центр рентгенорадиологии МЗ РФ, Москва
[4] Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н. Н. Блохина, Москва
[5] Институт биологии, Карельский научный центр (ИБ КарНЦ РАН), Петрозаводск

Рак молочной железы (РМЖ) является одной из наиболее распространенных форм солидных опухолей. Анализ особенностей патогенеза РМЖ на молекулярном уровне с применением современных методов генетического анализа и на разных стадиях заболевания позволяет получить новые данные для их дальнейшего применения в клинической практике. Молекулярное профилирование с применением технологий высокопроизводительного секвенирования все чаще применяют в качестве клинического теста при подборе таргетных препаратов для лечения пациентов с высокорезистентными к терапии опухолями при РМЖ. Целью работы было провести таргетное секвенирование генов *BRCA1* и *BRCA2* в составе панели онкогенов. Из 66 образцов ДНК пациентов с опухолями молочной железы, мутации BRCA1/2 обнаружены у 39 пацентов. Найдено 78 уникальных генетических вариантов, из них 30 мутаций в гене *BRCA1* и 48 мутаций в гене *BRCA2*. Идентифицировано 33 мутации, оказывающие влияние на сайты посттрансляционной модификации белков (PMT-мутации).

Ключевые слова: *BRCA1*, *BRCA2*, рак молочной железы, NGS, ДНК-секвенирование, мутация, персонализированная медицина

Финансирование: работа выполнена при финансовой поддержке государства в лице Минобрнауки России (идентификатор соглашения RFMEFI60716X0152).

✉ **Для корреспонденции:** Алексей Викторович Чуров
ул. Пушкинская, д. 11, г. Петрозаводск, 185035; achurou@yandex.ru

Статья получена: 03.12.2018 **Статья принята к печати:** 14.12.2018

DOI: 10.24075/vrgmu.2018.074

IDENTIFICATION OF BRCA1/2 MUTATIONS IN BREAST CANCER PATIENTS BY NEXT-GENERATION SEQUENCING

Stetsenko IF[1], Krasnenko AYu[1,2], Stanoevich US[3], Mescheryakov AA[4], Vorotnikov IK[4], Druzhilovskaya OS[1], Belova VA[1], Churov AV[1,5] ✉

[1] Vavilov Institute of General Genetics of the Russian Academy of Sciences, Moscow
[2] Genotek Ltd., Moscow
[3] Russian Scientific Center for X-ray Radiology of the Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow
[4] Blokhin Russian Cancer Research Centre, Moscow
[5] IB KarRC RAS, Petrozavodsk

Breast cancer is one of the most widespread forms of solid tumors. By analyzing the traits of breast cancer pathogenesis at the molecular level using modern genetic analysis techniques and at different stages of the disease new data can be obtained to be further utilized in clinical practice. Molecular profiling based on next-generation sequencing is being increasingly applied as a clinical test to select target drugs for treating breast cancer patients with tumors highly resistant to therapy. In this study, we performed targeted sequencing of *BRCA1* and *BRCA2* oncogenes. In the total of 66 DNA samples from patients with breast tumors, BRCA1/2 mutations were found in 39 patients. There were 78 unique genetic variants, including 30 mutations in *BRCA1* and 48 mutations in *BRCA2*. We identified 33 mutations affecting the sites of post-translational modification in proteins (PMT mutations).

Keywords: *BRCA1*, *BRCA2*, breast cancer, NGS, DNA-sequencing, mutation, personalized medicine

Funding: this work was supported by the Ministry of Education and Science of the Russian Federation (Project ID RFMEFI60716X0152).

✉ **Correspondence should be addressed:** Alexey V. Churov
Pushkinskaya 11, Petrozavodsk,185910; achurou@yandex.ru

Received: 03.12.2018 **Accepted:** 14.12.2018

DOI: 10.24075/brsmu.2018.074

Рак молочной железы (РМЖ) представляет собой одну из наиболее распространенных форм злокачественных новообразований, уступая лишь раку легкого и колоректальному раку. Заболеваемость РМЖ имеет тенденцию к росту во многих странах мира [1–4]. По этой причине ведущими задачами являются раннее выявление патологии и скрининг РМЖ.

Гены-супрессоры *BRCA1* и *BRCA2* играют важную роль в регуляции сигнальных путей, связанных с функционированием систем репарации ДНК. Мутации в этих генах связаны с повышенным риском развития РМЖ и некоторых других форм злокачественных опухолей.

Значительное количество мутаций, возникающих в опухолях, является соматическим и играет важную

роль как в патогенезе спорадического РМЖ, так и в развитии *de novo* резистентности к противоопухолевым лекарственным препаратам. Спорадические формы рака выявляют в среднем в 70–80% случаев, тогда как лишь 10% общего числа заболевших имеют наследуемые мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* [5].

На сегодняшний день одной из актуальных задач онкогенетики являются разработка и совершенствование подходов для эффективного выбора противоопухолевых препаратов, учитывающих молекулярно-генетические особенности развития опухолей.

Целью работы было определение спектра мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* при РМЖ с применением технологии высокопроизводительного секвенирования на платформе Illumina.

ПАЦИЕНТЫ И МЕТОДЫ

Материал исследования. Клиническая характеристика больных

Для проведения исследования была собрана коллекция образцов опухолей 66 пациенток со злокачественными новообразованиями молочной железы, проходивших стационарное лечение в Национальном медицинском исследовательском центре онкологии им. Н. Н. Блохина и ФГБУ «Российский научный центр рентгенорадиологии» МЗ РФ (Москва). Средний возраст больных составил 52,5 ± 9,7 лет. Критерии включения в исследование: возраст от 18 до 70 лет, женский пол, наличие клинически верифицированного диагноза РМЖ. Критерии исключения: наличие других форм новообразований в анамнезе, беременность. Стадию РМЖ устанавливали согласно системе классификации TNM [6]. В исследовании принимали участие пациентки со стадиями T1–3N0– 3M0–1. Работу проводили с соблюдением принципов добровольности и конфиденциальности. Для проведения исследования было получено разрешение Комитета по медицинской этике при ООО «Генотек» (протокол № 5 от 17 января 2018 г.). От всех пациенток получены информированные согласия на проведение исследования. Основные клинические характеристики больных представлены в табл. 1.

Выделение ДНК и контроль качества. Секвенирование панели онкогенов

Геномную ДНК выделяли из образцов опухолевой ткани с использованием набора реагентов DNeasy Blood and Tissue Kit (Qiagen; США) согласно протоколу производителя. Измерение концентрации полученных после выделения препаратов ДНК проводили на флуориметре Qubit 3.0 (Thermo Fisher Scientific; США). Дополнительно качество образцов ДНК оценивали с помощью электрофореза в 1%-м агарозном геле с добавлением этидиум бромида.

Библиотеки фрагментов ДНК готовили с использованием набора реагентов NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina (New England Biolabs; США). Баркодирование библиотек осуществляли с помощью ПЦР и двух наборов реагентов: NEBNext Ultra DNA Library Prep Kit for Illumina и NEBNext Multiplex Oligos for Illumina (Dual Index Primers Set 1, New England Biolabs; США). Для контроля качества полученных ДНК-библиотек проводили измерения на приборе Agilent Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies; США), используя набор реагентов High Sensitivity Kit в соответствии с протоколом компании-производителя.

Для обогащения кодирующих регионов генома опухоли использовали набор MYbaits Onconome KL v1.5 Panel (Mycroarray; США). Анализ проводили на

Таблица 1. Клиническая характеристика пациенток с раком молочной железы (*n* = 66)

Характеристика	Значение, абс. (%)
Возраст (лет)	52,5 ± 9,7
Основной диагноз	
Рак левой молочной железы	32 (48,5)
Рак правой молочной железы	32 (48,5)
Двусторонний рак	2 (3)
T-стадия опухоли (согласно TNM)	
T1	36 (54,5)
T2	29 (43,9)
T3	1 (1,5)
Наличие метастазов в лимфоузлах:	
без метастазов, M0	56 (84,8)
с метастазами, M1	10 (15,2)
Экспрессия рецепторов эстрогена (ER)	
ER+	53 (80,3)
ER–	13(19,7)
Экспрессия рецепторов прогестерона (PR)	
PR+	50 (75,8)
PR–	16 (24,2)
Экспрессия HER2/neu (Cerb-B2)	
Her2+	38 (57,6)
Her2–	28 (42,4)

Примечание: Значения представлены в виде (M ± SD) или в %; T1–T3 — стадии классификации опухоли согласно TNM; ER — экспрессия рецептора эстрогена; PR — экспрессия рецептора прогестерона; HER2/neu (Cerb-B2) — экспрессия рецептора 2-го типа эпидермального фактора роста человека.

высокопроизводительном геномном секвенаторе HiSeq 2500 (Illumina; США) методом парных прочтений участков длиной 100 нуклеотидов. Подготовку образцов и запуск осуществляли согласно протоколам Illumina.

Биоинформатическая обработка NGS-данных

Для биоинформатической обработки полученных при секвенировании NGS-данных применяли ранее разработанный алгоритм [7, 8]. На начальном этапе проводили оценку качества ридов, полученных при секвенировании ДНК с помощью программного обеспечения Cutadapt и картировали на референсный геном hg19 (GRCh37.p13) с помощью инструмента BWA (Burrows-Wheeler Aligner). Парные риды удаляли, используя специализированную команду rmdup в составе пакета программ SAMtools. Для обнаружения мутаций в составе массива NGS-данных применяли MuTect, при этом в качестве значимых вариантов рассматривали последовательности ДНК, число покрытий которых при секвенировании было не менее 12.

Уровень представленности мутации в образце определяли как долю (%) ридов в точке, которые поддерживают мутацию. Функциональный эффект обнаруженных мутаций оценивали с помощью базы данных ActiveDriverDB [9]. Визуализацию мутаций, оказывающих влияние на кодируемый белок, выполняли с помощью программы ProteinPaint [10].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами был проведен анализ наличия мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2* в образцах ДНК опухолей РМЖ (n = 66) с применением технологии высокопроизводительного

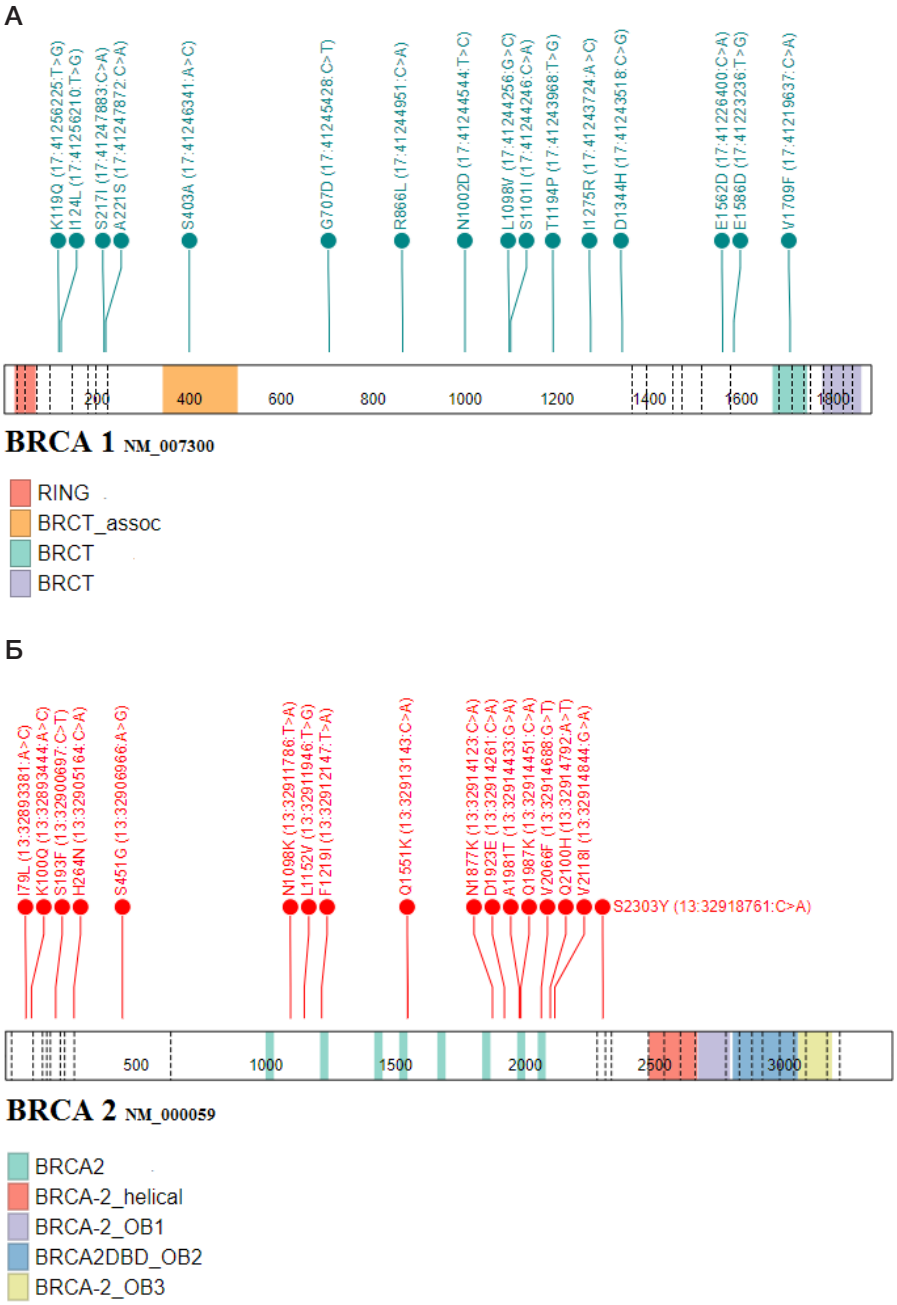


Рис. 1. Спектр мутаций*, оказывающих влияние на сайты посттрансляционной модификации белков (PMT-мутации), в генах *BRCA1* (**А**) и *BRCA2* (**Б**), у пациентов с РМЖ (n = 39). * — на основе предсказания эффектов мутаций, согласно ActiveDriveDB

Таблица 2. Мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2*, идентифицированные у пациентов с РМЖ

Ген	ID образца	Стадия РМЖ	Доля раковых клеток в образце 1, %	Представ-ленность мутации в образце, %	Покрытие в точке	РТМ-мутация	Эффект 2	Референсный номер 2	Каноническое обозначение
BRCA1	1	IIIA	20	52	235	нет	нет	Новая мутация	17:41246746:T>C
	2	IIA	9	30	117	нет	нет	rs1800744	17:41226488:C>A
	3	IA	70	4	106	нет	нет	Новая мутация	17:41251858:T>G
				3	115	да	distal	Новая мутация	17:41223236:T>G
				2	267	да	proximal	Новая мутация	17:41243968:T>G
				1	439	нет	нет	Новая мутация	17:41245560:C>A
	4	I	30	4	116	да	proximal	rs80357088 (dbSNP)	17:41247872:C>A
				1	685	да	proximal	rs80357192 (dbSNP)	17:41245428:C>T
	5	IIA	8	4	230	да	network-rewiring - motif loss	Новая мутация	17:41244256:G>C
	6	I	90	2	169	да	direct	Новая мутация	17:41244246:C>A
	7	IIA	21	2	250	нет	нет	Новая мутация	17:41244207:T>C
	8	IA	8	2	306	нет	нет	Новая мутация	17:41246576:A>C
	9	IA	6	2	270	да	distal	Новая мутация	17:41243724:A>C
	10	IA	32	2	142	да	proximal	Новая мутация	17:41256210:T>G
				2	142	да	distal	Новая мутация	17:41256225:T>G
				1	333	да	direct	Новая мутация	17:41246341:A>C
	11	IIB	95	2	166	да	proximal	BRCA (TCGA MC3)	17:41243518:C>G
				1	467	нет	нет	Новая мутация	17:41245516:C>A
	12	IA	98	1	202	да	distal	Новая мутация	17:41247883:C>A
	13	IA	15	1	660	да	network-rewiring - motif loss	Новая мутация	17:41244951:C>A
	14	IIB	35	1	444	нет	нет	Новая мутация	17:41245785:C>A
	15	I	12	1	569	нет	нет	Новая мутация	17:41245228:C>T
	16	IIB	12	1	351	нет	нет	Новая мутация	17:41245832:T>G
	17	IIA	57	1	413	нет	нет	Новая мутация	17:41245859:C>A
	18	IA	12	1	211	да	proximal	Новая мутация	17:41226400:C>A
	19	IIA	38	1	342	да	distal	rs786202665 (dbSNP)	17:41244544:T>C
	20	IIA	32	1	307	нет	нет	Новая мутация	17:41246752:C>A
	21	IA	35	1	336	да	distal	Новая мутация	17:41219637:C>A
				1	379	нет	нет	Новая мутация	17:41246125:T>A
	22	IIA	10	1	390	нет	нет	Новая мутация	17:41245026:C>A
BRCA2	9	IA	6	47	189	да	distal	Новая мутация	13:32914688:G>T
				2	210	да	distal	Новая мутация	13:32905164:C>A
	12	IA	98	6	471	нет	нет	rs28897716 (dbSNP)	13:32911295:G>A
				1	434	да	proximal	Новая мутация	13:32893381:A>C
	23	IA	15	4	100	нет	нет	Новая мутация	13:32906550:T>C
	24	I	50	3	63	нет	нет	rs55924966 (dbSNP)	13:32929408:G>A
	19	IIA	38	3	152	нет	нет	Новая мутация	13:32912843:G>T
				2	276	нет	нет	Новая мутация	13:32912258:C>A
	25	IA	65	2	319	нет	нет	Новая мутация	13:32910800:A>C
	14	IIB	35	2	316	да	direct	rs864622305 (dbSNP)	13:32900697:C>T
	7	IIA	21	2	251	нет	нет	Новая мутация	13:32944694:G>T
	26	IA	10	2	255	нет	нет	Новая мутация	13:32911260:A>T
				1	537	нет	нет	Новая мутация	13:32910800:A>C
	27	IIA	11	2	87	да	proximal	Новая мутация	13:32918761:C>A
				2	238	нет	нет	Новая мутация	13:32930703:C>A
	28	IIA	70	2	130	нет	нет	Новая мутация	13:32931930:G>T
				1	307	да	distal	Новая мутация	13:32914451:C>A
	29	I	1	2	262	нет	нет	Новая мутация	13:32910800:A>C

Окончание таблицы 2

	30	IIA	55	2	200	нет	нет	Новая мутация	13:32911499:C>A
				2	237	нет	нет	Новая мутация	13:32913030:A>C
				1	274	да	distal	Новая мутация	13:32914261:C>A
	10	IA	32	2	99	да	distal	Новая мутация	13:32893444:A>C
				2	179	нет	нет	Новая мутация	13:32907009:T>G
				2	188	да	proximal	Новая мутация	13:32911946:T>G
	4	I	30	2	807	нет	нет	Новая мутация	13:32914484:C>A
				1	323	нет	нет	Новая мутация	13:32899216:G>A
				1	747	нет	нет	Новая мутация	13:32915036:A>T
				1	279	нет	нет	Новая мутация	13:32930596:T>A
				1	285	нет	нет	Новая мутация	13:32930604:A>G
	21	IA	35	2	332	нет	нет	Новая мутация	13:32914234:C>A
				1	440	нет	нет	Новая мутация	13:32907309:C>A
	22	IIA	10	2	164	нет	нет	Новая мутация	13:32912375:C>A
				1	298	нет	нет	Новая мутация	13:32907051:A>T
				1	358	да	distal	Новая мутация	13:32914844:G>A
	2	IIA	9	2	165	нет	нет	Новая мутация	13:32968849:T>C
	31	IIIC	18	1	405	нет	нет	Новая мутация	13:32913099:A>C
				1	266	нет	нет	Новая мутация	13:32929173:C>A
	32	IIA	9	1	526	да	proximal	Новая мутация	13:32913143:C>A
				1	399	нет	нет	Новая мутация	13:32968988:C>A
	33	IIIA	10	1	233	да	distal	Новая мутация	13:32911786:T>A
	14	IA	15	1	362	нет	нет	Новая мутация	13:32936764:C>A
	34	IIA	14	1	371	да	distal	Новая мутация	13:32912147:T>A
	35	IB	5	1	246	нет	нет	Новая мутация	13:32913558:C>T
				1	434	да	distal	Новая мутация	13:32914792:A>T
	36	IIB	25	1	344	да	distal	Новая мутация	13:32914433:G>A
	37	IIB	80	1	569	да	distal	rs374326934 (dbSNP)	13:32914123:C>A
				1	275	нет	нет	Новая мутация	13:32937605:G>A
	1	IIIA	20	1	320	да	distal	Новая мутация	13:32906966:A>G
	38	I	10	1	439	нет	нет	Новая мутация	13:32913444:C>A
	39	IIA	18	1	262	нет	нет	Новая мутация	13:32930600:C>A
				1	363	нет	нет	Новая мутация	13:32936793:C>A

Примечание: [1] — по данным гистологического обследования; [2] — по данным ActiveDriveDB (https://www.activedriverdb.org/).

секвенирования на платформе Illumina. В результате биоинформатической обработки полученных NGS-данных мутации в генах *BRCA1* и *BRCA2* найдены у 39 (59,1%) из 66 пациентов с РМЖ. Всего в результате исследования было обнаружено 78 уникальных генетических вариантов, из них 30 мутаций в гене *BRCA1* и 48 мутаций в гене *BRCA2*. Среди всех мутаций 70 обнаруженных вариантов идентифицированы как новые мутации (89,7%). Список всех обнаруженных генетических вариантов представлен в табл. 2.

По результатам анализа, наиболее высокая частота отмечена для мутаций 17:41246746:T>C в гене *BRCA1* (52%) и 13:32914688:G>T в гене *BRCA2* (47%). Среди всех образцов наиболее часто встречалась мутация 13:32910800:A>C в гене *BRCA2*, идентифицированная в 10,7% (n = 3/28) опухолей, несущих мутации *BRCA2*. Мутации в обоих генах *BRCA1* и *BRCA2* обнаружены у 11 пациентов с РМЖ (16,7%; n = 66).

На основе аннотации по базам данных обнаружено 33 мутации (42,3%), влияющие на последовательность кодируемого белка, из них 16 в гене *BRCA1* и 17 в гене *BRCA2*. Мутации, оказывающие влияние на сайты посттрансляционной модификации белков (PMT-мутации), представлены на рис. 1.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Персонализированная таргетная терапия находит все более широкое применение в современной онкологии. Поэтому разработка высокочувствительного и экономически эффективного подхода для доступной рутинной диагностики опухолей является одной из приоритетных задач.

В настоящее время золотым стандартом для обнаружения мутаций принято считать секвенирование методом Сенджера, однако его диагностические возможности ограничены по сравнению с более современными системами для высокопроизводительного генетического анализа. Опухолевые клетки гистологически и генетически гетерогенны, что также создает преимущества для применения технологий на основе NGS, позволяющих разрабатывать эффективные биоинформатические алгоритмы как для детекции генетических вариантов в составе парных образцов опухолей и нормальной ткани,

так и в составе единичных биопсий, содержащих фракцию ДНК нормальных клеток.

Мутации ключевых онкогенов *BRCA1* и *BRCA2* при РМЖ — одни из наиболее частых и значимых молекулярных аберраций, анализ которых представляет интерес как для оценки риска развития опухоли, клинического прогноза при РМЖ, так и для предсказания эффективности применения противоопухолевых препаратов.

Ген *BRCA1* был идентифицирован в 1994 г. методом позиционного клонирования на длинном плече 17-й хромосомы. Второй ген — *BRCA2* был картирован и выделен на хромосоме 13q. Гены *BRCA1* и *BRCA2* являются супрессорными, характеризуются аутосомно-доминантным типом наследования и высокой пенетрантностью. Молекулярные исследования *BRCA1* и *BRCA2*, проведенные в последние годы, продемонстрировали наличие широкого спектра мутаций этих генов [5].

Международная база данных COSMIC [11] содержит свыше 900 соматических кодирующих мутаций гена *BRCA1* и свыше 1400 кодирующих мутаций гена *BRCA2*. Значительная их часть приводит к структурным перестройкам, изменяющим функцию белковых продуктов, что снижает способность систем репарации к эффективному восстановлению повреждений ДНК. Многие мутации *BRCA1/BRCA2* относятся к миссенс-мутациям, изменяющим кодирующую последовательность и приводящим к замене одного функционального кодона на другой.

В результате проведенного нами биоинформатического анализа NGS-данных, полученных при исследовании опухолей РМЖ, было идентифицировано 78 уникальных мутаций в генах *BRCA1* и *BRCA2*. Большая часть мутаций обнаружена в гене *BRCA2*. По данным литературы, гены *BRCA1* и *BRCA2* значительно различаются по частоте мутаций [5].

Дальнейший анализ с применением базы данных ActiveDriveDB показал, что значительная часть генетических вариантов оказывает функциональный эффект на сайты посттрансляционной модификации кодируемых белков (*см*. рис. 1). Всего в ходе исследования было обнаружено 33 таких мутации, значительная доля из них ранее не аннотирована в базах данных. Для подтверждения обнаруженных в работе патогенных вариантов и статуса мутаций необходима верификация результатов исследования с применением процедуры секвенирования по Сенджеру с использованием образцов нормальной ткани.

ВЫВОДЫ

Применение высокопроизводительного таргетного секвенирования является наиболее перспективным подходом для молекулярного профилирования опухолей с целью клинического применения. Комплексный анализ мутаций с применением NGS в генах *BRCA1* и *BRCA2* при РМЖ позволяет идентифицировать большее число мутаций, в том числе генетических вариантов с низкой частотой мутантного аллеля, а также генетических вариантов в образцах биопсии с низким содержанием опухолевых клеток. Подходы на основе NGS, позволяющие обнаруживать мутации в составе всей кодирующей последовательности *BRCA1* и *BRCA2,* помогут эффективнее выявлять пациентов, которым может быть назначена адекватная терапия с применением таргетных противоопухолевых препаратов.

Литература

1. Бейсебаев Е. Н. Современные сравнительные аспекты эпидемиологии рака молочной железы. Вестник КазНМУ. 2014; (1): 78–83.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015; (136): E359–86.
3. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. Cell Biochem Biophys. 2015; (72): 333–8.
4. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. Asian Pac J Cancer Prev. 2016; (17): 43–6.
5. Быкова А. В., Воротников И. К., Вишневская Я. В., Денчик Д. А., Любченко Л. Н. Роль мутации генов BRCA 1 и BRCA 2 в возникновении рака молочной железы у мужчин. Опухоли женской репродуктивной системы. 2011; (1): 29–31.
6. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017; 67 (4): 290–303.
7. Цуканов К. Ю., Красненко А. Ю., Коростин Д. О., Чуров А. В., Стеценко И. Ф., Плотников Н. А. и др. Рак молочной железы: анализ спектра соматических драйверных мутаций с применением высокопроизводительного секвенирования. Вестник РГМУ. 2017; (6): 52–8.
8. Цуканов К. Ю., Красненко А. Ю., Плахина Д. А., Коростин Д. О., Чуров А. В., Дружиловская О. С. и др. Биоинформатический протокол для обработки NGS-данных и идентификации мутаций в солидных опухолях человека. Биомедицинская химия. 2017; 63 (5): 413–7.
9. Krassowski M, Paczkowska M, Cullion K, Huang T, Dzneladze I, Ouellette BFF et al. ActiveDriverDB: human disease mutations and genome variation in post-translational modification sites of proteins. Nucleic Acids Res. 2018; 46: D901–D910.
10. Zhou X, Edmonson MN, Wilkinson MR, Patel A, Wu G, Liu Y et al. Exploring genomic alteration in pediatric cancer using protein paint. Nat Genet. 2015; (48): 4–6.
11. Forbes SA, Beare D, Bindal N, Bamford S, Ward S, Cole CG et al. COSMIC: High-Resolution Cancer Genetics Using the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Curr Protoc Hum Genet. 2016; (91): 10.11.1–10.11.37.

References

1. Bejsebaev EN. Sovremennye sravnitel'nye aspekty jepidemiologii raka molochnoj zhelezy. Vestnik KazNMU. 2014; (1): 78–83.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, Eser S, Mathers C, Rebelo M et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer. 2015; (136): E359–86.
3. Tao Z, Shi A, Lu C, Song T, Zhang Z, Zhao J. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. Cell Biochem Biophys. 2015; (72): 333–8.
4. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and

Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. Asian Pac J Cancer Prev. 2016; (17): 43–6.
5. Bykova AV, Vorotnikov IK, Vishnevskaja JaV, Denchik DA, Ljubchenko LN. Rol' mutacii genov BRCA 1 i BRCA 2 v vozniknovenii raka molochnoj zhelezy u muzhchin. Opuholi zhenskoj reproduktivnoj sistemy. 2011; (1): 29–31.
6. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, Mittendorf EA, Rugo HS, Solin LJ et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. CA Cancer J Clin. 2017; 67 (4): 290–303.
7. Cukanov KJu, Krasnenko AJu, Korostin DO, Churov AV, Stecenko IF, Plotnikov NA i dr. Rak molochnoj zhelezy: analiz spektra somaticheskih drajvernyh mutacij s primeneniem vysokoproizvoditel'nogo sekvenirovanija. Vestnik RGMU. 2017; (6): 52–8.
8. Cukanov KJu, Krasnenko AJu, Plahina DA, Korostin DO, Churov AV, Druzhilovskaja O. S. i dr. Bioinformaticheskij protokol dlja obrabotki NGS-dannyh i identifikacii mutacij v solidnyh opuholjah cheloveka. Biomedicinskaja himija. 2017; 63 (5): 413–7.
9. Krassowski M, Paczkowska M, Cullion K, Huang T, Dzneladze I, Ouellette BFF et al. ActiveDriverDB: human disease mutations and genome variation in post-translational modification sites of proteins. Nucleic Acids Res. 2018; 46: D901–D910.
10. Zhou X, Edmonson MN, Wilkinson MR, Patel A, Wu G, Liu Y et al. Exploring genomic alteration in pediatric cancer using protein paint. Nat Genet. 2015; (48): 4–6.
11. Forbes SA, Beare D, Bindal N, Bamford S, Ward S, Cole CG et al. COSMIC: High-Resolution Cancer Genetics Using the Catalogue of Somatic Mutations in Cancer. Curr Protoc Hum Genet. 2016; (91): 10.11.1–10.11.37.