

КОНФЕРЕНЦИЯ
«НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ 2010»

ТЕЗИСЫ ДОКЛАДОВ

**30 ОКТЯБРЯ 2010,
МОСКВА, РОССИЯ**

Конференция
«НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ 2010»

30 октября 2010 года

Приветствия:

Главный онколог МЗиСР,
директор МНИОИ им. П.А. Герцена
Академик РАМН, профессор Чиссов В.И.

Зам. Директора РНЦ «Курчатовский институт»
член-корреспондент РАН Нарайкин О.С.

Председатель РФФИ академик РАН, проф. Панченко В.Я.

Секция

«БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ»

Сопредседатели:

Академик РАМН Чиссов В.И.
член-корреспондент РАМН Решетов И.В.
ДБН, профессор Сергеева Н.С.

Секция

«ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ»

Сопредседатели:

Академик РАН Панченко В.Я.
Член-корреспондент РАН, профессор Деев С.М.,
ДБН, профессор Якубовская Р.И.

Секция

**«НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ,
ХИРУРГИИ, РОБОТОТЕХНИКЕ»**

Сопредседатели:

Зам. Директора РНЦ «Курчатовский институт»
член-корреспондент РАН Нарайкин О.С.
ДМН Волченко Н.Н.
ДМН, профессор Василенко И.А.
ДТН, профессор Саврасов Г.В

БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

ЦЕМЕНТЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

*Баринов С.М., Комлев В.С., Гурин А.Н.,
Фадеева И.В., Бакунова Н.В., Фомин А.С.*

*Учреждение Российской академии наук
Институт металлургии и материаловедения им. А.А.Байкова РАН.*

Костные кальций-фосфатные цементы (КФЦ) – продукты, образующиеся при смешивании порошков фосфатов кальция с водой или затворяющей жидкостью, принимаемая пастообразную консистенцию с последующим переходом в твердое состояние. Впервые идея использования и получения КФЦ была предложена Brown, Chow (1983, 1986). КФЦ разделяют, в основном, на апатитовые и брушитовые. Апатитовые цементы получают, смешивая реагенты порошков с затворяющейся жидкостью, где в результате реакции получается карбонатапатит или гидроксиапатит с различными примесями. Они активно резорбируются сразу после имплантации (Кнааск et al., 1998), но затем этот процесс замедляется и цемент может оставаться в стабильном состоянии более 12 месяцев (Ohura et al., 1996, Zins 2008). Апатитовые цементы превосходят брушитовые по прочности, однако брушитовые обладают более высокой кинетикой резорбции (Apelt et al., 2004). Mirtchi et al. (1989) получили брушитовый цемент, используя порошок бета трикальций фосфат (β -ТКФ) и монокальций фосфат моногидрат (МКФМ). Bohnet et al. (1996) создали аналогичный цемент, заменив МКФМ на фосфорную кислоту. В дальнейшем были разработаны инъекционные брушитовые цементы. В Швеции в 2003 году прошла конференция, посвященная инъекционным кальций-фосфатным цементам, которые нашли широкое применение в костно-пластической хирургии, имплантологии (Agisan 2010, Komath, Varma, 2003; Ooms et al., 2003; Jansen et al., 2005) и в других областях медицины (Kenny 2003, Chow 2009, Dorozhkin 2008-2010). По инъекционным цементам написано множество обзоров (Ambard, Mueninghoff 2006; Larson 2006, 2010; Suhm, Gisep 2008; Temenoff, Mikos 2000; Hu et al., 2006). Кроме того, разработаны цементы для краниопластики и вертеброластики (Lim 2002, Genecov et al., 2006; Zins et al., 2007, 2008; Mahr et al., 2000; Hoffman et al., 2009), переломах (Lobenhoffer 2002, Bajammal 2008, Ryf 2009) цементы для переноса лекарственных веществ (Ginebra et al., 2006; Hoffman et al. 2009). Bohnet et al. (2005) отметил, что КФЦ чаще становятся предметом исследования, чем кальций-фосфатная керамика. Такой интерес к КФЦ вызван тем, что они обладают рядом преимуществ по сравнению с керамическими материалами. Во-первых, обладая нанокристаллической структурой, они имеют очень большую удельную площадь поверхности до 100 м²/г, тогда как у керамических гранул она не превышает 1 м²/г. Во-вторых, КФЦ делают возможным синтез гранул и блоков при комнатной температуре. (Bohnet et al., 2005). Текучесть способствует введению цемента при помощи малоинвазивных хирургических техник, менее агрессивных, чем традиционные оперативные методы; Идеальное прилегание к поверхности нанесения дает хороший контакт между костью и цементом, даже в геометрически сложных местах повреждений. Поскольку реакция затвердевания, которая протекает в естественных условиях представляет собой растворение и выделение вещества в виде твердого осадка,

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

в большинстве случаев, продуктом реакции является гидроксипатит с высокой пористостью, сходный по структуре с природными апатитами. Благодаря этому КФЦ обладают большей реакционной способностью по сравнению с кальцийфосфатной биокерамикой. Затвердевание КФЦ при комнатной температуре позволяет добавлять в смесь различные лекарственные вещества: от антибиотиков и противовоспалительных средств до факторов роста (костных морфогенетических белков). Это свойство наделяет КФЦ большим потенциалом в области контролируемой доставки лекарственных веществ к месту дефекта костной ткани (Ginebra et al. 2006). Однако, наряду с преимуществами, КФЦ имеют ряд недостатков, к которым можно отнести невысокую механическую прочность (особенно брүшитовых цементов), а также обязательное давление при перемешивании (Ambard, Mueninghoff, 2006).

Но тем не менее материалы продолжают совершенствоваться и находят все более широкое применение. Так, на российском рынке представлены апатитовые КФЦ Nogian SRS и брүшитовый инъекционный цемент VitalOS.

ОСНОВНЫЕ ПАРАМЕТРЫ, ОПРЕДЕЛЯЮЩИЕ СВОЙСТВА КФЦ

Жидкая фаза. Жидкость для цементного раствора содержит вещества, необходимые для реакции затвердевания, основная ее роль – обеспечивать среду для растворения реагентов и выделения продуктов реакции. Цементы на основе тетракальцийфосфата (ТТКФ) и дикальцийфосфата безводного (ДКФА) затвердевают в воде, следовательно, в качестве жидкости для раствора можно использовать воду, физраствор или любую другую физиологическую жидкость. Большинство цементов не затвердевают в воде, поэтому в качестве жидкости для них используется растворы фосфатов или фосфорной кислоты (Takagi et al., 1998).

Твердая фаза. Состав твердой фазы различается в зависимости от желаемого времени затвердевания. Поскольку важную роль в затвердевании и итоговых свойствах цемента играет размер частиц ингредиентов цемента, необходимо измельчать каждый компонент отдельно до получения желаемого размера частиц.

Структура и свойства цементов зависят от исходного состава и соотношения порошок/затвердевающая жидкость. По времени схватывания различают быстрое (менее 5 минут), среднее (10-20 минут), медленное (более 30 минут). Вязкость цементной массы влияет на его резорбируемость, биосовместимость и прочность на сжатие. Как отмечалось, свойства и структура цемента зависят от помола порошка. Чем меньше размер частиц порошка, тем быстрее схватывание (Ginebra 2004). Количество затворяющей жидкости также влияет на скорость затвердевания: чем жидкости меньше, тем быстрее происходит затвердевание (Grover 2006). Для ускорения схватывания используются: активные ионы кальция или фосфат-ионы (предварительно растворенные в жидкости или в виде легкорастворимой соли чем выше концентрация соли, тем меньше время затвердевания); нанокристаллические ядра апатита – чем их больше, тем быстрее протекает реакция затвердевание. (Ginebra et al., 2004). Для замедления схватывания цементов применяются ингибиторы затвердевания, такие как магниевые соли, альгинат натрия, хитозан (Tanaka 2003; Takagi et al., 2003; Hu et al., 2002), глицерин (Sugawara et al., 1990a), полиэтиленгликоль (Sugawara et al., 1990b). На скорость схватывания КФЦ оказывает влияние температура. Время затвердевания снижается, если температура поднимается от 20 до 37°C (Bohner et al., 2005).

Реакцию затвердевания возможно охарактеризовать с точки зрения механических свойств: считается, что если цемент затвердел (схватился), он не изменяется при механической нагрузке на поверхность. Для определения времени затвердевания используется прибор Вика: если при надавливании на цементное тесто иглой диаметром 1 мм² на цементе не остается отпечатка, то цемент затвердел. Этот метод подходит для тех случаев, когда применяемая нагрузка достаточно низка (10-20%) относительно максимальной прочности цемента на сжатие и когда прочность цемента на сжатие возрастает постепенно по мере затвердения. Однако этот метод не подходит для

сравнения цементов с низкой прочностью на сжатие. Более того, было установлено, что цементы иногда проходят две реакции затвердевания и поэтому одной оценки схватывания для них недостаточно. Driessens et al. (1994) предложили проводить две оценки первичного и окончательного затвердевания. Однако эти данные могут оказаться неточными, если применяемые нагрузки не отвечают характеристикам схватывания цемента (слишком высокие или слишком низкие).

Реакции затвердевания для различных цементных растворов обладают сходными химическими свойствами, которые можно установить, проанализировав изменения растворимости входящих в смесь соединений.

Растворимость. Растворимость является одним из важнейших свойств КФЦ, поскольку она обеспечивает стабильность материала в различных условиях его применения. Полностью затвердевшие образцы КФЦ, приготовленные на основе ТТКФ + ДКФА или ТТКФ + ДКФД, состоят в основном из гидроксиапатита (ГА) с незначительным остаточным количеством ТКФ и по растворимости близки к ГА. Затвердевший КФЦ практически нерастворим в воде, но легко растворяется в высококислотной среде. В естественных физиологических условиях КФЦ нерастворимы, поскольку физиологические жидкости (слюна, кровь и пр.) перенасыщены по отношению к ГА. КФЦ растворяются в кислотной среде, созданной остеокластами и другими клетками, продуцирующими кислоту.

При кислотности ниже примерно 4,2 наименее растворимым становится ДКФА. Это объясняет, почему большинство минеральных компонентов как в здоровых костных тканях, так и в патологических отложениях кальция представляют собой формы ГА с примесями. При кислотности ниже 8,5 ТТКФ является наиболее растворимым; а для значений кислотности выше 8,5 наибольшей растворимостью обладает дикальцийфосфат дигидрат (ДКФД). Относительная стабильность различных солей служит основным фактором реакций затвердевания, которые происходят в КФЦ.

ТТКФ не только обладает высокой растворимостью в нейтральных и кислых средах, он представляет собой единственную соль фосфата кальция с соотношением кальция и фосфора выше, чем у ГА. для получения смеси со стехиометрией ГА. При образовании ГА из ТТКФ в смеси с другими фосфатами кальция с более низким соотношением кальция и фосфора, как показано в уравнении реакции 1, не выделяются кислотные или щелочные побочные продукты.



Согласно этой реакции происходит образование осажденного гидроксиапатита (оГА), при условии что и ДКФА, и ТТКФ содержатся в смеси в избытке и обе соли растворяются быстрее, чем образуется ГА. Таким образом, цемент в жидкой фазе будет сохранять практически постоянный уровень кислотности и состав, обеспечивая стабильное протекание реакции затвердевания. Сингулярная точка кислотности для соединения ТТКФ + ДКФА приблизительно равна 8,5. Таким образом, во время реакции затвердевания кислотность таких цементов будет лишь немногим выше физиологической, что отчасти объясняет высокую биосовместимость этих материалов. Кроме ДКФА и ДКФД, тетракальций фосфат образует сингулярные точки с октакальцийфосфатом (ОКФ), α -трикальций фосфатом (α -ТКФ) и α -трикальций фосфатом (α -ТКФ), изотермы которых также проходят над кривой ГА (рис. 1).

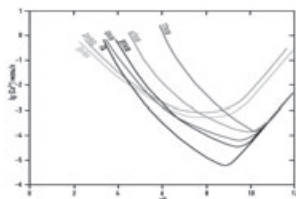


Рис. 1. Диаграмма растворимости фаз в системе: $\text{Ca}(\text{OH})_2 - \text{H}_3\text{PO}_4 - \text{H}_2\text{O}$ при 25°C ; ДКФА – дикальцийфосфат ангидрат; ДКФД – дикальцийфосфат дигидрат; ОКФ – октакальцийфосфат; α -ТКФ – альфа-трикальцийфосфат; β -ТКФ – бетатрикальцийфосфат; ТТКФ – тетракальцийфосфат. [Chow 2001]

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Жидкие растворы, содержащие ТТКФ и одну из этих солей, должны также образовывать ГА. Однако их сингулярные точки находятся не так высоко над изотермой ГА, как сингулярные точки ТТКФ-ДКФА и ТТКФ-ДКФД. Это означает, что смеси на основе ОКФ, α -ТКФ и β -ТКФ не так перенасыщены по отношению к ГА. Возможно, поэтому смеси ТТКФ с ОКФ, α -ТКФ и β -ТКФ в воде реагируют недостаточно быстро, чтобы образовать хорошо затвердевающий цемент. Большинство этих смесей затвердевает в пределах десяти минут с затворяющей жидкостью, содержащей фосфаты натрия. Для кислотности ниже 8,5 α -ТКФ занимает второе место по растворимости. Поэтому смесь α -ТКФ с другими фосфатами кальция, например, ДКФД, ДКФА, и с монокальций фосфата моногидратом (МКФМ) или с соединениями, в состав которых входит кальций (например, карбонат кальция или гидроксид кальция), также дает затвердевающий цемент, если в качестве жидкости используется раствор фосфата

На основе α -ТКФ были синтезированы прочные микропористые цементы (Смирнов, 2009, Баринов 2005).

РЕЗОРБИРУЕМОСТЬ И БИОСОВМЕСТИМОСТЬ

Биологическая реакция на КФЦ может быть оценена только после имплантации. Одно из важнейших свойств КФЦ, проявляющихся в естественных условиях, — это его стабильность (слабая растворимость) в обычных физиологических жидкостях и при резорбции в кислотной среде, которая может быть создана остеокластами. При краниопластике вполне приемлема относительно медленная резорбция с постепенным замещением новообразованной костной тканью. В других же случаях, например, при лоскутных операциях в пародонтологии или синус-лифтинге крайне важна способность цементного имплантата быстро замещаться костной тканью. Поэтому для увеличения скорости резорбции КФЦ они должны быть пористыми. Пористые КФЦ по характеру пор можно разделить на сквозные, изолированные и направленные (канальные). По количеству пор — на пористые (пористость до 40%), высокопористые (40-70%) и ультрапористые (свыше 80%). По размерам пор различают микропоры (до 10 мкм), мезопоры (50-250 мкм) и макропоры (более 500 мкм).

Пористость цементов создают различными способами, например, применяя растворимые добавки, например, NaCl (Tas et al., 2007), сахар, бикарбонат натрия (Takagi, Chow, 2001), маннитол (Markovic et al., 2001); за счет мелких капель жидкости или масла, (Bohner M., 2001) или воздушных пузырьков (Sarda et al., 2003);. Цемент затвердевает, и гранулы, растворяясь, образуют макропоры, сквозь которые происходит инвазия клеточных элементов и адсорбция факторов роста. Однако, при высокой пористости, прочность цемента снижается (Gama 2009, Barralet 2001, Almira 2001, Grover 2006).

Повышение прочности

По прочности КФЦ обладают значительно более низкими характеристиками, чем костная ткань, зубная ткань или кальций-фосфатная биокерамика. Хотя на данный момент достигнута прочность при сжатии до 80 МПа, КФЦ являются хрупким материалом с довольно низкой прочностью на изгиб. Поскольку затвердевание КФЦ протекает при комнатной температуре, возможно добавление различных биосовместимых/биорезорбируемых волокнистых или пористых веществ в смесь КФЦ во время приготовления или в заранее изготавливаемые имплантаты. Это должно значительно повысить прочность цемента. В работе Xu et al. (2001) показано, что добавление в цементную смесь углеродной нити в объемной доле 5,7% позволяет повысить прочность при изгибе в 4 раза, а на разрыв в 100 раз по сравнению с неукрепленными КФЦ. При использовании биорезорбируемых укрепляющих волокон повышение прочности достигается уже на ранней стадии. Распад волокон ведет к образованию микроскопических каналов между костью и имплантатом, что способствует врастанию костной ткани в имплантат. Для повышения прочности КФЦ используют на-

БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

Таблица 1 (Bohner 2005)		
СПИСОК КОММЕРЧЕСКИХ КАЛЬЦИЙ-ФОСФАТНЫХ ЦЕМЕНТОВ С УКАЗАНИЕМ СОСТАВА (В СЛУЧАЕ ЕСЛИ ДАННЫЕ ИМЕЮТСЯ)		
Компания	Название цемента	Компоненты. Конечный продукт
ETEX	a-BSM	<i>Порошок:</i> АКФ (аморфный кальций-фосфат) (50%), ДКФД (50%) Апатит
	Embarc	<i>Раствор:</i> H ₂ O (небуферный физиологический раствор) [46, 47]
	Biobon	
Stryker-Leibinger Corp.	BoneSource	<i>Порошок:</i> ТТКФ (73%), ДКФ (27%) Апатит
		<i>Раствор:</i> H ₂ O, смесь Na ₂ HPO ₄ и NaH ₂ PO ₄ [48, 49]
Teknimed	Cementek®	<i>Порошок:</i> α-ТКФ, ТТКФ, Натрия глицерофосфат Апатит
		<i>Раствор:</i> H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄ [50]
	Cementek® LV	<i>Порошок:</i> α-ТКФ, ТТКФ, Натрия глицерофосфат, диметилсилоксан Апатит
		<i>Solution:</i> H ₂ O, Ca(OH) ₂ , H ₃ PO ₄ [50]
Biomet	Calcibon® (previously called «Biocement D»)	<i>Порошок:</i> α-ТКФ (61%), ДКФ (26%), CaCO ₃ (10%), ПГА (3%) Апатит
		<i>Раствор:</i> H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ [51]
	Mimix™	<i>Порошок:</i> ТТКФ, α-ТКФ, C ₆ H ₅ O ₇ Na ₃ • 2H ₂ O Апатит
		<i>Раствор:</i> H ₂ O, C ₆ H ₈ O ₇
Mitsubishi materials	Biorex®	<i>Порошок:</i> α-ТКФ (75%), ТТКФ (20-18%), ДКФД (5%), ГА (0-2%) Апатит
		<i>Раствор:</i> H ₂ O, янтарнокислый натрий (12-13%), натрия хондроитин сульфат (5-5.4%) (в случае, когда указаны две цифры, первая относится к источнику [52], а вторая – к источнику [53])
	Biorex®-R	<i>Порошок:</i> α-ТКФ, ТТКФ, ДКФД, ГА, Mg ₃ (PO ₄) ₂ , NaHSO ₃ Апатит
		<i>Раствор:</i> H ₂ O, янтарнокислый натрий, натрия хондроитин сульфат [53]
Kyphon	KyphOs™	<i>Порошок:</i> α-ТКФ (77%), Mg ₃ (PO ₄) ₂ (14%), MgHPO ₄ (4.8%), SrCO ₃ Апатит (3.6%)
		<i>Раствор:</i> H ₂ O, (NH ₄) ₂ HPO ₄ (3.5 м) [54]
Skeletal Kinetics	Callos™ [55]	<i>Порошок:</i> нет данных ^a Апатит
		<i>Раствор:</i> нет данных ^a
Shanghai Rebone Biomaterials Co, Ltd	Rebone	<i>Порошок:</i> ТТКФ, ДКФ Апатит
		<i>Раствор:</i> H ₂ O [56] ^b
Synthes-Norian	Norian® SRS	<i>Порошок:</i> α-ТКФ (85%), CaCO ₃ (12%) МКФМ (3%) Апатит
	Norian® CRS	<i>Раствор:</i> H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ [4, 57] ^c
	Norian® SRS Fast Set	<i>Порошок:</i> нет данных ^a Апатит
	Putty	
	Norian® CRS Fast Set	<i>Раствор:</i> нет данных ^a
	Putty	

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

	chronOST™ Inject	Порошок: β-ТКФ (73%), МКФМ (21%), MgHPO ₄ • 3H ₂ O (5%), Брушит MgSO ₄ (<1%), Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇ (<1%) Раствор: H ₂ O, гиалуронат натрия (0.5%) [43]
Kasios	Eurobone®	Порошок: β-ТКФ (98%), Na ₄ P ₂ O ₇ (2%) Брушит Раствор: H ₂ O, H ₃ PO ₄ (3.0 м), H ₂ SO ₄ (0.1 м) [58]
CalciphOs	VitalOs	Компонент 1: /J-ТКФ (1.34 г), Na ₂ H ₂ P ₂ O ₇ (0.025 г), H ₂ O, соли (0.05 М Брушит pH 7.4 физиологический раствор) Компонент 2: МКФМ (0.78 г), CaSO ₄ • 2H ₂ O (0.39 г), H ₂ O, H ₃ PO ₄ (0.05 м) [59] ^d
<p>Конечный продукт реакции может быть как апатитом (кальций-дефицитный, карбонизированный и т. д.) или брушит. a Не найдено в литературе или в сети. b Предполагаемый состав (по данным научной литературы). c Примерный состав. d В цемент входят две жидкости, в которых распределены различные порошковые компоненты.</p>		

полнители из Ti, SiO₂, Al₂O₃, ZrO₂ и др., которые относятся к бетонитам, т. е. цементы с повышенной прочностью.

Экспериментальная часть

В настоящей работе получены пористые цементы в системе α-ТКФ/ОКФ (рис.2).

Растворимость α-ТКФ выше, чем у ОКФ. В процессе взаимодействия ОКФ и α-ТКФ pH смеси увеличивается. Поэтому, исходя из диаграммы, для затвердевания необходима кислая затворяющая жидкость, содержащая фосфаты. ОКФ является метастабильной фазой, но вследствие меньшей растворимости по сравнению с α-ТКФ, ОКФ частично остается в затвердевшем цементе, что было подтверждено рентгенофазовым анализом. По данным фазового анализа цемента системы α-ТКФ/ОКФ после затвердевания содержание ОКФ в цементе составляет около 12%. ОКФ обладает остеоиндуктивными свойствами по сообщениям ряда авторов (Вагере et al., 2003; Nabibovic et al., 2004). ОКФ в цементе будет стимулировать формирование новообразованного костного матрикса. Прочность данного цемента увеличивается после замешивания и достигает максимума (30 МПа) через 48 часов. Растворимость цемента выше по сравнению с керамикой из α-ТКФ.

Были разработаны цементы с использованием силиката натрия в качестве затворяющей жидкости на основе монетита и брушита. Время твердения цементов – 5-10 мин, pH после затвердевания 10-12. Прочность при сжатии через 1 сутки после затворения – 30 МПа. Пористость цемента увеличивается в течение первых трех суток после затворения до 25%, размер пор – 10-50 мкм.

Изменения микроструктуры коррелируют с изменением прочности цемента. Обычно изменение прочности при сжатии цементных образцов описывается сигмоидальной кривой роста с выходом на плато. В случае анализируемого образца наблюдалось аномальное поведение цемента при твердении, характеризующее последовательностью пиков и плато на кривой зависимости прочности при сжатии от времени твердения. Как видно из приведенных зависимостей размера зерна и параметра d наиболее интенсивного пика (1 2 0), структурные изменения материала согласуются по времени с изменениями на кривой зависимости прочности при сжатии от времени твердения.

Таким образом, установлено аномальное поведение цемента при твердении.

Были получены нейтральные цементы на основе α-ТКФ и раствора фосфорной кислоты, содержащей соли магния. Время схватывания – 3-4 мин, время твердения – до 15 мин. pH цемента увеличивается по мере протекания реакции между порошком и жидкостью, достигая через 15 мин нейтральных значений pH 6,9-7,0. По данным рентгенофазового анализа основной фазой через 24 часа после затворения является брушит. Прочность данного цемента невысока – 15-20 МПа. Структура це-

ментов различается в зависимости от состава порошка: введение 20% ОКФ в состав порошка приводит к образованию вытянутых кристаллов на поверхности (рис.3).

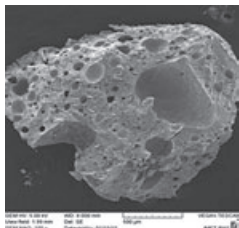


Рис.2. Костный цемент на основе α -ТКФ/ОКФ.

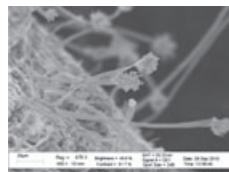


Рис.3.

Выводы

1. Полученные в настоящей работе цементы относятся к апатитовым - цементы на основе α -ТКФ/ОКФ и фосфорной кислоты, содержащей соли цинка и алюминия) и брушитовым – цементы на основе α -ТКФ/ОКФ и фосфатов магния и цементы на основе монетита и раствора силиката натрия;

2. Прочность апатитовых цементов составляет 30 МПа, брушитовых – 15–20 МПа;

3. Наиболее перспективными для медицинского применения являются брушитовые цементы на основе α -ТКФ/ОКФ и фосфатов магния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. - М.: Наука, 2005. 285 с.
2. Смирнов В.В., Егоров А.А., Сергеева Н.С., Свиридова И.К., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А., Гурин А.Н., Баринов С.М. Кальцийфосфатные наноструктурированные костные цементы для заполнения дефектов костной ткани //Материалы научно-практической конференции «Нанотехнологии в онкологии 2009». 2009. С.59.
3. Almirall A., Lagrecq G., Delgado J.A. et al. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants//J. Mater. Sci. Mater. Med.2001.Vol.12.P.135-139.
4. Ambard A.J., Mueninghoff L. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties//J. Prosthodont.2006.Vol.15.P.321-8.
5. Andrianjatovo H., Lemaitre J. Effects of polysaccharides on the cement properties in the monocalcium phosphate monohydrate-beta-tricalcium phosphate system//Innovation Tech. Biol. Med.1995.Vol.16.S1.P140-147.
6. Apelt D., Theiss F., El-Warrak A.O. et al. In vivo behavior of three different injectable hydraulic calcium phosphate cements//Biomaterials. 2004. Vol. 25.P.1439-1451.
7. Aponte R., Lemons J., Lacefield W. et al. Investigation of calcium phosphate cement in osteonecrotic-like lesions in a rabbit model. -Thesis for MS degree. University of Alabama, Birmingham, 2001.
8. Arisan V., Aniel A., Wolke J. et al. The effect of injectable calcium phosphate cement on bone anchorage of titanium implants: an experimental feasibility study in dogs//Int. J. Oral Maxillofac. Surg. 2010. ahead of print.
9. Axen N., Ahnfelt N.-O., Persson T. et al. Clotting behavior of orthopaedic cements in human blood. -Annual meeting «Ceramics, cells and tissues», Faenza, 2004.
10. Baker S., Weinzwieg J., Kirschner R. et al. Applications of a new carbonated calcium phosphate bone cement: early experience in pediatric and adult craniofacial reconstruction//Plast. Reconstr. Surg. 2002.Vol. 109. P.1789-1796.
11. Barralet J., Gaunt T., Wright A. et al. Effect of porosity reduction by compaction on compressive strength and microstructure of calcium phosphate cement//J. Biomed. Mater. Res. 2002. Vol.63. P.1-9.
12. Barrere F., Van Der Valk C., Dalmeijer R. et al. Osteogenicity of octacalcium phosphate coatings applied on porous metal implants//J. Biomed. Mater. Res. A.2003.Vol.66.P.779-788.
13. Bernards C.M, Chapman J.R, Mirza S.K. Lethality of embolized norian bone cement varies with the time between mixing and embolization. Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society, San Francisco, 2004.
14. Blom E., Klein-Nulend J., Klein C. et al. Transforming growth factor-beta 1 incorporated during setting in calcium phosphate cement stimulates bone cell differentiation in vitro//J. Biomed. Mater. Res.2000.Vol.50.P.67-74.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

15. Blom E., Klein-Nulend J., Wolke J. et al. Transforming growth factor-beta 1 incorporation in an alpha-tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dihydrate/tetracalcium phosphate monoxide cement: release characteristics and physicochemical properties//*Biomaterials*.2002. Vol.23.P.1261-1268.
16. Blom E., Klein-Nulend J., Wolke J. Transforming growth factor-beta 1 incorporation in a calcium phosphate bone cement: material properties and release characteristics//*J. Biomed. Mater. Res.*2002Vol.59.P.265-272.
17. Blom E., Klein-Nulend J., Yin L. et al. Transforming growth factor-beta 1 in calcium phosphate cement stimulates bone regeneration//*J. Dent. Res.*2000.Vol.79.P.255.
18. Bohner M. Calcium phosphate emulsions: possible applications//*Key Eng Mater.*2001.P192-195.
19. Bohner M., Gbureck U., Barralet J. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: a critical assessment//*Biomaterials*.2005.Vol.26.P.6423-6439.
20. Bohner M., Lemaître J., Ring A. Effects of Sulfate, Pyrophosphate, and Citrate Ions on the Physicochemical Properties of Cements Made of a-Tricalcium Phosphate-Phosphoric Acid-Water Mixtures//*J. Amer. Ceramic Society*.1996.Vol.79.P.1427-1434.
21. Bosch C., Melsen B., Gibbons R. et al. Human recombinant transforming growth factor beta 1 in healing of calvarial bone defects//*Craniofac. Surg.*1996.Vol.7.P.300-310.
22. Brown W.E., Chow L.C. A new calcium phosphate setting cement//*J. Dent. Res.*1983.Vol.62.P.672.
23. Centrella M., Massague J., Canalis E. Human platelet-derived transforming growth factor p stimulates parameters of bone growth in fetal rat calvaria//*Endocrinology*.1986.Vol.119.P.2306-2312.
24. Chung H.M., Hong C.H., Chiang C.P. et al. Comparison of calcium phosphate cement mixture and pure calcium hydroxide as direct pulp-capping agents//*J. Formos. Med. Assoc.*1996. Vol.95.P.545-550.
25. Chow L.C. Next generation calcium phosphate-based biomaterials//*Dent. Mater. J.*2009. Vol.28.P.1-10.
26. Chow L.C. Solubility of calcium phosphates. – Chow L.C., Eanes E.D. *Octacalcium Phosphate*. Basel:Karger.
27. Chow L.C., Takagi S., Costantino P.D. et al. Self setting calcium phosphate cements//*Mater. Res. Symp. Proc.*1991.Vol.179.P.3-24.
28. Comuzzi L., Ooms E., Jansen J. Injectable calcium phosphate cement as a filler for bone defects around oral implants: an experimental study in goats//*Clin. Oral Implants Res.*2002. Vol.13.P.304-311.
29. Cuisinier F.J.G., Wieber A., Tenenbaum H. et al. Injectable calcium phosphate hydraulic cement (CPHC) used for periodontal tissue regeneration: A study on a dog model//*J. Appl. Biomater. Biomech.*2003.Vol.1.P.186-193.
30. Dorozhkin S.V. Bioceramics of calcium orthophosphates//*Biomaterials*.2010.Vol.31.P.1465-1485.
31. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate cements for biomedical application//*J. Mater. Sci.*2008. Vol.43.P.3028-3057.
32. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials//*J. Mater. Sci.*2009.Vol.44.P.2343-2387.
33. Driessens F.C.M., Boltong M.G., Bermudez O. et al. Effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements//*J. Mater. Sci. Mater. Med.*1994.Vol.5.P.164-170.
34. Edwards R.B., Seeherman H.J., Bogdanske J.J. et al. Percutaneous injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a calcium phosphate paste accelerates healing of a canine tibial osteotomy//*J. Bone Jt. Surg.*2004.Vol.86.P.1425-1438.
35. Fernandez E., Boltong M.G., Ginebra P.M. et al. Development of a method to measure the period of swelling of calcium phosphate cements//*J. Mater. Sci. Lett.*1996.Vol.15.P.1004-1005.
36. Friedman C.D., Costantino P.D., Takagi S. et al. BoneSource hydroxyapatite cement: a novel biomaterial for craniofacial skeletal tissue engineering and reconstruction//*J. Biomed. Mater. Res.*1998.Vol.43.P.428-432.
37. Fujikawa K., Sugawara A., Kusama K. et al. Fluorescent labeling analysis and electron probe microanalysis for alveolar ridge augmentation using calcium phosphate cement//*Dent. Mater. J.*2002.Vol.21.P.296-305.
38. Fujikawa K., Sugawara A., Murai S. et al. Histopathological reaction of calcium phosphate cement in periodontal bone defect//*Dent. Mater. J.*1995.Vol.14.P.45-57.
39. Genecov D., Kremer M., Agarwal R. et al. Norian craniofacial repair system: compatibility with resorbable and nonresorbable plating materials//*Plast. Reconstr. Surg.*2007.Vol.120.P.1487-1495.
40. Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A. Effect of the particle size on the micro and

- nanostructural features of a calcium phosphate cement: a kinetic analysis//*Biomaterials*.2004. Vol.25.P.3453-3462.
41. Ginebra M., Traykova T., Planell J. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: a review//*J. Control Release*.2006.Vol.113.P.102-110.
 42. Ginebra M.P., Rilliard A., Fernandez E. et al. Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug//*J. Biomed. Mater. Res*.2001. Vol.57.P.113-118.
 43. Habibovic P., van der Valk C., van Blitterswijk C. et al. Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials//*J. Mater. Sci. Mater. Med*.2004.Vol.15.P.373-380.
 44. Hofmann M.P., Mohammed A.R., Perrie Y. et al. High-strength resorbable brushite bone cement with controlled drug-releasing capabilities//*Acta Biomater*.2009.Vol.5.P.43-49.
 45. Ishikawa K., Miyamoto Y., Kon M. et al. Non-decay type fast-setting calcium phosphate cement: composite with sodium alginate//*Biomaterials*.1995.Vol.16.P.527-532.
 46. Jansen J., Ooms E., Verdonschot N. et al. Injectable calcium phosphate cement for bone repair and implant fixation//*Orthop. Clin. North Amer*.2005.Vol.36.P.89-95.
 47. Kamegai A., Shimamura N., Naitou K. et al. Bone formation under the influence of bone morphogenetic protein/ self-setting apatite cement composite as delivery system//*Bio-Med. Mater. Eng*.1994.Vol.4.P.291-307.
 48. Kenny S., Buggy M. Bone cements and fillers: a review//*J. Mater. Sci. Mater. Med*.2003. Vol.14.P.923-938.
 49. Khairoun I., Boltong M.G., Driessens F.C. et al. Effect of calcium carbonate on clinical compliance of apatitic calcium phosphate bone cement//*J. Biomed. Mater. Res*.1997.Vol.38.P.356-360.
 50. Knaack D., Goad M., Aiolo M. et al. Resorbable calcium phosphate bone substitute//*Biomaterials*.1998.Vol.43.P.399-409.
 51. Knepper-Nicolai B., Reinstorf A., Hofinger I. et al. Influence of osteocalcin and collagen i on the mechanical and biological properties of Biocement D//*Biomol. Eng*.2002.Vol.19.P.227-231.
 52. Komath M., Varma H. Development of a fully injectable calcium phosphate cement for orthopedic and dental applications//*Bull. Mater. Sci*.2003.Vol.26.P.415-422.
 53. Larsson S. Calcium Phosphates: what is the evidence?//*J. Orthop. Trauma*.2010.Vol.24.P.S41-S45.
 54. Larsson S. Injectable Phosphate Cements - A Review. - 2006. [Режим доступа 15.03.2010] http://osteosynthesis.stryker.com/medias/pdf/wp_hydroset_technical_review_larsson.pdf
 55. Larsson S., Bauer T. Use of injectable calcium phosphate cement for fracture fixation: a review//*Clin. Orthop. Relat. Res*.2002.Vol.395.P.23-32.
 56. Lee D.D., Tofighi A., Aiolo M. et al. Alpha-BSM+o: abiomimetic bone substitute and drug delivery vehicle//*Clin. Orthop. Relat. Res*.1999.Vol.367.P.S396-S405.
 57. Lim T.H., Brebach G.T., Renner S.M. et al. Biomechanical evaluation of an injectable calcium phosphate cement for vertebroplasty//*Spine*.2002.Vol.27.P.1297-1302.
 58. Lind M., Overgaard S., Soballe K. et al. Transforming growth factor-beta 1 enhances bone healing to unloaded tricalcium phosphate coated implants: an experimental study in dogs//*J. Orthop. Res*.1996.Vol.14.P.343-350.
 59. Losee J., Karmacharya J., Gannon F. et al. Reconstruction of the immature craniofacial skeleton with a carbonated calcium phosphate bone cement: interaction with bioresorbable mesh//*J. Craniofacial. Surg*.2003.Vol.14.P.117-124.
 60. Lye K., Tideman H., Merckx M. et al. Bone cements and their potential use in a mandibular endoprosthesis//*Tissue Eng. Part B*.2009.Vol.15.P.485-496.
 61. Mahr M.A., Bartley G.B., Bite U. et al. Norian craniofacial repair system bone cement for the repair of craniofacial skeletal defects//*Ophthal. Plast. Reconstr. Surg*.2000.Vol.16.P.393-398.
 62. Markovic M., Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement through the use of mannitol crystals//*Key. Eng. Mater*.2001.Vol.192.P.773-776.
 63. Mirtchi A.A., Lemaitre J., Terao N. Calcium phosphate cements: study of the beta-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate system//*Biomaterials*.1989.Vol.10.P.475-480.
 64. Nimni M.E. Polypeptide growth factors: targeted delivery systems//*Biomaterials*.1997. Vol.18.P.1201-1225.
 65. Noda M., Camilliere J. In vivo stimulation of bone formation by transforming growth factor p//*Endocrinology*.1989Vol.124.P.2991-2994.
 66. Ohura K., Bohnert M., Hardouin P. et al. Resorption of, and bone formation from, new b-tricalcium phosphate-monocalcium phosphate cements: An in vivo study//*J. Biomed. Mater. Res*.1996. Vol.30.P.193-200.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

67. Ohura K., Hamanishi C., Tanaka S. et al. Healing of segmental bone defects in rats induced by a p-TCP-MCPM cement combined with rhBMP-2//*J. Biomed. Mater. Res.*1999.Vol.44.P.168-175.
68. Ooms E.M., Wolke J.G., van der Waerden J.P. et al. Use of injectable calcium-phosphate cement for the fixation of titanium implants: an experimental study in goats//*J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*2003.Vol.15.P.447-456.
69. Otsuka M., Matsuda Y., Baig F. et al. Calcium-level responsive controlled drug delivery from implant dosage forms to treat osteoporosis in an animal model//*Adv. Drug Deliv. Rev.*2000.Vol.42.P.249-258.
70. Otsuka M., Matsuda Y., Fox J.L. Novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement 9: effects of the mixing solution volume on anticancer drug-release from homogeneous drug-loaded cement//*J. Pharm. Sci.*1995.Vol.84.P.733-736.
71. Otsuka M., Matsuda Y., Suwa Y. et al. A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement 5: drug-release behaviour from a heterogeneous drug-loaded cement containing an anticancer drug//*J. Pharm. Sci.*1994.Vol.83.P.1565-1568.
72. Otsuka M., Matsuda Y., Suwa Y. et al. A novel skeletal drug-delivery system using self-setting calcium-phosphate cement 4. Effects of the mixing solution volume on the drug-release rate of heterogeneous aspirin-loaded cement//*J. Pharm. Sci.*1994.Vol.83.P.259-263.
73. Otsuka M., Matsuda Y., Suwa Y. et al. Novel skeletal drug-delivery system using self-setting calcium phosphate cement. 3. Physicochemical properties and drug-release rate of bovine insulin and bovine albumin//*J. Pharm. Sci.*1994.83.P.255-258.
74. Otsuka M., Matsuda Y., Wang Z. et al. Effect of sodium bicarbonate amount on in vitro indomethacin release from self-setting carbonated-apatite cement//*Pharm. Res.*1997.Vol.14.P.444-449.
75. Otsuka M., Nakahigashi Y., Matsuda Y. et al. A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement VIII: the relationship between in vitro and in vivo drug release from indomethacin-containing cement//*J. Control. Release.*1997.Vol.43.P.115-122.
76. Otsuka M., Nakahigashi Y., Matsuda Y. et al. A novel skeletal drug delivery system using self-setting calcium phosphate cement 7: effect of biological factors on indomethacin release from the cement loaded on bovine bone//*J. Pharm. Sci.*1994.Vol.83.P.1569-1573.
77. Otsuka M., Nakahigashi Y., Matsuda Y. et al. Effect of geometrical cement size on in vitro indomethacin release from self-setting apatite cement//*J. Control. Release.*1998.Vol.52.P.281-289.
78. Otsuka M., Yoneoka K., Matsuda Y. et al. Oestradiol release from self-setting apatitic bone cement responsive to plasma-calcium level in ovariectomized rats and its physicochemical mechanism//*J. Pharm. Pharmacol.*1997.Vol.49.P.1182-1188.
79. Ruhe P.Q., Hedberg E.L., Padron N.T. et al. rhBMP-2 release from injectable poly(DL-lactic-co-glycolic acid)/ calcium-phosphate cement composites//*J. Bone Jt. Surg.*2003.Vol.85.P.75-82.
80. Sarda S., Nilsson M., Balcells M. et al. Influence of surfactant molecules as air-entraining agent for bone cement macroporosity//*J. Biomed. Mater. Res.*2003.Vol.65.P.215-221.
81. Seeherman H.J., Boussein M., Kim H. et al. Recombinant human bone morphogenetic protein-2 delivered in an injectable calcium phosphate paste accelerates osteotomy-site healing in a nonhuman primate model//*J. Bone Jt. Surg.*2004.Vol.86.P.1961-1973.
82. Seeherman H.J., Li R., Wozney J.M. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors//*J. Bone Jt. Surg.*2003.Vol.85.P.96-111.
83. Stanton D.C., Chou J.C., Carrasco L.R. Injectable calcium-phosphate bone cement (Norian) for reconstruction of a large mandibular defect: a case report//*J. Oral Maxillofac. Surg.*2004.Vol.62.P.235-240.
84. Sugawara A., Chow L.C., Takagi S. et al. In vitro evaluation of the sealing of a calcium phosphate cement when used as a root canal sealer-filler//*J. Endod.*1990.Vol.16.P.162-165.
85. Sugawara A., Fujikawa K., Kusama K. et al. Histopathologic reaction of calcium phosphate cement for alveolar ridge augmentation//*J. Biomed. Mater. Res.*2002.Vol.61.P.47-52.
86. Sugawara A., Nishiyama M., Chow L.C. et al. A new biocompatible material: calcium phosphate cement//*Biomedical applications.*1990b.Vol.38.P.348-354.
87. Suhm N., Gisep A. Injectable bone cement augmentation for the treatment of distal radius fractures: a review//*J. Orthop. Trauma.*2008.Vol.22.P.S121-S125.
88. Takagi S., Chow L., Hirayama S. et al. Premixed calcium-phosphate cement pastes//*J. Biomed. Mater. Res.*2003.Vol.67B.P.689-696.
89. Takagi S., Chow L.C. Formation of macropores in calcium phosphate cement implants//*J. Mater. Sci. Mater. Med.*2001.Vol.12.P.135-139.
90. Takagi S., Chow L.C., Ishikawa K. Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements//*Biomaterials.*1998.Vol.19.P.1593-1599.

91. Tanaka S., Kishi T., Shimogoryo R. et al. Biopex acquires anti-washout properties by adding sodium alginate into its liquid phase//Dental Mater. J.2003.Vol.22.P.301-312.
92. Tas A.C. Preparation of porous apatite granules from calcium phosphate cement//J. Mater. Sci. Mater. Med.2008.Vol.19.P.2231-2239.
93. Temenoff J.S., Mikos A.G. Injectable biodegradable materials for orthopedic tissue engineering//Biomaterials.2000.Vol.21.P.2405-2412.
94. Urist M.R., Lietze A., Dawson E. Beta-tricalcium phosphate delivery system for bone morphogenetic protein//Clin. Orthop.1984.Vol.187.P.277-280.
95. Xu H.H., Eichmiller F.C., Barndt P.R. Effects of fiber length and volume fraction on the reinforcement of calcium phosphate cement//J. Mater. Sci. Mater. Med.2001.Vol.12.P.57-65.
96. Xu H.H., Weir M.D., Simon C.G. Injectable and strong nano-apatite scaffolds for cell/growth factor delivery and bone regeneration//Dent. Mater.2008.Vol.24.P.1212-1222.
97. Xu H.H.K., Quinn J.B. Calcium phosphate cement containing resorbable fibers for short-term reinforcement and macroporosity//Biomaterials.2002.Vol.23.P.193-202.
98. Zins J.E., Moreira-Gonzalez A., Papay F.A. Use of calcium-based bone cements in the repair of large, full-thickness cranial defects: a caution//Plast. Reconstr. Surg.2007.Vol.120.P.1332-1342.
99. Zins J.E., Moreira-Gonzalez A., Parikh A. et al. Biomechanical and histologic evaluation of the Norian craniofacial repair system and Norian Craniofacial Repair System Fast Set Putty in the long-term reconstruction of full-thickness skull defects in a sheep model//Plast. Reconstr. Surg.2008.Vol.121.P.271e-282e.
100. Zins J.E., Papay F.A. Use of Calcium-Based Bone Cements in the Repair of Large, Full-Thickness Cranial Defects: A Caution//Plast. Reconstr. Surg.2007.Vol.120.P.1332-1343.

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА НА СВОЙСТВА МАТЕРИАЛОВ В СИСТЕМЕ ГИДРОКСИАПАТИТ – КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ

*Гольдберг М.А.¹, Смирнов В.В.¹, Куцев С.В.¹, Меледин А.А.¹, Баринцов С.М.¹,
Сергеева Н.С.², Свиридова И.К.², Кирсанова В.А.², Ахмедова С.А.²*

¹ Учреждение Российской академии наук

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН

E-mail: naiv.syper@gmail.com

² ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт

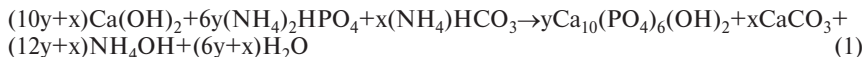
им. П.А.Герцена Росмедтехнологий»

E-mail: prognos.06@mail.ru

Поиск и разработка новых биосовместимых биорезорбируемых материалов для замещения костных дефектов различного генеза (травмы, опухолевые заболевания, остеопороз), а также направленной регенерации и восстановления функций поврежденных тканей является актуальной проблемой современного биоматериаловедения. Один из подходов в решении проблемы поиска биорезорбируемых материалов основан на применении материалов на основе гидроксиапатита (ГА) и второй более резорбируемой фазы – карбонат кальция (КК) [1]. Известно, что материалы природного происхождения, а именно натуральные кораллы ряда семейств (Astroporidae, Porites, Gonioporidae и др.), состоящие из КК, являются биосовместимыми и биорезорбируемыми материалами[2].

Целью данной работы было исследование влияния условий синтеза на свойства материалов в системе гидроксиапатит – карбонат кальция, содержащие 20, 40, 50, 70 и 80 масс. % карбоната кальция. Данные материалы были синтезированы методом осаждения из водных растворов согласно реакции (1). Время старения материалов в маточном растворе составляло 1 и 21 сутки.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ



Согласно данным рентгенофазового анализа (Shimadzu XRD-6000), состаренные в течение 1 суток порошки имели низкую степень закристаллизованности и содержали 2 фазы: ГА и КК. С повышением содержания CO_3^{2-} групп, кристалличность материалов возрастала. РФА порошков, состаренных в течение 21 суток, показал значительное увеличение степени закристаллизованности апатитовой фазы. При этом фазовый состав порошков не изменялся (рис. 1).

Содержание CO_3^{2-} групп в порошках измеряли с помощью прибора Leco CS400. Было показано, что расчетные значения содержания CO_3^{2-} и измеренные величины в порошках, состаренных на 1 и 21 сутки, близки.

ИК-спектроскопия Фурье проводилась на приборе Avatar, в качестве образцов использовали порошки в КВг. В ИК-спектрах всех материалов присутствовали полосы поглощения PO_4^{3-} , OH^- , CO_3^{2-} групп. По отношению к интенсивности фосфатных групп, интенсивность полос CO_3^{2-} групп в областях $1300\text{--}650$ (ν_3) и $873\text{--}877$ (ν_2) cm^{-1} , присутствующих в спектрах, и, особенно, полосы при $712\text{--}714$ cm^{-1} , возрастала с увеличением содержания КК [3]. После старения у всех порошков наблюдалось смещение полосы отражения при $1300\text{--}1650$ cm^{-1} в сторону меньших волновых чисел и рост интенсивности всех полос CO_3^{2-} (рис. 2).

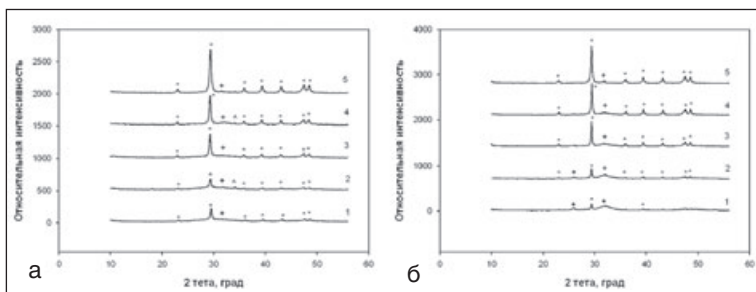


Рис. 1. Рентгенограммы материалов 1-5, а – состаренных 1 сутки, б – состаренных 21 сутки, где: + – ГА, ^ – CaCO_3 , ^ – $\text{Ca}(\text{OH})_2$.

Для оценки термической устойчивости материалов были проведены дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК), термогравиметрия (СТА 409 Luxx) и масс-спектрометрия (квадрольный масс-спектрометр Aëlos). По данным масс-спектрометрии, выделяющийся в процессе термического разложения материалов на воздухе газ имел молекулярную массу 44 г/моль, что соответствует CO_2 . Согласно данным ДСК для материалов с низким содержанием КК пик, соответствующий началу термического разложения, проявлялся при 684°C для материала 1, и 697°C для материала 2, данная температура характерна для разложения КК (рис. 3а)[4].

Второй пик можно отнести к разложению карбонатзамещенного гидроксиапатита (КГА) при температуре 750°C для материала 1, и 770°C для материала 2. Разницу в температурах начала термического разложения можно объяснить увеличением размера частиц КК в порошке при переходе от 1-го к материалу 2. Для материалов 3-5 характерен один пик теплового эффекта. Это связано с дальнейшим увеличением размера частиц КК в порошках 3-5, и как следствие повышение температуры их разложения. Данный эффект приводит к совмещению пиков, соответствующих разложения КК и КГА (размер частиц КГА для всех материалов отличается незначительно). Температура начала термического разложения для материала 3 составила 724° , для материала 4 – 756°C и для материала 5 – 766°C . На рисунке 3б представлены потери массы материалов при прокаливании по данным термогравиметрии.

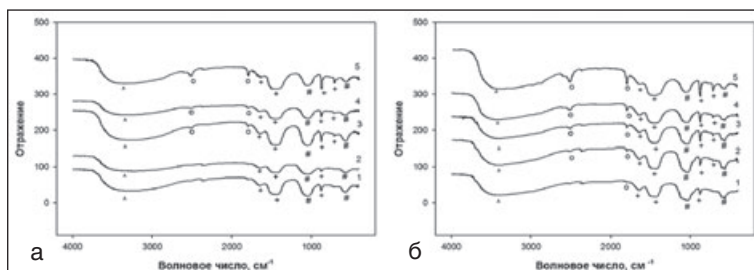


Рис.2. ИК спектроскопия материалов 1-5, а – состаренных 1 сутки, б – состаренных 21 сутки, где ^ – OH, o – CO₃²⁻ в CaCO₃, + – CO₃²⁻ в карбонат-замещенном гидроксиапатите (КГА).

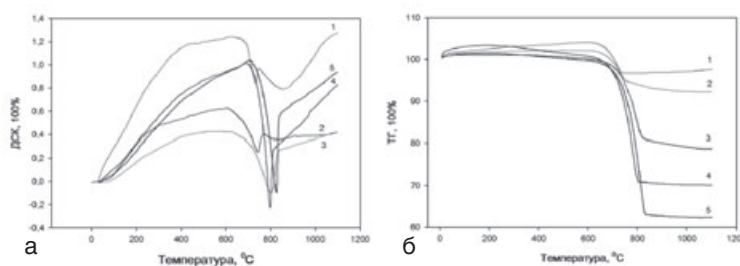


Рис.3. Дифференциальная сканирующая калориметрия (а) и термогравиметрия (б) материалов 1-5.

В соответствии с данными просвечивающей электронной микроскопии (JEM-100CX), материалы, состаренные в течение 1 суток, состояли из округлых частиц со средним размером около 10 нм и стержневидных длиной до 50 нм. Порошки, полученные после 21 суток старения, состояли из частиц гексагональной призматической формы со средним размером 10-30 нм. Площадь удельной поверхности порошков, состаренных в течение 1 суток, (Tristar Micromeretics) понижалась от 87 до 23 м²/г с повышением содержания КК, в материалах, состаренных в течение 21 суток – от 238 м²/г до 24 м²/г, соответственно.

Полученные порошки прессовали при давлении 100 МПа в стальных пресс-формах. Обжиг проводили в муфельных печах в среде углекислого газа при температуре от 660 до 720 °С. Низкая температура спекания являлась следствием применения ультрадисперсных порошков и модифицирующей добавки, содержащей карбонат-ионы. Введение добавки стабилизировала фазовый состав материалов при спекании за счет повышения концентрации карбонат-ионов, что препятствовало разложению КК при температурах выше 600 °С. С увеличением времени старения с 1 до 21 суток материалы начинали спекаться до плотного состояния при более низкой температуре (1 сутки – 720 °С, 21 сутки – 680 °С), что связано с увеличением дисперсности состаренных на больший срок порошков.

По данным сканирующей электронной микроскопии (микроскоп LEO 1420), в спеченных при T=720 °С образцах материалов, состаренных 1 сутки, по мере увеличения содержания КК, форма зерен ГА изменялась от гексагональной до округлой, а также увеличивался размер призматических кристаллов КК (рис.4).

Средний размер зерен для материала 1, состаренного в течение 1 суток, составлял около 100-200 нм и достигал величины 500 нм для материала 5. Материалы, состаренные в течение 21 суток, спеченные при T=680 °С имели аналогичную микроструктуру, при этом в материале 1 наблюдалось практически беспористое состояние,

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

средний размер зерна 150–200 нм. В материале 5 размер зерен КК достигал 1 мкм.

Растворимость была измерена на образцах, состаренных в течение 1 суток и спеченных при 6800С при температуре 37°С ионно-селективным электродом по кальцию (Эконикс-Эксперт Эксперт 001) в деионизированной воде и изотоническом растворе для инъекций (раствор 0,9 масс. % NaCl). Содержание ионов Ca²⁺ в деионизированной воде изменялось от 8 до 12 мг/л по мере увеличения содержания КК, а в изотоническом растворе – от 10 до 12 мг/л, соответственно. Увеличение растворимости в изотоническом растворе соответствует данным [5].

Согласно испытаниям *in vitro*, все исследуемые образцы были не токсичны для клеток, поддерживали адгезию, распластывание и пролиферацию фибробластов человека.

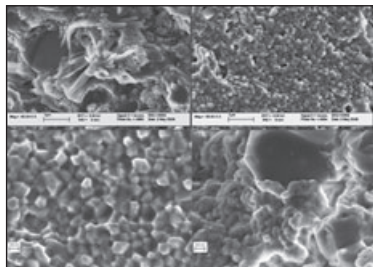


Рис.5. Микрофотографии материалов 1 и 5, а – состаренных в течение 1 суток, б – состаренных в течение 21 суток.

Материал 1 Материал 5

В результате методом осаждения из водных растворов с последующим старением в течение 1 и 21 суток были получены композиционные порошки в системе гидроксиапатит – карбонат кальция, содержащие 12–50 масс. % CO₃²⁻ групп. Площадь удельной поверхности порошков достигала 238 м²/г. Нанодисперсный размер порошков, использование низкоплавкой добавки, содержащей карбонат-ионы способствовало снижению температура спекания до 680°С и предотвращало термическое разложение материалов. Была получена керамика с размером частиц от 100 до 500 нм. Разработанные материалы по своим характеристикам растворимости и отсутствия токсической реакции перспективны для инженерии костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ грант №08-08-00224а

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1 М. А. Gol'dberg, V. V. Smirnov, S.V. Kutsev, T.V. Shibaeva, L.I. Shvorneva, N.S. Sergeeva, I.K. Sviridova and S. M. Barinov, Hydroxyapatite–Calcium Carbonate Ceramic Composite Materials// Inorganic Materials, 2010, Vol. 46, No. 11, pp. 1269–1273
- 2 Chissov, V.I., Sviridova, I.K., Sergeeva, N.S., et al., In Vivo Study of Bone Defect Substitution with Porous Granulated Bioceramic Materials in Rats: Biocompatibility and Dynamics, Klet. Tekhnol. Biol. Med., 2008, no. 3, pp. 151–156.
- 3 Daculsi, G., Biphasic Calcium Phosphate Concept Applied to Artificial Bone, Implant Coating and Injectable Bone Substitute, Biomaterials, 1998, V.19, pp. 1473–1478.
- 4 Rehman I., Bonfield W. Characterisation of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy // J. Mater. Sci. Mater. Med. 1997, v. 8, p.1-4.
- 5 Kogan V.B., Ogorodnikov S.K., Kafarov V.V. Reference book on solubility. V.3, N.2, Leningrad. Science. 1969.

STUDY OF INFLUENCE OF SYNTHESIS CONDITIONS ON THE MATERIALS IN THE HYDROXYAPATITE – CALCIUM CARBONATE SYSTEM PROPERTIES

M.A. Goldberg, V.V. Smirnov, V.S. Kutsev, A.A. Meledin, S.M. Barinov, N.S. Sergeeva, I.K. Sviridova, V.A. Kirsanova, S.A. Akhmedova

The effect of synthesis conditions on properties of materials in the hydroxyapatite – calcium carbonate system, containing 20, 40, 50, 70 and 80 wt. % calcium carbonate, was studied in this work. The influences of powders ripening time on phase composition, morphology and particle size were investigated. As a result of using nanopowders, additives and control of sintering conditions the new composite ceramics materials in the hydroxyapatite – calcium carbonate with low sintering temperature (lower 750°C) and 100-500 nm crystals sizes were obtained. Developed materials due to their properties of solubility and absence of toxic reaction are promising for bone tissue engineering.

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА, СОДЕРЖАЩИХ ТИТАН

*А.А. Егоров, В.В. Смирнов, А.С. Лысенков, Н.В. Бакунова,
С.В. Куцев, С.М. Баринов*

Учреждение Российской Академии наук

Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН

E-mail: barinov@imet.ac.ru

В работе были проведены исследования взаимодействия титана с гидроксиапатитом и фторгидроксиапатитом до 1200°C в различных газовых средах. Исследовано влияние пассивации частиц титана на процесс окисления при 700-900°C. В результате отработки режимов спекания методом горячего прессования были получены плотные композиционные образцы при температуре ниже 650°C с сохранением металлического титана и прочностью при изгибе до 90-110 МПа, трещиностойкостью до 3,2-3,8 МПа • м^{1/2}.

Материалы на основе гидроксиапатита (ГА) являются перспективными для изготовления костных имплантатов, т.к. по минеральному составу соответствуют костной ткани человека. ГА, несмотря на высокую устойчивость к биологической деградации, подвержен медленной резорбции под действием жидкостей организма, особенно в условиях действия кислой среды, что приводит к его коррозии и как следствие, снижению прочностных характеристик имплантата. Известно, что введение в состав ГА фтора повышает его устойчивость к кариесу, термодинамическую стабильность и уменьшает растворимость в водных средах. Поэтому имплантаты из фторгидроксиапатита (ФГА) могут обладать большей долговременной эксплуатационной надежностью в организме по сравнению с ГА-имплантатами. Недостатками как ГА- так и ФГА-керамики является хрупкость и невысокая прочность. Повысить уровень механических свойств керамики можно посредством ее армирования. Эффективным является армирование хрупкой керамики дисперсными частицами пластичного металла, особенно титана, который биологически инертен и устойчив к коррозии.

В настоящей работе были получены композиционные материалы в системе гидроксиапатит – титан (ГА-Ті). Частицы титана вводили в качестве армирующего компонента. Использовали механическую смесь порошка гидроксиапатита со средним размером частиц 30-40 нм и порошка Ті средним размером 5 мкм в соотношении 60 и 40 масс.%, соответственно. В работе изучали термическое поведение компонентов систем ГА-Ті и фторгидроксиапатит - титан (ФГА-Ті) до температуры 1000-1200°C.

Исследование взаимодействия между порошками титана и гидроксиапатита при температурах 700-1200°C показало, что при обжиге на воздухе титан активно окисляется, начиная с температуры 700°C, при температуре 800°C процессы окисления

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

заканчиваются образованием высшего оксида титана - TiO_2 . Это косвенно подтверждается данными дифференциально термический анализ (ДТА) и термогравиметрический анализ (ТГ). Экзотермический эффект обусловлен окислением титана до субоксида и затем, рутила в диапазоне $700\text{--}800^\circ\text{C}$, при этих же температурах происходит прирост массы, связанный с окислением. При более высоких температурах в смеси присутствуют лишь две кристаллические фазы: TiO_2 и CaTiO_3 , причем содержание последнего уменьшается с повышением температуры от 900 до 1200°C вследствие его растворения в аморфной фазе фосфатов кальция. Использование углеродной засыпки при обжиге приводит к ингибированию разложения ГА и уменьшению количества TiO_2 в результате его частичного восстановления до низших оксидов. Таким образом, использование углеродной засыпки при обжиге является простым способом стабилизации ГА и регулирования процессов окисления и разложения компонентов системы ГА-Ті при высоких температурах термообработки. Исследование взаимодействия между порошками титана и фторгидроксиапатита при температурах $700\text{--}1000^\circ\text{C}$ показало, что при обжиге на воздухе титан активно окисляется, начиная с температуры 700°C , при температуре 800°C процессы окисления заканчиваются образованием высшего оксида титана - TiO_2 . При более высоких температурах в смеси лишь две кристаллические фазы: TiO_2 и ФГА

С целью предотвращения окисления титановой составляющей в композите ГА (ФГА)-Ті была предпринята попытка предварительной пассивации частиц титана. Для этого на титановый порошок размером $300\text{--}400$ мкм наносили защитный поверхностный слой кремния в количестве $5, 10, 20$ масс.% с последующей термообработкой на воздухе при температуре $700\text{--}900^\circ\text{C}$. Как показал рентгенофазовый анализ (РФА), увеличение количества кремния позволяло резко снизить окисление титана. Так при обжиге на воздухе при 800°C в образцах, содержащих 5 масс.% кремния, основной титаносодержащей фазой являлся рутил - TiO_2 , для 10 масс.% - основной фазой - субоксид титана Ti_3O_5 , а для 20 масс.% - титан. Также был использован альтернативный способ пассивации титана - азотирование поверхности частиц титана в среде азота. Процесс проводили при температуре от 1050 до 1200°C при избыточном давлении азота $0,01$ МПа. По данным РФА процесс образования соединений в системе Ті- N зависел от температуры и времени азотирования. При температуре 1200°C - основные фазы $\text{Ti}_{0,83}\text{N}_{0,17}$, TiN и незначительное количество титана. С уменьшением температуры до 1050°C количество металлического титана возрастает, особенно это проявляется при уменьшении времени термообработки с 1 часа до 30 минут, когда титан становится одной из основных фаз. Также содержатся переходные нитриды титана - Ti_2N , $\text{TiN}_{0,3}$, $\text{TiN}_{0,9}$.

Таким образом, были отработаны методы пассивации частиц титана с получением защитных слоев, получаемых при механическом покрытии кремнием и нитридами титана при азотировании в результате высокотемпературной обработки.

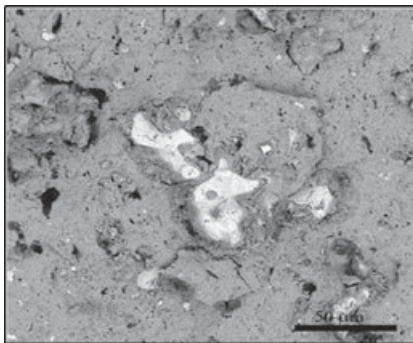


Рис.1. Микрофотография композиционного материала ГА-титан 40 масс.%.

Однако при введении в нанодисперсный порошок ФГА пассивированных частиц титана, покрытых кремнием, процессы окисления металлической составляющей предотвратить не удалось. Поэтому в дальнейшем также проводили исследования получения композитов с использованием метода горячего прессования. Процесс проводили при 550-620°C в среде аргона при давлении 20-30 МПа, композиционные материалы на основе ГА содержали до 40 масс.% титана с размером частиц от 1 до 400 мкм (рис.).

В результате использования нанодисперсного порошка ГА и отработки режимов обжига удалось сохранить металлический титан и получить плотность материала близкой, к теоретической. Наиболее высокие механические свойства показали образцы, содержавшие 40 масс.% титана: прочность при изгибе до 90-110 МПа, трещиностойкость до 3,2-3,8 МПа • м^{1/2}.

*Работа поддержана проектом Программы №2 фундаментальных исследований
Отделения химии и наук о материалах РАН*

SYNTHESIS AND PROPERTIES OF COMPOSITE MATERIALS BASED ON HYDROXYAPATITE, CONTAINING METALLIC TITANIUM

A.A. Egorov, V.V. Smirnov, A.S. Lisenkov,
N.V. Bakunova, S.V. Kutsev, S.M. Barinov

*A.A. Baikov Institute of Metallurgy and Materials Science, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Leninskiy pr. 49,
E-mail: barinov@imet.ac.ru*

A research of interaction of metallic titanium with hydroxyapatite and fluor-substituted hydroxyapatite has performed over the temperature range up to 1200°C in various gas environments. An influence of passivation of titanium particles on oxidation process was investigated at 700-900°C. As a result the high density composite samples have been obtained by hot pressing at 650°C. Metallic titanium existed in samples. The highest bending strength and fracture toughness was 90-110 MPa and 3,2-3,8 MPa • m^{1/2}, respectively.

ЗАВИСИМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ОТ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Каплун А.П., Безруков Д.А., Швец В.И.

*Московская государственная академия тонкой химической технологии имени им. М.В.Ломоносова.
alex.kaplun@mail.ru*

Средства доставки лекарственных субстанций в виде наночастиц – особая лекарственная форма, которая позволяет существенным образом изменить фармакокинетику субстанции. Размер, форма и свойства поверхности имеют определяющее значение. Наиболее широко известный эффект наночастиц – пассивное нацеливание в области с увеличенными порами в капиллярах (раковые опухоли). Форма наночастиц оказывает влияние на их взаимодействие с клетками. Модификация поверхности полярными полимерами увеличивает время циркуляции. Преодоление физиологических барьеров, таких как гематоэнцефалический, требует специальных свойств поверхности. Нацеливание на определенный вид клеток достижимо с помощью молекулярного адреса на поверхности.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Главная проблема современной медицины – низкая селективность лекарственных средств. Обычно 1% введенной дозы попадает в клетки-мишени. Остальное распределяется по организму, вызывая побочное действие. Заключение лекарственной субстанции в наночастицы может существенно увеличить селективность.

Влияние размера наночастиц на распределение в организме. Известны барьеры с характерными порами. Через почки выходят молекулы 40 кДа (~5-10 нм) [1]. При нормальных условиях наночастицы улавливаются фильтрацией синусоидами селезенки и удаляются клетками РЭС [2]. Наночастицы с размером до 15 мкм аккумулируются в печени, селезенке и костном мозге [3]. В норме в капиллярах поры <40 нм. В опухолях в капиллярах поры до 200-600 нм [4]. Межфибриллярные расстояния в экстрацеллюлярном матриксе опухоли менее 40 нм [5]. Фенестрация в селезенке не превышает 200-500 нм [6], и частицы размером более ~200 нм, должны иметь способность к деформации, чтобы остаться в кровообращении.

Влияние формы наночастиц на эффективность взаимодействия с клетками. Только в последнее время начали появляться данные, позволяющие оценить влияние формы частиц на эффективность взаимодействия с клетками организма, в частности, эндоцитоза [7]. От формы частиц также зависит скорость движения в сосудах и адгезия в них. Наиболее впечатляющие результаты были получены при исследовании очень длинных гибких филаментов [8]. Было показано, что «филомицеллы» длиной до 15 мкм и диаметром 22-60 нм циркулируют в крови более 5 суток! Небольшой диаметр позволяет таким филомицеллам проходить через узкие полости в селезенке, а длина, сравнимая с размерами клеток человека, делает эндоцитоз практически невероятным. Паклитаксел, загруженный в филомицеллы эффективно уменьшал размер раковой опухоли *in vivo*.

Лечение злокачественных опухолей. Главное свойство наночастиц – пассивное нацеливание – наибольший эффект дает для лечения солидных опухолей. Первым одобренным нанопрепаратом, очевидно, следует считать Sandimmune (Novartis) – циклоспорин, солюбилизованный в мицеллы полиоксиэтилированным касторовым маслом (Stemorphor EL). Следующими стали липосомы, загруженные антрациклинными антибиотиками (Daunoxome, Doxil). В 2005 г. был одобрен первый препарат на основе конъюгата противоопухолевой субстанции (паклитаксела) и наночастиц из человеческого альбумина – Abraxane; Abraxis/AstraZeneca. Круг типов используемых наночастиц увеличивается. Представляет большой интерес недавняя работа лаборатории Francis C. Szoka [9]. Там синтезировали необычный дендример в виде бачочки. Край одного крыла модифицирован цепями ПЭГ для увеличения времени циркуляции, к активным группам второго края присоединены молекулы доксорубина через рН-чувствительные гидразонные связи. В результате в культуре данный дендример проявлял токсичность к раковым клеткам более чем в 10 раз большую, чем раствор. На мышях с привитой саркомой С-26 единственная доза дисперсии описанного дендримера на восьмой день после прививки наблюдалась полная ремиссия опухоли; выживаемость на 60 день была стопроцентной.

Свойство наночастиц захватываться клетками РЭС используется для конструирования двух типов медицинских препаратов: для лечения внутриклеточных инфекций (в первую очередь, противотуберкулезных) и как иммунные адъюванты.

Иммунные адъюванты. Как уже упоминалось выше, захват наночастиц, загруженных антигенами, макрофагами, которые являются антиген-представляющими клетками, должно приводить к значительному увеличению иммунного ответа. Так, было показано, что адсорбция белков вируса гриппа (N5H1) на сферических аморфных наночастицах из тритерпеноидов бересты приводит к увеличению титра антител в два раза [10] по сравнению со стандартным адъювантом (гидроксид алюминия). В данном случае также минимальный размер неоптимален. Это связано с «предпочтениями» макрофагов к эндоцитозу.

Прохождение через ГЭБ. В процессе конструирования липосомального препарата для лечения болезни Паркинсона [11] нами было показано, что содержимое липосом проходит через ГЭБ практически в 100 раз лучше, чем отдельные молекулы [12]. В дальнейшем это парадоксальное явление было многократно подтверждено. В частности, это было продемонстрировано для наносфер из поли(бутилцианоакрилатов), покрытых твином-80. Относительно недавно это явление получило объяснение: через ГЭБ проникают наночастицы, способные адсорбировать апополипротеины В или Е. А так как на эндотелии капилляров мозга экспонированы рецепторы липопротеинов, то наночастицы с ассоциированными апополипротеинами проходят через эндотелиальный слой трансцитозом, мимикрируя под липопротеины.

Уменьшение токсичности. Заключение субстанции в наночастицы на время изолирует ее от организма, то есть защищает организм от токсического действия субстанции, с одной стороны, и защищает субстанцию от воздействия ферментов организма. Загрузка субстанции в наночастицы понижает токсичность и вследствие эффекта пассивного нацеливания. Так, полимерные наносферы с доксорубицином практически не проникают в сердце и, кардиотоксичность, характерная для данной субстанции, резко уменьшается [13]. Значительное увеличение концентрации в мозге и уменьшение токсичности привело к тому, что лекформа на основе наносфер проявляет высокую противоопухолевую активность на перевиваемой глиобластоме крыс: увеличение продолжительности жизни у леченных животных составило 85%; у 25% животных, выживших в течение 6 месяцев, не было отмечено клинических и гистохимических признаков опухолевого роста [14].

Защита субстанции от преждевременной деградации. Этот эффект вносит существенный вклад в увеличении эффективности липосомальной формы противопаркинсонического препарата ДОФА. Известно, что около 80% ДОФА, введенного в виде таблеток, декарбоксилируется в периферической крови. Образующийся в результате дофамин определяет основные побочные явления, характерные при использовании ДОФА. Нами было показано, что введение ДОФА, загруженного в липосому, приводит к уменьшению равноэффективной дозы более чем в 10 раз [15]. При этом время действия препарата увеличивается в 2-3 раза. Этот эффект является следствием депонирования.

Депонирование. Субстанция, заключенная в наночастицы, защищена от преждевременной деградации и высвобождается постепенно, что приводит к пролонгированию действия. Так, липосомальный баларпан в два раза быстрее заживляет повреждения роговицы, чем раствор баларпана [16].

Инкапсуляция лекарственных субстанций в мультивезикулярные липосомы (DeroFoam®) представляет собой новый подход к пролонгации действия лекарственных препаратов [17]. Частицы DeroFoam® представляют собой мультивезикулярные липосомы – агрегаты сотен полиэдрических компартментов отделенных друг от друга неконцентрическими липидными бислоями [17]. В настоящее время, FDA одобрило два лекарственных препарата на основе DeroFoam® для клинического применения. DeroCyte® – дисперсия цитарабина, инкапсулированного в мультивезикулярные липосомы, для лечения лейкозного менингита. Период полувыведения DeroCyte® составляет 130–277 ч. DeroDur™ – лекарственная форма сульфата морфина. При единичной эпидуральной инъекции DeroDur™ способен облегчать послеоперационную боль в течение нескольких дней.

Солубилизация плохо растворимых субстанций. Одна из самых острых проблем современной фармакологии – плохая растворимость субстанций. Для увеличения биодоступности вещество должно быть довольно гидрофобным и, следовательно, плохо растворимым. Наночастицы наряду с амфифильными полимерами могут существенным образом увеличить концентрацию субстанции в растворе [18]. В частности, нам удалось увеличить концентрацию бетулиновой кислоты в 120 раз включением ее в липосомы [19], и в 1500 раз включением в наночастицы из тритерпеноидов

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

бересты и фосфатидилхолина [20].

Активное нацеливание. Активное нацеливание предполагает присоединение к наночастицам «молекулярного адреса». Важно отметить, что репертуар поверхностных белков на здоровых и «больных» клеток идентичен – разница лишь в уровне экспрессии. Например, рецепторы для фолиевой кислоты, для трансферрина на опухолевых клетках представлены в несколько раз больше, чем на здоровых. Таким образом, фолиевая кислота или трансферрин, могут служить для нацеливания на раковые клетки [21, 22]. Подобное нацеливание незначительно влияет на распределение наночастиц по органам и тканям, но существенно увеличивает эффективность внутриклеточной доставки [23].

Относительно недавно начало развиваться еще одно направление химиотерапии опухолей, связанное с нацеливанием на эндотелий капилляров опухоли. Одна из таких методик использует в качестве молекулярного адреса трипептид RGD, с хорошей константой связывания с интегрином $\alpha V\beta 3$, характерным для указанных сосудов. Нацеливаемые подобным образом липосомы дают 15-кратное увеличение концентрации по сравнению с со свободным лекарством [24]. Было показано, что ангиогенез ингибируется почти на 70%.

Одним из самых значительных событий в онкологии последних лет является открытие того факта, что простата-специфический мембранный антиген экспрессируется на эндотелии практически всех солидных опухолей и отсутствует в капиллярах нормальных тканей [25]. Антитела J591, специфичные к данному антигену, стали основой для терапевтических и диагностических препаратов [26].

Нацеливание внутри клетки. Адресная доставка внутри клетки – следующая задача, решение которой может на порядок улучшить эффективность лекарства. Как правило, наночастицы попадают в клетку через эндоцитоз. Для того, чтобы избежать переваривания в лизосоме, куда содержимое эндосом направляется, необходимо, во-первых, организовать выход содержимого наночастиц из эндосомы, и, во-вторых, снабдить наночастицы специальным сигналом для доставки в нужную органеллу. В качестве сигнала для покидания эндосомы используют pH внутри нее. В состав наночастиц включают компоненты, которые резко изменяют свои свойства при значениях pH около 5,5. Это могут быть липиды и полимеры [27], изменяющие свою форму при подкислении, липиды и полимеры, гидролизующиеся в среде эндосомы [27]. Известны подходы для нацеливания по крайней мере, в три типа органелл: ядро [28], митохондрии [29] и периксисомы [30].

Работа выполнена в рамках федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» 2009-2013 гг. ГК №14.740.11.0120 в рамках мероприятия 1.1.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vinogradov S.V., Bronich T.K., Kabanov A.V. Adv. Drug Deliv. Rev. 54 135-147 (2002).
2. Moghimi, S. M., Hunter, A. C., Murray, J. C. Pharmacol. Rev. 53, 283–318 (2001).
3. L. Ilium, S. S. Davis, C. G. Wilson et al. Int. J. Pharm. 12, 5–146 (1982).
4. Hobbs SK, Monksy WL, Yuan F, et al. PANS. 95, 4607–4612, (1998).
5. A. Pluen, Y. Boucher, S. Ramanujan, et al. . PANS. 98, 4628–4633 (2001).
6. Moghimi S. M., Hunter A. C. Murray J. C. Pharmacol. Rev. 53, 283–318 (2001).
7. J. A. Champion, Y. K. Katare, S. Mitragotri. J. Contr. Release. 121, 3-9. (2007).
8. Y. Geng, P. Dalhaimer, S. Cai et al. Nature Nanotech. 2, 249–255 (2007).
9. Lee C. C. E. R. Gillies, M. E. Fox, et al. PANS. 103, 16649–16654 (2006).
10. И.В.Красильников, А.С.Гамбарян, В.В.Машин и др. *Вопр. вирусол.* 2. 24–29 (2010).
11. I.V.Zhigaltsev, A.P.Kaplun, V.G.Kucheryanu et al. J. Liposome Res. 11. 55-71 (2001).
12. V.V.Yurasov, I. V.Zhigaltsev, V. G. Kucheryanu, et al. J. Liposome Res. 8. 73. 1998.
13. E. Pereverzeva, I. Treschalina, D. Bodyagin, et al. Toxicology Lett. 178, 9-19 (2008).
14. С.Э.Гельперина, З. С. Смирнова, А. С. Халанский и др. *Российский биотерапевт. Ж.* 3. 56-64 (2004).

15. В.Г.Кучеряну, В.В.Юрасов, Г.Н.Крыжановский и др. Бюлл. эксперим. биол. мед. 123. 29-33 (1997).
16. Каплун А.П., Багров С.Н., Новиков С.В. и др. Патент РФ № 2172061. 2002.
17. Mantripragada S. Prog. Lipid Res. 41. 392–406 (2002).
18. R. G. Strickley. Pharm. Res. V. 21, 2004 201–230.
19. Ле Банг Шон, А.П.Каплун, А.А. Шпилевский и др. Биоорган. хим. 24. 787-793 (1998).
20. А.Н. Бастрич, В.В. Красильникова, Т.Н. Лыу и др. Биотехнология. 6. 51-59 (2008).
21. Gabizon A., Shmeeda H., Horowitz A.T. et al. Adv.DrugDeliv.Rev. 56, 1177-1192 (2004).
22. Daniels T. R., Delgado T., Helguera et al. Clin. Immunol. 121, 159–176 (2006).
23. Choi, C. H., Alabi, C. A., Webster et al. . PANS. 107, 1235–1240 (2010).
24. E. A. Murphy, B. K. Majeti, L. A. Barnes et al. PANS. 105 9343–9348 (2008).
25. Chang, S. S., Denise S. O'Keefe, Clin. Cancer Res. 5, 2674–2681 (1999).
26. Milowsky, M. I. D. M. Nanus, L. Kostakoglu, et al. J. Clin. Oncol. 25, 540–547 (2007).
27. D. C. Drummond, M. Zignani, J.-C. Leroux. Progr. Lipid Res. 39 409-460 (2000).
28. C.W.Poutona, K.M.Wagstaff, D.M.Roth et al. Adv. Drug Del. Rev. 59, 698-717 (2007).
29. Mukhopadhyay A, Weiner H. Adv. Drug Deliv. Rev. 59. 729-738 (2007).
30. S.R. Terlecky, J.I. Koepke. Adv. Drug Deliv. Rev. 59, 739-747 (2007).

DEPENDENCE OF BIOLOGICAL PROPERTIES OF NANODRUGS ON THEIR PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES

Kaplun A.P., Bezrukov D.A., Shvets V.I.

*M.V.Lomonosov' Moscow State Academy of Fine Chemical Technology
alex.kaplun@mail.ru*

Drug delivery systems as nanoparticles – the special formulation which allows to change substance pharmacokinetics essentially. The size, the form and properties of a surface have defining value. Most widely known effect of nanoparticles – passive targeting in sites with the enlarged pores in capillaries (cancer tumors). The nanoparticles form influences their interaction with cells. Surface modification by polar polymers enlarges circulation time. Overcoming of physiological barriers, such as BBB, demands special properties of a surface. Targeting on a certain kind of cells it is achievable by means of the molecular address on a surface.

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И СТЕКОЛ В СИСТЕМЕ $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$

Кузнецов А.В.¹, Сафронова Т.В.², Путляев В.И.³

¹ Первый московский медицинский университет имени И.М. Сеченова,

² Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
факультет наук о материалах,

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
химический факультет,

E-mail: ant2121kuz@rambler.ru

Для исправления и лечения костных травм и дефектов в последнее время разрабатываются материалы на основе минерала костной ткани гидроксиапатита (ГАП , $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) и других фосфатов кальция. Их преимущества основаны на химической схожести с неорганической составляющей кости и заключаются в нетоксич-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

ности, биосовместимости и биоактивности.

Костные импланты в зависимости от методики лечения должны обладать биорезистивностью (сопротивляемостью к растворению в среде организма) или биорезорбируемостью (постепенным или полным растворением в организме по мере нарастания новой кости), что определяется фазовым составом материала. Наибольшей резистивностью обладает ГАП. В качестве резорбируемой фазы используются трикальций фосфат (ТКФ, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), пирофосфат кальция (ПФК, $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$), фосфатные стекла и некоторые другие фосфаты кальция [1-4].

Целью работы было исследование взаимодействия ГАП и ПФК с фосфатными стеклами при получении резорбируемого керамического материала. Взаимодействие ГАП и ПФК со стеклами в системе $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ может благоприятно влиять на снижение температуры спекания, уплотнение и повышение прочности материала, содержащего только ГАП или ПФК. Для ГАП взаимодействие с фосфатными стеклами приведет также к повышению резорбируемости конечного материала. Отдельно фосфатные стекла обладают быстрой скоростью резорбции и невысокой прочностью, что препятствует их использованию в качестве материала для костного имплантата.

Были сварены 2 состава стекол в системе $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$, соответствующие 2-м легкоплавким эвтектикам, с содержанием CaO , равным 18,9 (1-ый состав) и 30,3 (2-ой состав) масс. %. Рассмотрены составы ГАП с добавлением 5, 10, 15, 20 масс. % каждого стекла. Аналогичные составы рассмотрены для ПФК. Прессовки смеси ГАП и стекла 1-ого состава обжигались при 900° и 1000°C ; прессовки ГАП со стеклом 2-ого состава – при 1000° , 1100°C с выдержкой в течение 6 часов в каждом случае. Данные образцы материалов и исходные порошки стекла исследовали с помощью РФА, SEM-микроскопии, элементного анализа; оценены линейные усадки и относительные плотности образцов. Аналогичная работа проведена для составов, содержащих ПФК. Установлены условия варки стекол.

Для образцов, содержащих изначально ГАП получены следующие данные. По результатам РФА полученные образцы содержали фазы ГАП и ТКФ в качестве основных после обжига. Изученные фосфатные стекла незначительно влияли на уплотнение и линейную усадку полученных композитов.

Для образцов, содержащих изначально ПФК, показано следующее. По данным РФА полученные образцы содержали фазы ПФК, а также фазу CaP_2O_6 в качестве основных после обжига в зависимости от исходного состава. Данные составы стекол благоприятно влияли на уплотнение и линейную усадку полученных композитов. Полученные керамические образцы могут рассматриваться в дальнейшем как биосовместимые резорбируемые материалы для костных имплантатов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Путляев В.И., Сафронова Т.В. Новое поколение кальцийфосфатных материалов: роль фазового и химического состава //Стекло и керамика, 2006, №3, с.30-33
2. Putlyaev V. I., Safronova T. V. A new generation of calcium phosphate biomaterials: the role of phase and chemical composition// Glass and Ceramics. 2006. - Vol. 6. - Nos. 3 – 4. P. 99 – 102
3. Tancred D. C., Carr A. J. The sintering and mechanical behavior of hydroxyapatite with bioglass additions// J. Mater. Sci. in Med. – 2001. – Vol. 12. – P. 81-93
4. Georgiou G., Knowles J.C. Glass reinforced hydroxyapatite for hard tissue surgery Part I: mechanical properties // Biomaterials. – 2001. – Vol. 22. P. 2811 – 2815
5. Малышева А.Ю., Белецкий В.И., Власова Е.Б. Структура и свойства композиционных материалов для медицинских применений // Стекло и керамика. – 2001. – №2. – С.28-31
6. Malysheva A. Yu., Beletskii B. I., Vlasova E. B. Structure and properties of composite materials for medical application// Glass and Ceramics. – 2001. – Vol. 58. № 1 – 2. – P. 66 – 69

**БИФАЗНАЯ РЕЗОРБИРУЕМАЯ КЕРАМИКА ТКФ/ПФК,
ПОЛУЧЕННАЯ ИЗ ПРОДУКТОВ РАЗЛОЖЕНИЯ
ОКТАКАЛЬЦИЕВОГО ФОСФАТА**

Кукуева Е.В.¹, Путляев В.И.¹, Сафронова Т.В.²

¹ МГУ им. М.В. Ломоносова, факультет наук о материалах

² МГУ им. М.В. Ломоносова, химический факультет

E-mail: ku-kunder@mail.ru

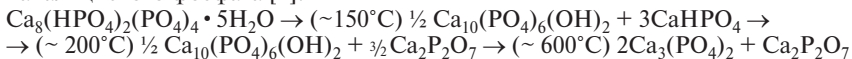
Бифазную резорбируемую керамику ТКФ/ПФК получали из продуктов термического разложения октакальциевого фосфата (ОКФ). ОКФ синтезировали гидролизом брусита в ацетатном буферном растворе. Порошки для приготовления керамики были получены разложением ОКФ при температурах 450°, 600° и 700°С. Исходный ОКФ и полученные порошки были охарактеризованы методами ИК-спектроскопии, РЭМ и РФА. Из полученных порошков были подготовлены образцы керамики ТКФ/ПФК с плотностью не менее 60% от теоретической. Спекание проводили при температурах 1000°, 1050° и 1100°С в течение 3 часов.

Основным принципом при создании биоматериалов для костных имплантатов первого поколения было соблюдение идентичности химического и фазового состава таких материалов костной ткани или ее неорганической составляющей. В качестве основы для создания биоматериалов для костных имплантатов долгое время рассматривали гидроксипатит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ГА).

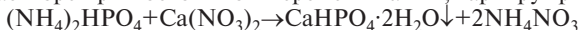
В связи с возрастающим интересом к фосфатам кальция (ФК) с соотношением Са/Р меньше, чем у гидроксипатита, и, следовательно, более растворимым, ведутся интенсивные исследования по созданию бифазных или многофазных материалов на основе порошков ФК, обладающих заданным пределом резорбирования. Основная трудность при получении многофазных материалов – синтез мелкокристаллических порошков, которые будут затем использоваться при получении биокерамики [1].

Традиционный метод подготовки шихты для получения керамического композиционного материала является тщательное смешивание порошков целевых фаз, предпочтительно синтезированных одним из химических способов. Ранее был рассмотрен один из способов получения композиционного керамического материала, содержащего ПФК и ТКФ, на основе порошковой смеси, состоящей из гидроксипатита (ГА) и монетита CaHPO_4 [2, 3]. Недостатком этого способа является как невозможность достижения высокой степени фазовой однородности шихты, так и использование в качестве одного из компонентов шихты брусита или монетита. Из-за удаления воды при конверсии этих веществ в ПФК при обжиге керамики велика вероятность формирования неоднородной микроструктуры керамического с материала с повышенной пористостью.

Нами предложен метод получения порошков различного состава для создания бифазной керамики на основе ТКФ и ПФК, с использованием реакции разложения октакальциевого фосфата [4]:



ОКФ синтезировали гидролизом брусита $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ в ацетатном буферном растворе при постоянном перемешивании, варьируя pH и температуру [2].



Показано, что ОКФ образуется в ацетатном буферном растворе при температуре 40°С; pH=6,5 при температуре 60°С; pH=5,75 и при температуре 90°С; pH=4,5. Эти условия являются оптимальными. При уменьшении pH в первых двух случаях или температуры – в третьем скорость гидролиза резко падает. По данным РЭМ кри-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

сталлы ОКФ пластинчатые, около 10 мкм в длину, форма сильно зависит от условий синтеза. Получившиеся порошки и исходный ОКФ были исследованы методами растровой электронной микроскопии (РЭМ), ИК-спектроскопии и методом рентгенофазового анализа (РФА).

Температурную обработку ОКФ проводили при температурах 450°, 600° и 700°С, время выдержки 1 час для каждой температуры [4,5]. Качественный состав получившихся при термообработке порошков был проведен методом РФА. По данным РФА можно сделать вывод, что при температуре 450°С продуктами термического разложения ОКФ являются ГА и γ -ПФК; при температуре 600 продукт состоит преимущественно ГА и γ -ПФК и β -ПФК, но присутствуют пики ТКФ; а при температуре 700°С фазы ГА не наблюдается, а продукт представляет собой смесь ТКФ и β -ПФК. Полученные продукты частично сохраняют пластинчатую структуру исходного ОКФ, однако, средний размер частиц полученных порошков колеблется от 100 до 500 нм, в зависимости от температуры разложения исходного ОКФ. Наименьший размер частиц зафиксирован у порошков, подвергшихся термолизу при 450°С.

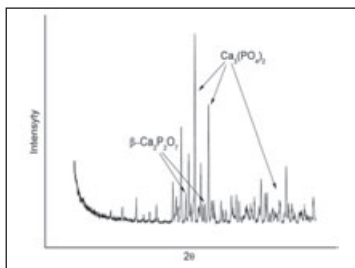


Рис.1. Рентгенограмма керамического материала ТКФ/ПФК.

Порошки, полученные при температурах 450°, 600° и 700°С, спрессовали в таблетки и провели спекание при температурах 1000°, 1050° и 1100°С. Полученные керамические материалы имеют плотность не менее 60% от теоретической. Рентгенофазовый анализ образцов полученной керамики показал, что все образцы состоят из ТКФ и ПФК (рис.1).

Порошки, полученные разложением при 700°С, спекаются преимущественно по диффузионному механизму. Спекание порошков, полученных разложением при 450° и 600°С, может проходить не только по диффузионному механизму, но и сопровождаться химической реакцией, что может благоприятно сказаться на их механических характеристиках.

Микроструктура полученной керамики приведена на рис.2. Средний размер зерна не превышает 2 мкм. При этом у образцов, спеченных при температуре 1000° размер средний размер зерна и плотность меньше, чем у образцов, полученных при более высокой температуре.

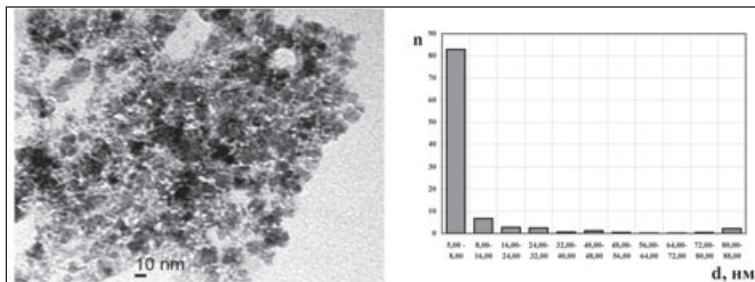


Рис. 2. Микрофотографии керамики ТКФ/ПФК, полученной спеканием при 1100°С в течение 3 часов, из исходных порошков, полученных разложением ОКФ: а) 450°С; б) 600°С; в) 700°С.

Работа была выполнена при частичной поддержке грантов РФФИ 09-03-01078-а, 10-03-00866, госконтракта №-П403 (НК-46П/35) от 30.07.2009 в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России на 2009 - 2013 годы».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Navarro M., Michiardi A., Castan O., Planell J. A. Biomaterials in orthopaedics// J. R. Soc. Interface. – 2008. – Vol. 5. – P. 1137-1158.
2. Сафронова Т.В., Путляев В.И., Шехирев М.А., Кузнецов А. В. Композиционная керамика, содержащая биорезорбируемую фазу //Стекло и керамика, 2007, №3, с.31-35.
3. Сафронова Т.В., Путляев В.И., Шехирев М.А., Третьяков Ю.Д. Способ получения керамического биодegradируемого материала, состоящего из пирофосфата кальция и трикальций-фосфата №2008152281 от 30.12.2008.
4. Каназава, Т. Неорганические фосфатные материалы: Пер. с японского./ Т. Каназава // Киев, Наукова думка. 1998. С. 86-111.
5. K. Sakamoto Synthesis and thermal decomposition of layered calcium phosphates including carboxylate ions / K. Sakamoto, S. Yamaguchi, M. Kaneno, I. Fujihara, K. Satoh, Y. Tsunawaki // Thin Solid Films 517 (2008), p. 1354-1357.

BIPHASIC RESORBABLE CERAMICS $Ca_3(PO_4)_2/Ca_2P_2O_7$ OBTAINED FROM DECOMPOSITION PRODUCTS OF OCP

E.V Kukuieva, V.I Putlyaev, T.V Safronova

Biphasic resorbable ceramics $Ca_3(PO_4)_2/Ca_2P_2O_7$ obtained from products of thermal decomposition $Ca_3(PO_4)_2(HPO_4)_2 \cdot 5H_2O$ (OCP). The OCP were prepared by hydrolysis of DCPD in the presence of acetate buffer solution. Decomposition of OCP was carried out at temperatures of 450, 600 and 700 °C. The resulting powders and the original OCP were investigated by scanning electron microscopy (SEM), infrared spectroscopy (IR) and by X-ray analysis (XRD). Of the powders were obtained ceramics $Ca_3(PO_4)_2/Ca_2P_2O_7$ with a density of at least 60% of theoretical. Sintering was carried out at temperatures of 1000°, 1050° and 1100°C in 3 hours.

ОЦЕНКА СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ С ЦЕЛЮ СОЗДАНИЯ БИОИНЖЕНЕРНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

*Решетов И.В. *, Васильев А.В. **, Батухтина Е.В. ***, Киселева Е.С. ***

*МНИОИ им. П.А.Герцена МЗ РФ г. Москва**

*Институт Биологии Развития им. Н.К. Кольцова РАН***

*кафедра онкологии ГОУ ИПК ФМБА****

Цель исследования: сформулировать требования к биологическим свойствам носителя для многокомпонентного клеточного трансплантата используемого для реконструкции трахеи.

Материалы и методы. Проведено экспериментальное исследование на 40 лабораторных животных – кроликах. Предметом экспериментальных исследований было изучение механизмов взаимодействия биоматериалов с компонентами многокомпонентного клеточного трансплантата. Особый интерес представляла оценка поведения хондроцитов на подложках-носителях и «*in vivo*». В работе были использованы следующие полимерные и биологические носители: биодegradируемая пористая губка «ЭластоПОБ-3D» изготовленная на основе бактериального сополимера полиоксипутирата с валератом и полиэтиленгликолем; «Биоматрикс», являющийся декальцинированной кортикальной костью; гранулы гидроксиапатита; полимер из солей молочной кислоты; аллогенная надкостница, аллогенная кость.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Предварительно производилось культивирование хондроцитов на поверхности подложки-носителя. Затем производилась имплантация клеточного трансплантата в сальник на 2 недели. Контрольную группу составляли животные с имплантированным клеточным эквивалентом (хондроциты в коллагеновом геле) в сальник. Через две недели животные выводились из эксперимента, производилась визуальная и морфологическая оценка трансплантата.

Результаты. Суммарно оценивая результаты имплантации хондроцитов на различных носителях в сальник, при гистологическом исследовании, во всех группах животных было выявлено наличие воспалительной инфильтрации с продуктами биодеградации подложки-носителя без наличия хрящевой ткани. В контрольной группе животных и у одного животного при имплантации на «Биоматрикс» выявлено сохранение аллогенных хондроцитов. Необходимо отметить, что при имплантации на «Биоматрикс» отмечалась выраженная воспалительная инфильтрация и наличие некробиотических масс вокруг трансплантата. Можно предположить, что наличие некробиотических масс в виде волокон является продуктом резорбции «биоматрикса». Кроме того, очаги гранулематозного воспаления имелись и в контрольной группе животных, связанных скорей всего с наличием шовного материала.

Выводы. Проведенные морфологические исследования показали, что наличие любой, даже незначительной воспалительной реакции организма на подложку-носитель является губительной для хондроцитов, препятствует формированию многослойной структуры-хряща и приводит к его лизису. Представленные результаты исследования позволили сформулировать основные свойства, которым должен отвечать носитель.

Свойства, которым должен отвечать носитель.

1. Не должен оказывать токсического, аллергического, воспалительного, канцерогенного действия.

2. Носитель должен иметь структуру благоприятную для адгезии стволовых клеток, но препятствовать прорастанию сосудов внутрь, по возможности иметь трехмерную структуру (необязательно).

3. Носитель должен обладать достаточной прочностью — каркас трахеи.

4. Длительный срок биодеградации — не менее 6-х месяцев.

5. При биодеградации не должен фрагментироваться.

Разработка и исследование спектра наноструктурированных материалов и тканеинженерных конструкций с аутологичными мультипотентными мезенхимальными стромальными клетками на их основе для замещения костных дефектов

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ БИОСОВМЕСТИМОСТИ И БИОРЕЗОРБЦИИ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БИОЛАКТИДОВ ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ

*Решетов И.В. *, Филошин М.М. *, Ратушный М.В. *, Васильев В.А. *,
Сухарев С.С. *, Попов В.К. **, Кротова Л.И. ***

** Федеральное агентство по здравоохранению и социальному развитию
ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена» ,*

*** Учреждение Российской Академии Наук Институт проблем лазерных
и информационных технологий РАН, г. Троицк, Московской области*

Разработка и создание новых материалов для замены поврежденных или отсутствующих фрагментов скелета, а также направленной регенерации биотканей в онкологии, ортопедии и черепно-челюстно-лицевой хирургии являются сегодня чрезвычайно актуальным направлением развития биомедицинского материаловедения. В этой связи особый интерес представляют собой полимерные композиты, а также новые методы их функционализации с целью производства матриц для тканевой инженерии и индивидуальных имплантатов. Комбинация современных биотехнологий и физико-химических методов позволяют получать биоресорбируемые минерал-полимерные матрицы на основе микро- или нанодисперсного гидроксиапатита (ГАП или нано-ГАП соответственно) содержащие мультипотентные стромальные клетки (МСК) и необходимые морфогенетические протеины, инициирующие и контролирующие процесс формирования требуемого типа ткани.

Предложенный и успешно развиваемый нами подход к получению новых биоактивных полимерных композитов основан на применении сверхкритического диоксида углерода (sc-CO_2). Этот подход позволяет: 1). удалять токсичные примеси из биоматериалов, полимеров и различных микро- и нанопористых структур с существенно более высокой эффективностью, чем при использовании обычных жидких растворителей; 2). реализовывать набухание (или вспенивание) полимерных материалов существенно облегчающее процесс формирования матриц, однородно наполненных биоактивными компонентами при температурах близких к комнатной (для CO_2 $T_{\text{кр}}=31^\circ\text{C}$); 3). синтезировать и модифицировать полимерные композиты с заданной пористостью для тканеинженерных конструкций без применения токсичных органических растворителей.

В рамках выполненной работы проведено исследование процессов межмолекулярного взаимодействия различных полимерных систем с sc-CO_2 , приводящие к направленным трансформациям их микро- и макроструктуры, а также изменениям их механических свойств. На основе полученных результатов методом сверхкритической флюидной пластификации поли(D,L)-лактида марки Medisorb IV Low (молекулярная масса $M_w = 80\div 100$ kDa, производство Alkermes, MA, USA), с его последующим вспениванием и экстракцией следов токсичных технологических примесей, были изготовлены пористые (до 85%) биорезорбируемые минерал-полимерные матрицы трех типов заданной формы и размера, не содержащих следов каких бы то ни было органических растворителей. Выбор этого полимера (широко используемого сегодня как в биомедицинских исследованиях, так и в клинической практике) был обусловлен его высокими физико-механическими характеристиками, а также подходящим для целей замещения костных дефектов временем биорезорбции в организме человека (6-9 месяцев). Полученные матрицы представляли собой диски диаметром 5 мм и толщиной 2 мм следующего состава: 1). чистый (контрольные образцы); 2). поли(D,L)-лактид/ГАП в соотношении 70/30 вес.% и 3) поли(D,L)-лактид/нано-ГАП в соотношении 95/5 вес.%.

Эксперимент выполнялся на крысах-самках линии Вистар весом 180-200 г (питомник ГУ «Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Столбовая, Московская область). Животные на протяжении эксперимента находились на стандартном пищевом и питьевом рационах. Для исследования биосовместимости предоставленных образцов в экспериментах *in vivo* использовали модель подкожной трансплантации. Для этого крысам-самкам линии Вистар (20 голов) под наркозом смесью 1:1 0,5% раствора реланиума и 0,5% раствора кетамина, производили кожный надрез в области грудного отдела позвоночника (паравертбрально). Тупым концом скальпеля кожу осторожно отделяли от прилегающего слоя подкожной клетчатки и крысы в образованный «карман» трансплантировали предварительно отмытый и простерилизованный образец керамики. На область раны накладывали 2 операционных шва, после чего животных остав-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

ляли под наблюдением. Крыс забивали под эфирным наркозом через 4, 6, неделю. Макроскопически в указанные сроки явных признаков остатков имплантированного материала не определялось, в зоне вмешательства определялся сформированный рубец. Исследуемый материал извлекали, осуществляли их фиксацию в 10% растворе формалина. Перед заливкой материала в парафин проводили предварительную декальцинацию керамики (7,5% раствор HNO_3 , 1,5 часа). Окраску препаратов осуществляли гематоксилин-эозином.

Установлено, что на изученных сроках наблюдения исследованные биокерамические материалы не вызывали реакции воспаления, макро- и микропризнаков отторжения, что свидетельствует об их биосовместимости. Так, при микроскопическом исследовании препаратов, полученных от животных с подкожной трансплантацией образцов, уже через 4 недели после операции в зоне имплантации выявлялась тонкая соединительнотканная капсула, обнаружены разрастания фиброзно-грануляционной соединительной ткани, в промежутках между которыми определялась зрелая соединительная ткань. Через 6 недель после трансплантации данных биокерамических образцов морфологическая картина практически не менялась. Можно лишь отметить нарастание соединительнотканной капсулы вокруг остатков имплантированного материала.

РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ И ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ С АУТОЛОГИЧНЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ КЛЕТКАМИ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ

*Свиридова И.К.¹, Сергеева Н.С.¹, Баринов С.М.², Кирсанова В.А.¹, Ахмедова С.А.¹,
Комлев В.С.², Фадеева И.В.², Смирнов В.В.², Шанский Я.Д.², Мыслевцев И.В.¹*

¹ – ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»;
prognoz.06@mail.ru

² – Учреждение Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН

Для замещения дефектов костной ткани при реконструктивно-пластических операциях в травматологии, ортопедии, челюстно-лицевой хирургии, онкологии традиционно используют: а) аутоимплантаты («золотой стандарт»), что сопряжено с дополнительным оперативным вмешательством и невозможно при крупных дефектах; б) донорский деминерализованный костный матрикс, что не исключает, во-первых, переноса реципиенту невыявленных инфекционных агентов, а, во-вторых, отторжения; в) различные металлические имплантаты (например, сплавы на основе титана), которые ограниченно биосовместимы и не консолидируются с костной тканью реципиента; г) пористые биокерамические материалы на основе гидроксиапатита (ГА), близкие по составу к минеральной составляющей костной ткани, имеющие, однако, низкие показатели трещиностойкости и скорости биорезорбции.

Таким образом, разработка биоматериалов, лишенных этих недостатков, остается актуальной и своевременной задачей. Эти обстоятельства индуцируют материаловедов к созданию нового поколения остеопластических материалов для заполнения

костных дефектов и стимуляции остеогенеза в дефекте. В идеале такие материалы должны быть биосовместимы (т.е. не отторгаться и не угнетать морфологических потенциалов окружающих тканей), поддерживать дифференцировку собственных стромальных стволовых клеток надкостницы или ауто/аллогенных клеточных культур (т.е. быть матриксами для них), иметь открытую пористость и взаимосвязанность пор для обеспечения биологических потоков, заселения клетками и неоваскулогенеза. Более того, желательна биоактивность таких материалов, что подразумевает использование их химических компонентов в образовании костной ткани *de novo*. и, наконец, скорость резорбции таких материалов должна быть (в идеале) сравнима со скоростью формирования в месте дефекта новой костной ткани.

Традиционно, внимание материаловедов в этом аспекте обращено на кальций-фосфатную биокерамику, которая содержит основные компоненты минеральной составляющей костной ткани. В ИМЕТ РАН разработан целый спектр импортзамещающих аналогов и оригинальных материалов на основе фосфатов кальция с разным соотношением Са/Р, структурой кристаллической решетки, в том числе двухкомпонентные материалы в системе ГА-ТКФ (бифазная керамика) и различные материалы на основе ГА с катионными и анионными изоморфными замещениями, существенно влияющими на свойства керамики. Варьируя технологию формирования керамических материалов на основе фосфатов кальция, их химическую и кристаллическую структуру, мы пытаемся создать материал, максимальным образом отвечающий вышеперечисленным условиям. Параллельно в ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий» разработана схема скрининга и медико-биологических доклинических испытаний новых биоматериалов, включающая исследование их цитотоксичности, матриксных (для адгезивных культур) свойств, т.е. способности поддерживать пролиферацию/дифференцировку клеток, оценку биосовместимости и остеозамещающих потенциалов на модели костных дефектов у мелких и крупных лабораторных животных.

В настоящее время получены положительные заключения ФГУ «ВНИИИМТ», закончены доклинические и клинические испытания ряда кальцийфосфатных нанокристаллических пористых материалов, изготовленных по керамической технологии и подготовлен комплект документов для МЗ РФ. С другой стороны, в последнее десятилетие внимание исследователей в аспекте остеозамещения все чаще привлекают материалы природного происхождения, в частности, скелет натуральных кораллов (НК). Уникальные свойства этого материала во многом определяются химическим составом (на 98% скелет кораллов представлен кальцитом – CaCO_3 , кристаллическая решетка – арагонит), а также микропогографией и рельефом поверхности: высокой степенью пористости (до 50%), большим размером пор (2-20 мкм), их взаимосвязанностью и структурной регулярностью.

Данные экспериментов по исследованию возможности замещения ограниченного (краевая резекция большой берцовой кости крыс) и критического (сегментарная резекция бедренной кости барана) костных дефектов у лабораторных животных имплантатами на основе НК сем. *Asporogidae* свидетельствуют о выраженных остеопаративных потенциалах данного биоматериала. Существенным, с нашей точки зрения, является факт обнаружения согласованной скорости биорезорбции вещества коралла со скоростью неостеогенеза в случае использования цельного НК имплантата.

Вся совокупность данных по исследованию НК позволила сформулировать ряд дополнительных требований к биоматериалам для замещения костных дефектов. В частности, материалы, предназначенные для замещения костных дефектов, должны иметь кристаллическую решетку типа «арагонит», крупные (1,0-1,5 мкм) поры, пористость – не менее 50%, развитую (с зерном в наноразмере) поверхность, продольную прочность – не менее 20 МПа. Необходимость иметь в составе таких материалов фосфор подвергается сомнению. Исследования в этом направлении привели на данном этапе к разработке спектра «искусственных кораллов» и композитов, ко-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

торые по ряду свойств оказались ближе к натуральным кораллам, чем традиционно используемые в клинике материалы.

Кроме того, недавно в процессе клинических испытаний одного из новых биоматериалов было сформулировано дополнительное требование: если материал используется для заполнения дефекта в измельченном виде (гранулы, крошка и т.д.), то целесообразно вводить его в составе со связующим компонентом (пористые хитозан, полилактид, полилактогликолид) для снижения вероятности микротравм окружающих дефект тканей и предотвращения его выхода из области дефекта в послеоперационном периоде.

В качестве наиболее перспективных подобных материалов в данной работе рассматриваются высокопористые гибридные биокompозиты на основе биополимеров хитозана и желатины, армированные нанокристаллическими порошками и гранулами ГА и карбонат-замещенной его формы (КГА). Введение в состав композитов биополимеров придает им эластичность, а армирование фосфатами кальция – необходимые механические свойства. В экспериментах *in vitro* и *in vivo* показано, что данные композиты не токсичны, поддерживают клеточную экспансию, биосовместимы с организмом и обладают остеозамещающими потенциальными.

Логическим направлением совершенствования технологий замещения костных дефектов (в т.ч. больше критических) является создание тканеинженерных конструкций (ТИК) на основе «подходящих» материалов и мультипотентных мезенхимальных стромальных клеток (ММСК). В идеале такие функционально-ориентированные материалы и ТИК (с аутологичными ММСК) на их основе должны обеспечивать не только поддержание и выполнение объема костного дефекта, но и органотипическое восстановление костной ткани. По результатам доклинических медико-биологических испытаний нами был отобран спектр наилучших материалов, созданы ТИК с аутологичными ММСК на их основе. Осуществлен анализ различий в механизмах остеогенеза при замещении костных дефектов у лабораторных животных искусственными и натуральными материалами самостоятельно и в составе ТИК с аутологичными ММСК. Было установлено, что при заполнении костных дефектов, в том числе превышающих критические, у мелких и крупных лабораторных животных искусственными керамическими (КГА), биокompозиционными высокопористыми матриксами (хитозан, армированный гранулами КГА) или натуральными (скелет кораллов сем. Асгорога), гранулированными или монолитными имплантатами происходит активация периостального остеогенеза, что приводит к постепенному замещению дефекта костной тканью. При использовании ТИК на основе указанных материалов и аутологичных ММСК (в этих же условиях) скорость замещения дефекта костной тканью существенно возрастает за счет того, что к периостальному остеогенезу добавляется энхондральный – по всему объему дефекта. Таким образом, использование ТИК на основе подходящих синтетических и натуральных материалов и аутологичных ММСК позволяет достичь восстановления структурной и функциональной целостности костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства г. Москвы, государственные контракты № 8/3-407н-08, № 8/3-42н-10, № 8/3-43н-10.

DEVELOPMENT AND INVESTIGATION OF SPECTRUM OF NANOSTRUCTURED MATERIALS AND TISSUE-ENGINEERING CONSTRUCTIONS WITH AUTOLOGICAL MULTIPOTENTIAL MESENCHYMAL STROMAL CELLS ON THEIR BASE FOR BONE DEFECTS REPLACEMENT

I.K. Sviridova, N.S. Sergeeva, S.M. Barinov, V.A. Kirsanova, S.A. Akhmedova, V.S. Komlev, I.V. Fadeeva, V.V. Smirnov, Ya.D. Shansky, I.V. Myslevtsev

БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

In this report results of preclinical investigations of modern nanocrystalline synthetic and natural biomaterials spectrum are discussed: hydroxyapatite (HA)-based calcium phosphate ceramic, β -tricalcium phosphate (β -TCP), biphasic compounds of HA/ β -TCP system with several phases ratios, anion-, cation-replaced forms of HA (carbonated hydroxyapatite – CHA, magnesium-replaced hydroxyapatite – MgHA), composite materials on the base of highporous chitosan, armored by particles of HA and CHA and Acroporidae natural coral (NC). In vitro the materials' toxicity and matrix properties of surface (ability of materials to support the adhesion of cells to their surface and prolonged proliferation) and in vivo – the biocompatibility and osteoreplacing potencies were investigated, as in implants as a in tissue-engineering constructions (TEC) with characterized cultures of multipotential mesenchymal stromal cells of experimental animals (Wistar rats, sheep). It was shown, that studied materials are non-toxic, biocompatible, bioactive, and bioresorbable, have a surface topography and microrelief, that maintain cells adhesion and proliferation. According to bioresorption rate the following line may be presented: NC → CHA → Chitosan/CHA → β -TCP → HA. It is significantly, that only NC was resorbed in a coordinated fashion to de novo bone formation. In experiments for bone defects (acentric rats tibia resection, segmental sheep femur resection) replacement by these materials it was shown that all synthetic ceramic, composite and natural materials have osteoinductive potencies, provide bone defect closing by means of periosteal osteogenesis mechanism. In case of materials as a part of TECs the enchondral osteogenesis is initiated additionally to periosteal. Perspectives of new biomaterials creation are discussing.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ СЛОЖНОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (МАГНЕТИТА) ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

*Акопджанов А.Г., Науменко В.Ю.,
Сергеев А.И., Шимановский Н.Л.*

Российский государственный медицинский университет им. Н.И. Пирогова

Наночастицы магнитных материалов, а также системы в которых магнитные наночастицы распределены в немагнитной среде представляют огромный интерес для современной медицины и фармакологии при разработке методов лечения и диагностики различных заболеваний, в том числе онкологических. Данные методики, основаны на использование специфических свойств материалов в наноразмерном состоянии, которые в свою очередь объясняется соизмеримостью геометрических параметров материала с основным корреляционным размером выбранного эффекта и возрастающей ролью поверхностных атомов и взаимодействий. Например, соизмеримость размера наночастицы и магнитного домена магнетита приводит к появлению явления суперпарамагнетизма.[1]

Магнетит Fe_3O_4 ($\text{FeO} \cdot \text{Fe}_2\text{O}_3$) относится к классу веществ называемых ферритами, ионы кислорода которого образуют кубическую гранецентрированную решетку, где на один двухвалентный ион приходится два трехвалентных иона железа. В результате образуются две магнитных подрешетки — одна из которых состоит из половины трехвалентных ионов железа, а вторую составляют вторая половина трехвалентных и двухвалентные. Магнитные моменты подрешеток направлены антипараллельно, поэтому магнитные моменты трехвалентных ионов компенсируются, а моменты двухвалентных образуют спонтанную намагниченность. Материалы с некомпенсированным антиферромагнетизмом относят к классу ферримагнетиков. Магнитный домен магнетита обычно составляет 8 элементарных молекул, суммарный магнитный момент которого близок к суммарному моменту отдельных ионов. Магнетит характеризуется достаточно высокой температурой Кюри - 850 К и в результате изменения кристаллической структуры испытывает переход Вервея (переход металл-изолятор) при температуре 123 К.

Проведенные исследования показали, что у наночастиц магнетита происходит существенное изменение магнитных свойств с уменьшением размера частиц. Водные растворы магнетита со средним размером 20-50 нм обладают ферримагнитными свойствами, а при размерах соизмеримых с размером магнитного домена — 5-12 нм суперпарамагнитными. Суперпарамагнетизм — квазипарамагнитное поведение веществ во внешнем магнитном поле, состоящих из очень малых ферро- или ферримагнитных частиц, слабо взаимодействующих друг с другом, и ведущих себя во внешнем магнитном поле как отдельные атомы. Гистерезис в таких структурах отсутствует. Внешнее поле ориентирует магнитные моменты частиц по полю без изменения направления самих частиц, в то время как у парамагнитных газов магнитные моменты переориентируются вместе с их носителями — молекулами.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Ферримагнитные наночастицы магнетита возможно использовать для адресной доставки лекарственных средств, путем локализации с помощью внешнего магнитного поля, а также для магнитной гипертермии. Суперпарамагнитные наночастицы магнетита могут стать оптимальной субстанцией магнитно-резонансного контрастного средства, позволяющего визуализировать очаги опухолевых заболеваний по обоим релаксационным параметрам, в отличие от традиционно применяемых гадолиний содержащих препаратов. Преимуществом контрастных средств на основе оксида железа является их химическая безопасность, соединения гадолиния разлагаются в почках и могут провоцировать системный фиброз.

Исследуемые водные растворы наночастиц магнетита, различных размеров были получены химическим способом. Механизм получения сложного оксида железа хорошо изучен и описан в научной литературе, однако стандартное его применение для решаемых задач, так как используемые поверхностно-активные вещества, как правило состоящие из полярных органических молекул с длинной СН цепочкой, небезопасны для биологической ткани. В данной работе в качестве ПАВа останавливающего рост зародышей, использовали лимонную кислоту (2-гидрокси-1,2,3-пропантрикарбоновая кислота), которая не обладает оптимальными поверхностно активными свойствами, но приемлема с биологической точки зрения. В качестве стабилизатора структуры коллоидного раствора применялся цитрат натрия, использование которого позволит применять коллоидный раствор для контрастирования малых сосудов в области сердца. Конечное значение pH контрастной жидкости должно соответствовать pH крови. Выбор режимов получения коллоидного раствора - концентрации начальных компонентов, температура среды и скорость реакции, практически полностью определяет его конечные физико-химические свойства и фармакологические свойства. Контроль и варьирование режимов химического синтеза позволяет фракции наночастиц магнетита с различными средними размерами. Преимуществом химического метода получения наноматериалов, по сравнению с другими методами получения – технологичность[2].

Ферримагнитные свойства, полученных наночастиц магнетита, определялись с помощью метода Электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Магнитно-резонансные контрастные свойства анализировались путем замера времен спин-решеточной (T1) и спин-спиновой (T2) релаксации протонов на ЯМР-релаксметре РС-120 фирмы «Брукер». Дисперсный состав наночастиц в полученных растворах изучался при помощи просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения JEOL JEM-1011, а для расчета распределения наночастиц по размеру использовали программу Scan Soft 2000. Возможную токсичность наночастиц оксида железа определяли с помощью культуры клеток HeLa (эпителиоидный рак шейки матки человека) предоставленной Институтом Вирусологии им. Мечникова, при времени инкубации 24 часа и с помощью МТТ – теста Жизнеспособность клеток определялась по сравнению с контрольной пробой без добавления наночастиц.

В ходе исследований были получены два водных раствора сложного магнетита, с узким распределением по размерам и средними диаметрами 8,2 и 21,2 нм (Рис.1).

С помощью метода ЭПР были изучены магнитные свойства обоих растворов наночастиц, со средними диаметрами 8,2 нм и 21,2 нм (Рис.2). В случае сверхмалых наночастиц (кривая 1) спектр первой производной кривой поглощения имеет большую интенсивность, и соответственно большую площадь под кривой, чем раствор характеризующейся средним диаметром 21,2 нм. Снижение интенсивности свидетельствует о уменьшении парамагнитных свойств с ростом размера наночастиц и, соответственно, переходом их в ферримагнитное состояние.

Парамагнитные (контрастные) сверхмалых наночастиц оксида железа мы сравнили с железосодержащим контрастным средством Резовистом. Анализ времен релаксаций (таб.1) веществ показал, что раствор соизмерим по свойствам с существую-

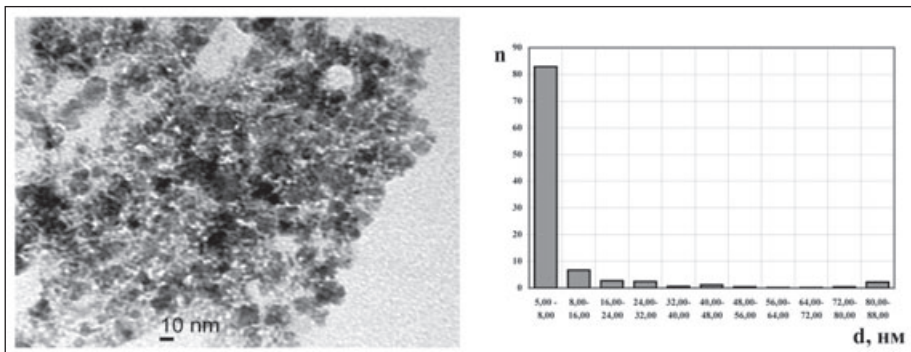


Рис.1. Микрофотография коллоидного раствора, содержащего наночастицы оксида железа среднего диаметром 8,2 нм и гистограмма распределения наночастиц по размеру

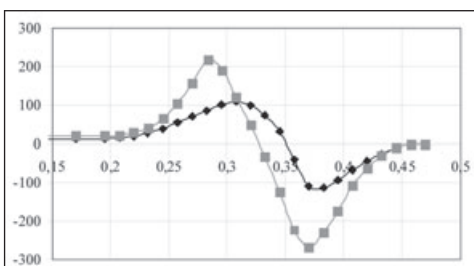


Рис.2. ЭПР спектры растворов наночастицы оксиды железа, средний диаметр которых: 1 - 8,2 нм; 2 - 21,2 нм.

щим аналогом при визуализации по T_2 и превосходит при T_1 . Времена релаксации дистиллированной воды, до введения контрастного вещества оказались равными $T_1=(2710\pm 135)$ мсек и $T_2=(2200\pm 110)$ мсек. Полученные значения для времен релаксации T_1 после добавления Феротраста практически в полтора раза меньше аналогичной величины для растворов с Резовистом. При малых концентрациях действующего вещества, значения величин T_1 и T_2 сравниваемых препаратов близки, однако разница между величинами превышает трехкратный промежуток стандартного отклонения для полученной выборки, что позволяет сопоставлять их при столь малых значениях исследуемого параметра.

Оба вещества уменьшали времена релаксации T_1 и T_2 , но в случае T_1 эффект раствора был статистически значимо выше, что очень важно, так как T_1 -взвешенные изображения имеют большую диагностическую значимость.

Токсичность наночастиц оксида железа определяли на культуре клеток HeLa, при времени инкубации 24 часа и с помощью МТТ-теста по методике утвержденной

Таблица 1 ВЛИЯНИЕ ИССЛЕДУЕМОГО РАСТВОРА И ПРЕПАРАТА «РЕЗОВИСТ» НА ВРЕМЕНА РЕЛАКСАЦИИ ПРОТОНОВ ВОДЫ (РН 7,3, Т 23°С)				
Концентрация железа, г/л	T_1 , мсек		T_2 , мсек	
	Феротраст	Резовист	Феротраст	Резовист
5,0	$5,0 \pm 0,2^*$	$8,7 \pm 0,3$	$0,55 \pm 0,1^*$	$0,31 \pm 0,1$
0,50	$34 \pm 3,0^*$	$43,0 \pm 3,0$	$6,2 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,4$
0,25	$54,0 \pm 4,0^*$	$68,0 \pm 6,0$	$12,8 \pm 0,5^*$	$10,1 \pm 0,4$

* - статистически значимые отличия раствора от Резовиста при $P \leq 0,05$

для доклинических испытаний лекарственных препаратов. Исследование показали, что раствор наночастиц с оптимальными магнитными свойствами, обладает достаточно высокой токсичностью. Дополнительными исследованиями было установлено, что явление вызвано малым размером частиц, а

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

не остатками продуктов химической реакции.

Снижение токсичности достигалось увеличением оболочки наночастиц магнетита из цитрата натрия. Получена зависимость жизнеспособности культуры клеток от концентрации цитрата (таб.2). При увеличении концентраций ПАВов была снижена токсичность раствора при незначительной ухудшение магнитных свойств и была выбрана оптимальная – 59 г/л.

По результатам исследований, был сделан вывод о возможности использования суперпарамагнитных наночастиц магнетита, как основы магнито-резонансного контрастного средства, а ферритмагнитных для обеспечения доставки лекарственных средств, путем магнитной локализации и магнитной гипертермии.

Таблица 2

ЗАВИСИМОСТЬ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КУЛЬТУРЫ КЛЕТОК ОТ КОНЦЕНТРАЦИИ ЦИТРАТА НАТРИЯ ПРИ ВРЕМЕНИ ИНКУБАЦИИ 24 ЧАСА			
Концентрация цитрата натрия	0,5 г/л	0,1 г/л	0,05 г/л
0 г/л	52,01±16,14%	86,50±19,53%	87,20±11,28%
11 г/л	58,51±20,86%	68,55±25,51%	94,41±14,89%
44 г/л	66,57±29,99%	102,89±12,98%	83,11±22,22%
59 г/л	85,08±13,87%	98,94±16,64%	98,23±19,72%
82 г/л	90,17±15,79%	110,95±8,46%	97,24 ±4,36%

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шимановский Н.Л., Науменко В.Ю., Акопджанов А.Г., Панов В.О Семейкин А.В., Сергеев А.И Применение суперпарамагнитных наночастиц сложного оксида железа для МРТ контроля биологических сред. Нанотехника, 2009, №4 (20).
2. F. C. Meldrum, N. A. Kotov, J. H. Feodler. Preparation of Particulate Mono- and Multilayers from Surfactant-Stabilized, Nanosized Magnetite Crystallites. American Chemical Society – 1994. – V.98. – P. 4506-4510

ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ С ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОЛЕКАРСТВАМИ И УГЛЕВОДНЫМ ЛИГАНДОМ СЕЛЕКТИНОВ

Водовозова Е.Л.¹, Кузнецова Н.Р.¹, Моисеева Е.В.¹, Бовин Н.В.¹, Сингин А.С.², Гранфис К.³

¹ *Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва; elvod@ibch.ru*

² *НИИ канцерогенеза ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,*

³ *Центр исследования биоматериалов, Университет г. Льеж, Бельгия*

Накопление наноразмерных систем доставки лекарств в опухолях и очагах воспаления осуществляется благодаря дефектной архитектуре формирующейся de novo сосудистой системы и повышенной проницаемости ее эндотелия (эффект enhanced permeability and retention) [1]. Оптимальный размер носителей, обеспечивающий пассивный транспорт лекарств, попадает в интервал 50–50 нм. Липосомы – самоорганизующиеся везикулы, построенные из фосфолипидных мембран, – наряду с липидными наносферами относятся к наиболее био- и гемосовместимым носителям и пригодны для системного введения в организм. Липосомы более 30 лет назад привлекли внимание в качестве систем доставки лекарств. Исследования получили новый импульс после разработки технологии получения Stealth®-липосом [2], поверхность которых защищена от опсонизации и преждевременного вывода из кровотока

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

клетками РЭС благодаря экранированию привитыми остатками полиэтиленгликоля (ПЭГ). Препараты на основе Stealth-липосом применяются в клинике уже более 10 лет, в том числе, липосомы с доксорубицином (Doxil, Caelix и др. производства США, стран ЕС) – для лечения саркомы Капоши и рака яичников [3]. Однако создание подобных конструкций для широкого спектра препаратов оказалось невозможным, так как метод активной загрузки, применяемый при их производстве, пригоден лишь для ограниченного числа лекарств, имеющих природу слабых амфифильных кислот или оснований (антибиотики антрациклинового ряда типа доксорубицина). Альтернативный способ – формирование липосом в водно-солевом растворе лекарства с последующим отделением от невключившегося агента – нетехнологичен.

Мы предлагаем включать лекарства в бислою липосом в виде липидных производных – липофильных пролекарств, которые расщепляются внутриклеточными ферментами с высвобождением исходного препарата. Такой подход упрощает технологию получения лекарственных липосом и улучшает фармакологические свойства системы доставки в целом, благодаря уменьшению потерь лекарства в кровотоке и при взаимодействии с клеткой. Кроме того, липидные производные способны к прямому трансмембранному переносу, что кардинально меняет механизм эндоцитоза и внутриклеточного трафика препарата и облегчает разгрузку липосом. Низкая эффективность внутриклеточной разгрузки, обусловленная жесткостью липидного бислоя (температура его фазового перехода превышает 60°C) и затрудненным слиянием с клеточными мембранами – один из существенных недостатков Stealth-липосом.

Нами разработаны синтезы липидных производных мелфалана (и его рацемата сарколизина) и метотрексата [4,5]. Мелфалан – алкилирующий агент, действующий независимо от стадии клеточного цикла, – применяется в химиотерапии почти 50 лет. Метотрексат, антиметаболит фолиевой кислоты, также давно используется для лечения онкологических и аутоиммунных заболеваний. Связь между лекарством и остальной частью молекулы пролекарства должна легко гидролизываться внутри клетки. Поскольку эстеразы обладают меньшей специфичностью, чем амидазы, и широко представлены во всех органах и тканях, предпочтительна сложноэфирная связь, а не амидная. При разработке молекулярных структур липидных конъюгатов MTX-DG и Miph-DG учитывалось также их соответствие упаковке липидного бислоя липосом (Рис. 1).

Липосомы с пролекарствами формируются стандартным методом экструзии. Смесь всех компонентов (яичный фосфатидилхолин, фосфатидилинозит из пекарских дрожжей и пролекарства) продавливается через поликарбонатные мембранные фильтры (поры 100 нм) на установке Lipex (Канада) или с помощью экструдера Avanti (США), в зависимости от количества требуемых препаратов. Для стабилизации липосом в кровотоке в их состав вводится фосфатидилинозит, вместо ПЭГ-липида. Известно, что нежелательные побочные эффекты при повторном применении Stealth-липосом обусловлены именно полиэтиленгликолем [7].

Микрофотографии дисперсий липосом, полученные методом замораживания-скальвания (Рис. 2), показывают, что липосомы, содержащие 10 мол. % пролекарств, представляют собой моноламеллярные везикулы диаметром до 100 нм [6].

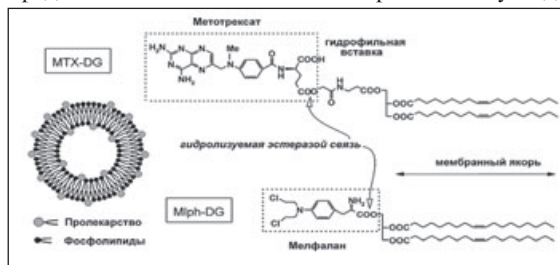


Рис.1. Структуры липофильных пролекарств и конструкция лекарственной липосомы.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

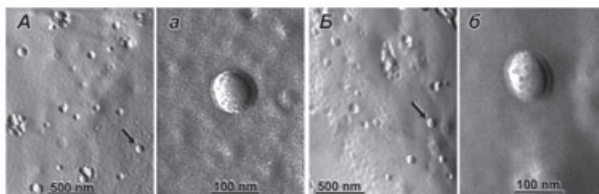


Рис.2. Электронные микрофотографии реплик с поверхностей скола замороженных дисперсий липосом, нагруженных липофильными пролекарствами: А, а – МТХ-DG; Б, б – Мlph-DG.

Физико-химическая стабильность липосом изучена с помощью динамического лазерного светорассеяния, электронной микроскопии и гель-хроматографии в сочетании со спектрофотометрическим анализом на хромофоры лекарств и липидный фосфор. Пролекарства полностью встраиваются в мембрану липосом (10 мол. %) и образуют стабильные дисперсии, достаточно концентрированные для системного введения животным. Дисперсии можно хранить до 2-3 недель при +4°C. Или заморозить (-196°C), хранить при -20°C, а перед применением разморозить и обработать на УЗ-бане. В результате агрегаты липосом диспергируются с восстановлением наноразмерных липосом исходного состава: липофильные пролекарства не выделяются из мембраны липосом в отдельные частицы. Глубокое замораживание без криопротекторов может быть способом длительного хранения препаратов липосом с липофильными пролекарствами [6].

Другой вопрос, какова стабильность сложноэфирных связей пролекарств после внутривенного введения дисперсий липосом? На примере конъюгата метотрексата показано, что пролекарства в липосомах устойчивы к преждевременному гидролизу эстеразами плазмы крови человека (при инкубации *in vitro* до 24 ч). Очевидно, липосомы защищают пролекарства от действия внеклеточных ферментов [8].

Известно, что эффективность применения метотрексата ограничивается быстрым развитием устойчивости (до 30% случаев при лечении лейкемии), связанной, в первую очередь, с мутациями в системе белков, транспортирующих фолаты и их аналоги через клеточную мембрану. Нами показано на примере культур клеток лейкемии человека, обладающих различной чувствительностью к метотрексату, что липофильная модификация позволяет преодолевать такую устойчивость [8].

Проведены эксперименты по изучению сравнительной фармакокинетики МТХ-DG в липосомах и метотрексата при внутривенном введении в эквивалентной дозе мышам СВАхС57Bl/6(F1). Хроматографический метод анализа фармакокинетики метотрексата применяется в клинике РОНЦ РАМН. Методика проведения подобного анализа МТХ-DG до конца не разработана и должна быть оптимизирована. Тем не менее, первые результаты показывают перспективность липосомального препарата. Период полувыведения МТХ-DG, соответствующий быстрой фазе распределения по органам и тканям, в 9 раз выше, чем интактного метотрексата (3.6 против 0.4 мин). Период полувыведения из плазмы (t_{β}) МТХ-DG почти в 3.5 раза выше t_{β} исходного лекарства (40 против 12 мин). Образование метотрексата из МТХ-DG происходит еще более замедленно (t_{β} 196 мин). Величина экспозиционной дозы в сыворотке крови по метотрексату повышается более, чем в 2 раза. Очевидно, препарат липосом обладает более высоким терапевтическим потенциалом при таких системных гематологических заболеваниях, как злокачественные лейкозы и лимфомы.

Эффективность липосом с пролекарством сарколизина показана *in vivo*: увеличение продолжительности жизни (УПЖ) мышей с перевитым лейкозом Р-388 возросло в 1.5 раза, по сравнению с лечением сарколизиним [9]; при лечении мышей BLRB с перевитым раком молочных желез этот показатель увеличился в 2 раза [10].

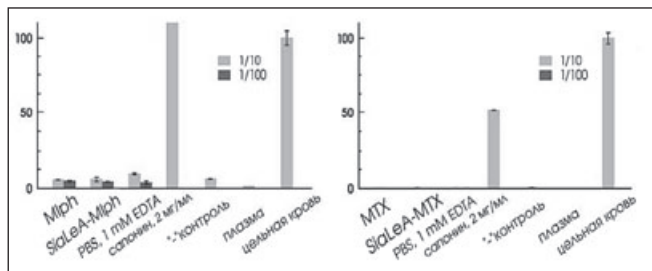


Рис.3. Концентрации гемоглобина в плазме в % к общему содержанию в крови.

Оснащение липосом молекулярными адресами позволяет достичь активного транспорта в опухоли. Однако гетерогенность опухоли, формирование различных клонов злокачественных клеток препятствуют успешному нацеливанию носителей [11]. Одно из решений – доставка липосом к клеткам микроокружения опухоли, в том числе, эндотелиальным. Мы используем в качестве адреса тетрасахарид SiaLe^X/A – лиганд селективных, белков клеточной адгезии. Они экспрессируются на активированных клетках эндотелия, лейкоцитах и тромбоцитах. Селектины опосредуют первичные взаимодействия между лейкоцитами и клетками эндотелия и вовлечены во множество (пато)физиологических процессов, в том числе, развитие воспалительного ответа, метастазирования и пр. [12]. На модели мышей BLRB с перивитым раком молочных желез нами показано, что противоопухолевая активность липосом с пролекарством сарколизина резко увеличивается при включении в препарат SiaLe^X: по сравнению с самим сарколизином лечение адресными липосомами дало УПЖ в 4 раза [10]. Недавно нами проведено кратковременное лечение остроуго Т-лимфолейкоза мышей ASF-LL метотрексатом и препаратами липосом с MTX-DG. По сравнению с контролем (n=6), лечение мышей MTX (n=5) показало УПЖ на 23%, липосомами с MTX-DG (n=6) – на 29%, а при оснащении SiaLe^X (n=6) – на 43% (все различия достоверны).

Поскольку липосомы предназначены для введения в кровоток, обязательными являются тесты на гемосовместимость. Наши данные свидетельствуют об относительной толерантности липосом (в том числе, адресных) по отношению к компонентам крови человека, в отличие от многих наночастиц на основе полимеров. Так, концентрация гемоглобина в плазме во всех образцах липосом находится на фоновом уровне, то есть гемолиза эритроцитов не происходит (Рис.3).

Степень активации системы комплемента контролировали по концентрации высвобождаемого фрагмента С3а. Липосомы с Miph-DG практически не показали активации, в отличие от липосом с MTX-DG. Однако при уменьшении размеров MTX-липосом до 85 нм уровень активации резко уменьшился. Следовательно, для иммунореактивности размеры наночастиц могут иметь решающее значение.

Заключение. Результаты исследований физико-химической стабильности, стабильности пролекарств в плазме, противоопухолевой активности и гемосовместимости показывают, что липосомы с липофильными пролекарствами – перспективные препараты для наномедицины. Оснащение липосом углеводным лигандом селективных приводит к усилению терапевтического эффекта. Необходимы исследования фармакокинетики и биораспределения лекарственных липосом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yuan F., Dellian M., Fukumura D.F. et al. Cancer Res. 1995;55:3752-6.
2. Lasic D.D., Papahadjopoulos D. Science 1995;267:1275-6.
3. Gabizon A., Schmeeda H., Barenholz Y. Clin. Pharmacokinet. 2003;42:419-36.
4. Водовозова Е.Л., Никольский П.Ю., Михалев И.И. и др. Биоорг. химия 1996;22:548-56.
5. Водовозова Е.Л., Гаенко Г.П., Бобрикова Е.С. и др. Хим.-Фарм. журн. 2007;41(6):10-14.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

6. Водовозова Е.Л., Кузнецова Н.Р., Кадыков В.А. и др. Рос. нанотехнологии 2008;3:162-72.
7. Alberts D.S., Muggia F.M., Carmichael J. et al. Semin. Oncol. 2004;31:53-90.
8. Kuznetsova N., Kandyba A., Vostrov I. et al. J. Drug Deliv. Sci. Technol. 2009;19:51-9.
9. Козлов А.М., Корчагина Е.Ю., Водовозова Е.Л. и др. Бюлл. эксп. биол. мед. 1997;123:439.
10. Vodovozova E.L., Moiseeva E.V., Grechko G.K. et al. Eur. J. Cancer 2000;36:942-9.
11. Schiffelers R.M., Storm G. Int. J. Pharm. 2008;364:258-64.
12. Ehrhardt C., Kneuer C., Bakowsky U. Adv. Drug Deliv. Rev. 2004;56:527-49.

ANTICANCER LIPOSOMES BEARING LIPOPHILIC PRODRUGS AND CARBOHYDRATE SELECTIN LIGAND

Vodovozova E.L.¹, Kuznetsova N.R.¹, Moiseeva E.V.¹, Bovin N.V.¹, Singin A.S.², Grandfils C.³

¹ Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, RAS, Moscow, Russia (elvod@ibch.ru)

² N.N. Blokhin Russian Cancer Research Center, Institute of Cancerogenesis, RAMS, Moscow

³ Research Center of Biomaterials (CEIB), University of Liège, Belgium

Liposomes of 100-nm diameter composed of natural phospholipids and lipid derivatives of widely used anticancers melphalan and methotrexate were prepared by standard procedure of extrusion through nuclear pore membranes. Dispersions are stable for several weeks. For long-term storage, dispersions should be frozen; after thawing, treatment on ultrasound bath restores size and composition of particles. The efficacy of liposome preparations was shown under systemic administration in mice with transplanted tumors. Data on comparative pharmacokinetics of methotrexate in plasma of healthy mice evidence the advantage of liposome formulation of lipophilic prodrug for the treatment of hematological malignant diseases. The equipment of liposomes with tetrasaccharide selectin ligand SiaLeX was shown to increase antitumor effect in the mouse models of mammary carcinoma and leukemia leucosis. In hemocompatibility tests in vitro, liposome preparations exhibited relatively good tolerance to the components of human blood.

ХИМИОТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЛИОБЛАСТОМЫ С ПОМОЩЬЮ НАНОСОМАЛЬНОЙ ФОРМЫ ДОКСОРУБИЦИНА

Гельперина С.Э.¹, Халанский А.С.², Швец В.И.³

¹ ООО «НПК «Наносистема», ² НИИ морфологии человека РАМН,

³ Московская государственная академия тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова

Мозг является одним из наименее доступных объектов для фармакотерапии из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который регулирует обмен веществ между кровью и нервной тканью (мозгом). В частности потенциал системной терапии при лечении глиобластом остается нереализованным, поскольку большинство из-за неэффективного проникновения большинства ЛВ через ГЭБ. Радикальное удаление таких опухолей невозможно, а результативность локальной химиотерапии ограничена ввиду незначительной диффузии лекарственных веществ из места введения в окружающую ткань мозга. Разработка неинвазивного метода, позволяющего доставлять в мозг различные противоопухолевые вещества, значительно расширило бы возможности химиотерапии, позволив использовать потенциально активные, но неспособные проникнуть через ГЭБ препараты.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Перспективным направлением исследований в этой области является разработка наносомальных систем доставки. Практическая значимость этого направления продемонстрирована на примере наносомальной формы доксорубина, проявившей высокую эффективность при лечении экспериментальной глиобластомы.

Концентрации доксорубина при системном введении не достигают терапевтически значимого уровня, поэтому этот антибиотик не применяется для лечения опухолей мозга. Исследование биораспределения наносомального доксорубина показало, что ПБЦА НЧ, модифицированные полисорбатом 80, проникают через ГЭБ и доставляют связанный с ними доксорубин в мозг. Концентрация наносомального доксорубина в мозге после введения его в дозе 5 мг/кг достигла 6 мкг/г ткани, что по крайней мере в 60 раз превышает концентрацию стандартной лекарственной формы [1]. При этом достигнутый уровень концентраций доксорубина в мозге в 15-25 раз превышает уровень его 50%-ной ингибирующей концентрации (IC50) в отношении клеток экспериментальных глиом крысы [2].

Соответственно, наносомальная форма проявила высокий противоопухолевый эффект в отношении глиобластомы 101/8, имплантированной интракраниально крысам. Трехкратное внутривенное введение наносомального доксорубина в дозе 1,5 мг/кг привело к статистически значимому увеличению продолжительности жизни на 85% по сравнению с нелеченым контролем. Важно, что во всех экспериментах у 20-40% животных, получавших наносомальную форму, наблюдали длительную ремиссию (Рис.1) [3]. Патоморфологическое исследование, проводившееся через 6 месяцев после начала опыта, не выявило признаков опухолевого роста в мозге

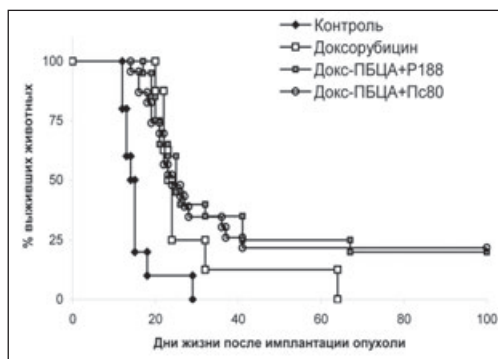


Рис.1. Выживаемость крыс с интракраниальной имплантированной глиобластомой 101/8 после внутривенного введения наносомальных форм доксорубина на основе ПБЦА НЧ, модифицированных полоксамером 188 (Докс-ПБЦА+Р188) и полисорбатом 80 (Докс-ПБЦА+Пс80). Режим лечения: 3x1,5 мг/кг в дни 2,5 и 8 (n=10-23).

этих животных. Данные иммуногистохимического исследования предполагают, что противоопухолевый эффект наносомального доксорубина в отношении глиобластомы в значительной мере обусловлен ингибированием роста сосудов в опухоли [4]. Позднее было показано, что аналогичный противоопухолевый эффект проявляется также наносомальная форма, модифицированная полоксамером 188 (Рис.1) [5].

Исследование механизма доставки доксорубина в мозг с помощью наночастиц. Результаты проведенных экспериментов показали, что: 1) внутривенное введение ПБЦА НЧ, покрытых полисорбатом 80, не приводит к повышению проницаемости ГЭБ, достаточному для проникновения через него субстратов Р-gp; 2) субстраты Р-gp проникают в мозг, только будучи связанными с НЧ, покрытыми полисорбатом 80.

Кроме того, целостность ГЭБ при контакте с НЧ была исследована в опытах *in vitro* [6]. В качестве маркеров проницаемости ГЭБ использовали [3Н]-инулин и [14С]-сахарозу. Было показано, что количество этих гидрофильных маркеров, проникающих через ГЭБ, не изменяется после инкубации клеток с НЧ, как в присутствии, так и в отсутствие полисорбата 80. Относительно воздействия на ГЭБ используемых для покрытия наночастиц ПАВ следует отметить, что в экспериментах *in vivo*

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

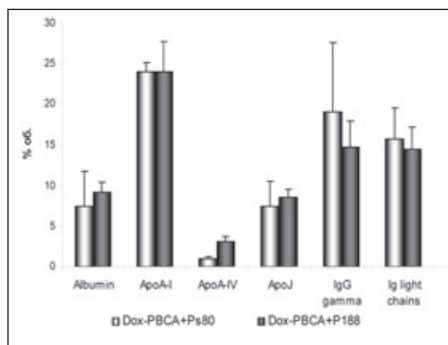


Рис.2. Сходство состава белков плазмы крысы, адсорбированных на поверхности ПБЦА наночастиц, нагруженных доксорубицином и модифицированных полисорбатом 80 (Dox-PBCA+Ps80) и поллоксамером 188 (Dox-PBCA+P188).

вещества, введенные в виде раствора в ПАВ, не проникали в мозг и не оказывали центрального эффекта (за исключением некоторого противоопухолевого эффекта Докс+Пс, объясняемого частичным нарушением ГЭБ в результате роста опухоли). Таким образом, механизм доставки НЧ и/или связанных с ними веществ в мозг, видимо, не связан с нарушением барьерной функции ГЭБ.

Доставка доксорубина в мозг также не является результатом повышения градиента концентраций кровь – мозг, поскольку модификация ПБЦА НЧ полисорбатом привела лишь к незначительному повышению концентрации доксорубина в плазме: показатель AUC для плазмы возрос лишь на 70% по сравнению с немодифицированными частицами. В то же время показатель AUC для мозга почти в 10 раз превышал соответствующий показатель для плазмы [1].

Наиболее вероятным является рецептор-опосредованный транспорт доксорубина в мозг. Исследование состава белков плазмы (метод 2-D PAGE), адсорбирующихся на поверхности ПБЦА НЧ, нагруженных доксорубицином и модифицированных полисорбатом или поллоксамером 188, показало, что, несмотря на различное химическое строение поллоксамера 188 и полисорбата 80, состав белков на поверхности частиц, покрытые этими ПАВ, обнаруживал как количественное, так и качественное сходство; при этом на поверхности обоих типов НЧ оказалось значительное количество аполипопротеина ApoA-I (24 % от общего количества) (Рис.2) [4]. Сопоставление этих результатов с данными о сходстве противоопухолевого эффекта Докс-ПБЦА+Пс и Докс-ПБЦА+F68 в отношении интракраниальной опухоли, подразумевающими если не проникновение этих частиц в мозг, то их взаимодействие с ГЭБ, позволяет предположить, что аполипопротеин ApoA-I играет важную роль в этом взаимодействии. Так возможно, что доставка веществ в мозг осуществляется путем взаимодействия ApoA-I, адсорбированного на поверхности НЧ, со сквенджер-рецептором VI (SR-VI), экспрессированным на поверхности эндотелиальных клеток, формирующих ГЭБ.

Исследование токсичности. Как известно, доксорубин проявляет кардиотоксичность, выраженность которой зависит от его пиковой концентрации в тканях сердца. Изучение биораспределения наносомального доксорубина показало, что ПБЦА наночастицы обеспечивают повышение концентрации антибиотика в плазме крови, в то время как в сердце он практически не поступает [1]. Соответственно, снижается и кардиотоксичность наносомальной формы [7]. Наночастицы позволяют также значительно снизить тестикулярную токсичность доксорубина. Таким образом, в случае доксорубина применение наносомальной формы позволяет существенно повысить безопасность препарата.

Вывод. Применение наночастиц открывает новые возможности для неинвазивного лечения опухолей мозга.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gulyaev A.E., Gelperina S.E., Skidan I.N., Antropov A.S., Kivman G.Ya., Kreuter J. Significant transport of doxorubicin into the brain with Ps 80-coated nanoparticles. //Pharm. Res. – 1999. – V.16. – P.1564–1569.
2. de Juan BS, Von Briesen H, Gelperina SE, Kreuter J. Cytotoxicity of doxorubicin bound to poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in rat glioma cell lines using different assays. J Drug Target. 2006;14(9): 614-622.
3. Steiniger S., Kreuter J., Khalansky A., Skidan I., Bobruskin A., Smirnova Z., Severin S., Uhl R., Kock M., Geiger K., Gelperina S. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles.//Int. J. Cancer. – 2004. – V.109.- P.159-167.
4. Petri B., Bootz A., Khalansky A., Hekmatara T., Müller R., Uhl R., Kreuter J., Gelperina S. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles: revisiting the role of surfactants. //J. Control. Release. – 2007. – V.117, No1. – P.51-58.
5. Hekmatara T, Bernreuther C., Khalansky A., Theisen A., Weissenberger J., Matschke J., Gelperina S., Kreuter J., Glatzel M. Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects. // Clin. Neuropathol. – 2009. – V.28. – P.153-164.
6. Kreuter J., Ränge P., Petrov V., Hamm S., Gelperina S., Engelhardt B., Alyautdin R., von Briesen H., Begley D.J. Direct evidence that polysorbate-80-coated poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles deliver drugs to the CNS via specific mechanisms requiring prior binding of drug to the nanoparticles. //Pharm. Res. – 2003. – V.20, No3. – P.409-416.
7. Pereverzeva E., Treschalin I., Bodyagin D., Maksimenko O., Langer K., Dreis S., Asmussen B., Kreuter J., Gelperina S. Influence of the formulation on the tolerance profile of nanoparticle-bound doxorubicin in healthy rats: focus on cardio- and testicular toxicity. //Int. J. Pharm. – 2007. – V.337, No1-2. – P.346-356.

CHEMOTHERAPY OF EXPERIMENTAL GLIOBLASTOMA USING NANOPARTICLE-BOUND DOXORUBICIN

Gelperina S.¹, Khalansky A.², Shvets V.I.³

¹ Nanosystem Ltd.,

² Institute of Human Morphology RAMS,

³ Moscow Lomonosov Academy of Fine Chemical Technology

The blood-brain barrier (BBB) prevents the delivery of most drugs to the central nervous system. A promising possibility to overcome this problem is a delivery by the surface-modified nanoparticles. Thus poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles loaded with doxorubicin and overcoated with polysorbate 80 or poloxamer 188 enabled a long term survival for 6 months of up to 40 % of rats after intravenous injection in the extremely aggressive glioblastoma 101/8 model transplanted intracranially, whereas the untreated animals died between 10 – 20 days. The mechanism for the nanoparticle-mediated transport of the drugs across the BBB appears to be endocytosis by the endothelial cells lining the brain blood capillaries and, possibly, transcytosis. Importantly, binding to nanoparticles also considerably attenuated doxorubicin toxicity.

ВЛИЯНИЕ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ НА АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ЛАФЕРОН-ФАРМБИОТЕК™

**Жолобак Н.М., Кривохатская Л.Д., Щербаков А.Б.,
Олевинская З.М., Богорад-Кобельская Е.С., Спивак Н.Я., Иванов В.К.,
Полежаева О.С., Баранчиков А.Е., Шапорев А.С., Третьяков Ю.Д.**

Институт микробиологии и вирусологии им. Д.К.Заболотного НАН Украины,
n.zholobak@gmail.com

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

*Институт общей и неорганической химии РАН им. А. С. Курнакова,
Московский Государственный университет им. М. Ю. Ломоносова*

Показано, что совместное использование нанокристаллического диоксида церия (НДЦ) и человеческого рекомбинантного альфа-2-ИФН сопровождается увеличением интенсивности наблюдаемого противовирусного эффекта препарата. Механизм обнаруженного эффекта может быть связан как с собственно антиоксидантной активностью наночастиц CeO_2 , так и с их способностью повышать эффективность доставки белковых препаратов в клетку. Полученные результаты позволяют говорить о перспективности применения НДЦ в условиях опухолевого процесса вирусной этиологии, а также открывают перспективу совместного использования композитов НДЦ и белковых противоопухолевых препаратов.

Проблема терапии опухолевых заболеваний была и остается чрезвычайно важной. На данный момент в медицине насчитывается множество препаратов, действующих на разные стадии опухолевого процесса. Однако практически все их эффекты находятся на грани токсического побочного действия. В 70-х годах после открытия явления интерференции большие надежды возлагались на противоопухолевые свойства препаратов интерферона (ИФН). Принимая во внимание вирусную природу некоторых видов рака, интерес к использованию препаратов ИФН в онкологии значительно возрос после того, как была показана их высокая проивовирусная активность. Но и здесь пришлось столкнуться с рядом проблем: прежде всего – возникновение реакций аутоповреждения белковых препаратов, что связано с задачей обеспечения стабильности самого препарата, предотвращения формирования аутоиммунного, аллергического и анафилактического ответа на фоне обеспечения продолжительного лечебного эффекта при введении в организм [1].

Проблема низкой эффективности введенного в организм ИФН связана с его активной деструкцией протеазами и с окислительным разрушением. В связи с этим использование препаратов, обладающих антиокислительными и/или стабилизирующими свойствами, может увеличить эффективность применения ИФН, или обеспечить тот же эффект при использовании значительно меньших доз (за счет синергидного действия). Среди таких веществ особый интерес представляет нанокристаллический диоксид церия (НДЦ). Его свойства, а также перспективы биомедицинского применения подробно изложены нами в обзоре [2]. Нашими исследованиями показано, что НДЦ обладает рядом интересных свойств, позволяющих обеспечить защиту от окислительного стресса – в частности, проявляя антиоксидантную [7] и противорадикальную активность [3]. В условиях УФ-облучения показан радиопротекторный эффект НДЦ как в профилактической, так и лечебной схеме применения [4].

В связи с этим нами было исследовано влияние НДЦ на активность препарата ЛАФЕРОН-ФармБиотек™ (далее – лаферон) в микротесте угнетения развития цитопатического действия вирусов (на примере вируса везикулярного стоматита, ВВС) в культуре клеток L929. Синтезировали два вида зольей НДЦ, отличающиеся размером и способом стабилизации частиц в растворе. НДЦ размером 5-6 нм без стабилизатора (золь «А») получали по методике, описанной в [8], НДЦ размером 2-5 нм, стабилизированные цитратом (золь «Б») получали по методике, описанной в [9]. Золь «А» характеризуется положительным дзета-потенциалом и наличием свободной поверхности частиц (отсутствие органических стабилизаторов). Как показано в работе [5], такие параметры наночастиц CeO_2 благоприятны для специфической адсорбции на макромолекулах протеинов. Для золя «Б» характерен отрицательный дзета-потенциал, а присутствующий на поверхности частиц стабилизатор (цитрат) затрудняет непосредственный контакт наночастиц с белковыми молекулами. Очевидно, что при смешении золя «Б» НДЦ и лаферона каждый из компонентов системы действовал как индивидуальное вещество – тогда, как в случае золя «А» образовывался комплекс.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Исследование противовирусной активности лаферона и НДЦ проводили, используя классическую модель: перевиваемая культура клеток фибробластов мыши L929 – ВВС (штамм Индиана). К сформированному монослою клеток вносили различные разведения лаферона и НДЦ (отдельно и совместно с лафероном). Через 24 часа клетки отмывали от среды и инфицировали 100 ТЦД50 ВВС. Учет развития характерного цитопатического действия вируса проводили через 24 часа при условии 100% жизнеспособности интактных клеток и полной деструкции монослоя клеток в контроле вируса. Результаты защитного действия исследуемых образцов представлены на рисунке 1.

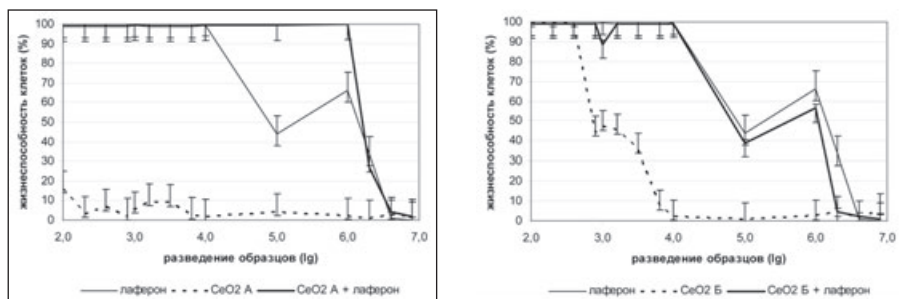


Рис.1. Противовирусное действие лаферона, зольей НДЦ («А» и «Б») и их композиции по отношению к ВВС в культуре клеток L929.

Оказалось, что свойства НДЦ принципиально влияют на противовирусную устойчивость клеток. Если золь «А» не формировал состояния противовирусной устойчивости в культуре клеток мышинных фибробластов, то для золь «Б» определен значительный диапазон (1,0-0,1 мМ), где наблюдается 100-50% защита монослоя обработанных клеток от цитопатического действия ВВС. Выявленный факт очень интересен с точки зрения возможного противоопухолевого действия собственно НДЦ на моделях вирус-индуцированного опухолевого процесса. Механизм наблюдаемого эффекта формирования противовирусной резистентности подлежит дальнейшему исследованию. Возможно, указанный эффект в клетках, предварительно обработанных НДЦ, связан с его антиоксидантными свойствами. Известно, что именно клеточные пероксисомы (наряду с митохондриями) являются одним из важнейших звеньев развития каскада антивирусных реакций врожденного иммунитета [6]. Наличие на поверхности частиц цитратной оболочки облегчает транспортировку НДЦ в клетку – тогда как золь «А» практически не проявлял самостоятельной противовирусной активности.

Изучение эффективности формирования состояния противовирусной резистентности в клетках, предварительно обработанных различными разведениями лаферона, показало наличие значительного концентрационного диапазона, обеспечивающего 100% защиту клеток от ЦПД ВВС (100-1000 кратное разведение), так и 50% защитный эффект (100000-1000000 кратное разведение). Титр лаферона (значение, обратное максимальному разведению препарата, обеспечивающее 100% противовирусный защитный эффект) в наших экспериментах составил 4 lg. Совместное использование лаферона и НДЦ по эффективности различалось в зависимости от свойств наночастиц. Если золь «Б» никак не влиял на противовирусное действие лаферона, то использование золь «А» сопровождалось увеличением эффективного противовирусного концентрационного диапазона. Титр лаферона в композиции с зольем «А» составил 6,2 lg – совместное использование лаферона и зольей НДЦ «А» позволяет наблюдать эффект 100% задержки развития ЦПД ВВС в концентрациях интерферона на 2 порядка меньших, чем в случае одного лаферона. Указанные эксперименты были повторены с месячным интервалом. Хранение растворов веществ в

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

условиях холодильника при 4°C не сопровождалось каким-либо изменением/уменьшением активности ИФН, дополненного НДЦ.

Таким образом, совместное использование НДЦ и человеческого рекомбинантного альфа2-ИФН сопровождается увеличением интенсивности наблюдаемого противовирусного эффекта препарата. Механизм обнаруженного эффекта может быть связан как с собственно антиоксидантной активностью наночастицы CeO_2 , так и с их способностью повышать эффективность доставки белковых препаратов в клетку.

Полученные результаты позволяют говорить о перспективности применения НДЦ в условиях опухолевого процесса вирусной этиологии, а также открывают перспективу совместного использования композитов НДЦ и белковых противоопухолевых препаратов. Результатом такого применения будет повышение эффективности и уменьшение (в связи с возможностью снижения эффективной противоопухолевой дозы) побочных токсических эффектов при использовании препаратов ИФН по прямым показаниям для лечения злокачественных опухолей: меланомы кожи и глаза; рака почки, мочевого пузыря, яичника, молочной железы; саркомы Капоши, миеломной болезни.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вопросы стабильности белковых препаратов: молекулярные аутоповреждения и их функциональные следствия Шевель М.В., Верева С.В./ В кн.: Молекулярная патология белка Под ред. Д.И.Заболотного. К.: Логос. 2008. – С.32-41.
2. Структурно-чувствительные свойства и биомедицинские применения нанодисперсного диоксида церия Иванов В.К., Щербаков А.Б., Усатенко А.В. // Успіхи хімії 78 (9), 2009, С. 924-941.
3. Инактивирование нитроксильного радикала наночастицами диоксида церия Иванов В.К., Щербаков А.Б., Рябокони І.Г., Усатенко А.В., Жолобак Н.М., Третьяков Ю.Д. // ДАН, Т.430, №5, 2010. – С.639-642.
4. UV-shielding property, photocatalytic activity and phototoxicity of ceria colloid solutions Zhlobak N.M., Ivanov V.K., Shcherbakov A.B., Shaporev A.S., Polezhaeva O.S., Baranchikov A.Ye., Spivak N.Ya., Tretyakov Yu.D. // J of Photochemistry and Photobiology B: Biology 2010 V.101 in press.
5. Protein adsorption and cellular uptake of cerium oxide nanoparticles as a function of zeta potential S. Patila, A. Sandberg, E. Heckert, W. Self S. Seal Biomaterials. 2007 November ; 28(31): 4600-4607.
6. Peroxisomes are signaling platforms for antiviral innate immunity E. Dixit, S. Boulant, Y. Zhang, A.S.Y. Lee, C. Odendall, B. Shum, N. Hacohen, Z.J. Chen, S.P. Whelan, M.Fransen, M.L. Nibert, G.Supert-Furga J.C. Kagan Cell V.141, Issue 4, pp. 668-681.
7. Антиоксидантная активность нанокристаллического диоксида церия по отношению к антоцианам. Иванов В.К., Усатенко А.В., Щербаков А.Б. // Журн. неорган. химии. 2009. Т. 54. №10. С. 1596-1601.
8. Гидротермально микроволновой синтез стабильных зольей нанокристаллического диоксида церия для биомедицинских применений. В. К. Иванов, О. С. Полежаева, А. Б. Щербаков, Д. О. Пиль, Ю. Д. Третьяков // Журнал неорганической химии, том 55, № 1, Январь 2010, С. 3-8.
9. Синтез и исследование термической устойчивости зольей нанокристаллического диоксида церия, стабилизированных лимонной и полиакриловой кислотами В. К. Иванов, О. С. Полежаева, А. С. Шапоров, А. Е. Баранчиков, А. Б. Щербаков, А. В. Усатенко // Журнал неорганической химии, том 55, № 3, Март 2010, С. 368-373.

THE INFLUENCE OF NANOCERIA DIOXIDE COLLOID SOLUTION ON THE ACTIVITY OF VIFERON

Zholobak N.M., Krivokhatska L.D., Shcherbakov A.B., Olevinska Z.M., Bogorad-Kobelska A.S., Spivak N.Ya., Ivanov V.K. Shaporev A.S., Polezhaeva O.S., Baranchikov A.Ye., Tretyakov Yu.D.

*Zabolotny Institute of Microbiology and Virology, National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv
n.zholobak@gmail.com,*

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

*Kurnakov Institute of General and Inorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
Moscow State University. M. Lomonosov*

It is shown that the joint usage of ceria colloid solutions and human α -2-interferon is accompanied by the increase of intensity of the observed antivirus effect of the drug. The mechanism of the detected effect can be connected both with the proper antioxidant activity of nanoparticles of CeO_2 and with their ability to increase the efficiency of delivery of protein drugs to the cell. The received results let us speak about the availability of the usage of CeO_2 by the neoplasm process of virus aetiology and also give possibility of the joint usage of CeO_2 and protein anticancer drugs.

ПРОИЗВОДНЫЕ ФУЛЛЕРЕНОВ КАК БИОЛОГИЧЕСКИ АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ И СРЕДСТВА ДИАГНОСТИКИ

*Котельников А.И., Котельникова Р.А., Богданов Г.Н., Мищенко Д.В., Горячев Н.С.,
Баринов А.В., Рыбкин А.Ю., Смолина А.В., Полетаева Д.А., *Романова В.С.*

*Институт проблем химической физики РАН, 142432, Черноголовка,
kotel@icp.ac.ru*

** Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва*

Актуальной проблемой развития современных нанотехнологий является создание новых материалов для медицины, основанных на создании гибридных наноструктур. Значительное место среди современных наноматериалов занимают наноуглеродные структуры, в том числе фуллерены. Активно развиваются работы по созданию водорастворимых производных фуллеренов, которые обладают высокой биосовместимостью и проявляют широкий спектр биологической активности: антиоксидантной, противовирусной, в том числе против ВИЧ и цитомегаловирусной инфекции, кардиопротекторным и нейротропным действием. Отличительной особенностью фуллеренов и большинства производных на их основе является способность накапливаться в организме, особенно в печени, что обуславливает их замедленное токсическое действие на организм. Авторами разработана уникальная методика синтеза водорастворимых гибридных биологически активных структур на основе фуллеренов и эндометаллофуллеренов путем селективного присоединения к фуллереновому ядру двух аддендов. Одним из аддендов является аминокислота или пептид, обуславливающие водорастворимость производных фуллерена, а вторым — биологически активные группировки, обладающие антиоксидантным, фотосенсибилизирующим действием, которые создают возможность донировать оксид азота или ингибировать ключевые ферменты. Период полувыведения данных соединений из организма составляет 72 часа, они обладают низкой токсичностью. Разработаны методики ковалентного присоединения фуллеренов к белкам и полинуклеотидам, что важно для исследования иммунологических свойств гибридных структур и их фотодинамического действия. В стадии оформления находится международный патент WO 2009/002203 A1.

Для придания фотосенсибилизирующих свойств к аминокислотным производным фуллерена присоединены различные люминесцентные красители, что позволяет использовать их в исследовании фармакокинетики гибридных структур, а также в фотодинамической терапии опухолей. Определена стабильность данных структур в экспериментальных условиях.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Исследованы антиоксидантные свойства производных фуллеренов и их действие на ряд ключевых ферментативных систем.

Развиты методы синтеза водорастворимых эндометаллофуллеренов, что позволяет проводить исследования нового класса биологически активных соединений, перспективных для применения в качестве контрастирующих веществ для ЯМР-томографии, рентгензахватной и нейтронзахватной диагностики и терапии.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ

*Краснопольский Ю.М. *, Степанов А.Е. **, Швец В.И. ***

** НТУ «Харьковский политехнический институт», кафедра биотехнологии и аналитической химии, г. Харьков, Украина;*

volchik@mail.ru

*** ГОУ ВПО «Московская государственная академия тонкой химической технологии имени М.В.Ломоносова» (МИТХТ),*

aestepanov@yandex.ru

В докладе обсуждаются принципы создания и особенности технологических условий производства наноразмерных противоопухолевых липосомальных препаратов, позволяющих повысить эффективность лечения онкологических больных и снизить токсическое действие цитостатиков. Для получения наноразмерных форм препаратов использованы природные фосфолипиды, противоопухолевые лекарственные субстанции и криопротекторы. Рассмотрены вопросы контроля качества липосомальных противоопухолевых препаратов с использованием физико-химических, фармакологических и микробиологических методов. Показана перспективность применения липосомальных форм противоопухолевых препаратов в онкологии.

Создание искусственных мембран - липосом (ЛС) является одним из перспективных направлений современной нанобиотехнологии. Сегодня уже ни у кого не вызывает сомнений перспективность использования ЛС-форм лекарственных препаратов в клинике. Проведенные нами клинические исследования ЛС-препаратов на основе гидрофобных и гидрофильных субстанций продемонстрировали их высокую фармакологическую активность в пульмонологии, онкологии, кардиологии, нефрологии, офтальмологии. Причем, применение ЛС-форм цитостатиков (антрациклиновые антибиотики, препараты платины, доцетаксел) является перспективным направлением для преодоления лекарственной устойчивости к химиопрепаратам, а также снижения токсического действия свободных форм противоопухолевых препаратов на органы и ткани. На основании обобщения результатов многолетних исследований и последующих технологических разработок нами предложена и реализована в производственных условиях технология получения ЛС препаратов. В соответствии с данной схемой технология производства ЛС включает следующие основные критические стадии: 1. Получение субстанции липидов (Л); 2. Получение раствора активной фармацевтической субстанции (АФС) в водном или органическом растворителе; 3. Получение пленки Л и её гидратация; 4. Образование ЛС и включение в них лекарственного средства; 5. Отделение, при необходимости, не включенной АФС; 6. Осветляющая, стерилизующая фильтрация и розлив препарата 8. Лиофилизация и герметизация препарата; 9. Контроль готового препарата, изучение стабильности и режима хранения ЛС.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Липидные субстанции. На первом этапе необходимо провести изучение используемых Л субстанций и органических растворителей, применяемых в технологии получения ЛС препаратов. Растворители, используемые в ходе производственного процесса должны контролироваться на наличие примесей, в том числе, и токсических. Данные, полученные нами показывают, что содержание остаточных растворителей, используемых при производстве Л субстанций и ЛС-форм препаратов соответствуют общепринятым нормам, а в готовом препарате после лиофилизации либо не определяются, либо их количество минимально, что отвечает требованиям международных фармакопей. Содержание эндотоксинов и тяжелых металлов в субстанциях, их контаминация микроорганизмами должны контролироваться в соответствии с требованиями, предъявляемыми к субстанциям для инъекционных препаратов. Для снижения контаминации Л субстанций возможна стерилизующая фильтрация Л в растворе органического растворителя. Особое внимание необходимо уделять процессам разложения субстанций под воздействием света, нагревания, величины рН, кислорода воздуха и ряда других факторов, влияющих на структуру Л. Также важно привести краткое описание продуктов, которые рассматриваются как потенциальные примеси, возникающие в результате выделения и очистки Л.

Получение липидной пленки и её гидратирование. Следующим этапом технологии, согласно предложенной схеме, является получение Л пленки, которое проводят при постоянном перемешивании раствора Л в органическом растворителе при температуре 37-45°C. При использовании гидрофобной субстанции её растворяют в соответствующем органическом растворителе и смешивают с раствором Л. Л пленку или пленку Л с лекарственной субстанцией гидратировали в буферном растворе для получения мультимеллярных везикул. Необходимо отметить, что температура в процессе ресуспендирования должна быть выше температуры фазового перехода Л. При получении везикул необходимо учитывать, кроме температуры, ряд факторов: величину рН и ионную силу буфера, концентрацию Л и соотношение Л:лекарственное вещество, физико-химические свойства используемых компонентов. Размер образующихся везикул определяется так же интенсивностью и временем перемешивания. Кроме этого, необходимо в каждом конкретном случае учитывать заряд Л. Для предотвращения процессов окисления Л полученную эмульсию насыщают инертным газом. Получение липосом. ЛС получали экструзией. Процесс проводят в гомогенизаторе высокого давления, в результате чего происходит разрушение крупных мицелл при пропускании Л эмульсии под высоким давлением через специальный клапан. Преимуществом этого метода является стандартность состава ЛС, высокая производительность метода, минимальное окисление фосфолипидов (ФЛ), сохранность лекарственного препарата, стабильность ЛС. Существенное значение имеет наличие стандартного промышленного оборудования для работ под высоким давлением и получение препарата в асептических условиях в закрытом режиме, при этом в ходе процесса возможен контроль значений температуры и давления. Гомогенизацию проводят при температуре выше фазового перехода используемых Л. в атмосфере защитного газа. Предложенный режим позволяет получить ЛС стандартного состава, основная масса которых представлена частицами с размером 80-160 нм (80-90% всех ЛС) до лиофилизации и (120-180 нм) после лиофилизации. Эмульсия должна подвергаться многократной циркуляции через гомогенизатор с тем, чтобы при каждом проходе получать все большее количество малоразмерных ЛС; эмульсия должна непрерывно охлаждаться для отвода тепла, выделяемого насосом при сжатии. Таким образом, критическими параметрами являются температура, давление в гомогенизаторе, количество проводимых циклов. При получении ЛС с антибиотиками антрациклинового ряда (доксорубин, идарубин, эпирубин) показано, что размер ЛС до лиофилизации составлял 120 ± 30 нм, а после лиофилизации 140 ± 40 нм. Показано, что включение в ЛС холестерина приводит к увеличению

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

размера частиц, полученных после лиофилизации, а так же снижению количества активной субстанции, включенного в ЛС. Введение в состав ЛС отрицательно заряженных ФЛ, например, дифосфатидилглицерина (ДФГ), приводило к повышению включения антрациклинов на 4-12%. Введением в состав ЛС отрицательно заряженных ФЛ фосфатидилинозита или ДФГ мы стремились к повышению специфического действия ЛС, содержащих, например, доцетаксел. Наше предположение было основано на известном факте взаимодействия ДФГ и ДНК хроматина с образованием структур, способных запускать программированную гибель клетки (апоптоз), в частности, опухолевых клеток. Количество циклов гомогенизации является критичным, поскольку в ходе работ было обнаружено, что нередко увеличение цикличности или давления приводит к нестабильности ЛС, увеличению их размеров или слиянию. Контроль процесса гомогенизации необходимо оценивать по размеру ЛС, и при остановке уменьшения размеров процесс следует прекращать. При получении ЛС препаратов нами использовалось давление $5 \cdot 10^7 - 7 \cdot 10^7$ Па. Значение величины давления должно определяться в каждом конкретном случае с учетом использования ЛС состава, химической структуры АФС лекарственного средства, величины рН, заряда и т.д. Условия гомогенизации необходимо подбирать для каждого вида ЛС, причем определяющим является величина ЛС и степень включения субстанции. На стабильность ЛС и включение вещества в их состав оказывает влияние ионная сила, величина рН, температура проведения технологического процесса. Кроме того, самостоятельное значение имеет стабильность самого лекарственного средства, включаемого в ЛС. Так, например, температура, рН и давление определяли не только степень включения доксорубицина в ЛС, но и антибактериальную активность полученного препарата. Существенным фактором является введение криопротекторов (КП) в состав препаратов. Определяющее значение при этом имеют химическая структура КП, его концентрация, форма введения и момент введения в процессе гомогенизации, т.е. при каком размере ЛС (на каком цикле) производить его введение, так как некоторые протекторы углеводной природы (например, лактоза или трегалоза) могут при введении на первом этапе привести к нежелательному изменению размера ЛС и снижать включение в них лекарственного средства. При этом особое внимание нужно уделять достижению необходимого размера ЛС и исключению их агрегации. Было обнаружено, что чем выше количество сахара используемого для защиты ЛС при лиофилизации, тем меньше размер ЛС полученных после регидратации. Однако при этом уровень включения гидрофильной АФС (например, доксорубицина) несколько меньше. При использовании гидрофобных АФС (например, доцетаксела), увеличение соотношения Л : сахара не приводит к снижению инкапсуляции вещества. Так, при изучении соотношения Л : лактоза от 1:1 до 1:4 было установлено, что минимальное увеличение размера ЛС после регидратации наступает при соотношении 1 : (3-4).

Отделение не включенной в липосомы субстанции. После формирования ЛС, содержащих лекарственный препарат, возникает необходимость разделения смеси, состоящей из «свободного» препарата и «нагруженных» ЛС. Наиболее предпочтительным является процесс ультрафильтрации или гельфильтрации для отделения не включенной АФС. С этой целью целесообразно использовать аппараты с различным порогом отсека. При этом в каждом конкретном случае необходимо определять условия ультрафильтрации, которые в значительной степени зависят от молекулярной массы вещества, его концентрации, заряда. Разработчик должен определять температурные условия ультрафильтрации, порог разделения, скорость и давление при проведении процесса.

Стерилизующая фильтрация. С целью подбора оптимального фильтрующего материала должны производиться исследования, приводящие к минимальной сорбции активной субстанции ЛС; режим и способ фильтрации должны минимально влиять на стабильность ЛС и не приводить к снижению фармакологического действия по-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

лучаемого препарата.

Наиболее часто используемый метод стерилизации - стерилизующая фильтрация через каскад фильтров с величиной пор от 1,2 до 0,22 мкм. Необходимо отметить, что фильтрация позволяет так же проводить стандартизацию препаратов ЛС. Последнюю стерилизующую фильтрацию необходимо осуществлять как можно ближе месту наполнения флаконов. Фильтр не должен оказывать влияния на стерилизуемую продукцию, например, вследствие удержания её ингредиентов или выделения в неё веществ. Преимуществом стерилизующей фильтрации является отделение гидрофобного компонента, не включенного в ЛС. Лиофилизация липосом. От обоснованного режима сублимации зависит стабильность ЛС, количество включенного в ЛС лекарственного препарата и, наконец, размер ЛС. Это требует тщательного управления процессом дегидратации, так как процесс лиофилизации включает замораживание препарата с последующим удалением воды, и возникает проблема, связанная с тем, что на стадии замораживания и обезвоживания возможно физическое повреждение структуры ЛС. Одним из наиболее важных факторов при лиофилизации является подбор КП, который не должен иметь эвтектические свойства, т.е. не должен кристаллизоваться при замерзании. Немаловажным вопросом является определение этапа для введения КП в ЛС, например, сахаров. Необходимо учитывать, что должно быть создание защитной среды как во внутренней, так и наружной поверхности мембраны ЛС. Применение КП с более высокой температурой изменения матрицы имеет преимущества, в том числе ускорение первичной сушки. Процесс сублимации ЛС сводится к двум стадиям: первоначально удаляется свободная вода до 80-85%, причем, скорость сушки постоянна и занимает 40-50% общего времени; на второй стадии удаляется до 95-98% воды, находящейся в связанном состоянии, т.е. входящей в структуру ЛС. Установлено, что ряд факторов влияет на скорость и качество процесса сублимации: концентрация Л и вспомогательных веществ, объем высушиваемого препарата и площадь поверхности испарения, наличие и свойства КП. Установлены основные факторы, приводящие к повреждению бислоя ЛС в процессе лиофилизации.

Ресуспендирование липосом. Обнаружено, что температура растворителя в определенной степени определяет размер ЛС и количество включенного в ЛС лекарственного средства. Так, например, при использовании растворителя с температурой от 37°C до 50°C для ресуспендирования свободных ЛС (препарат «Липин») или ЛС нагруженных АФС (препарат «Липофлавор») размер ЛС на 7-12% меньше, чем при использовании растворителя комнатной температуры. По нашему мнению, подбор условий ресуспендирования зависит от Л состава препарата, химической структуры КП, АФС, исходного размера ЛС и содержания компонентов. Исследования по определению условий ресуспендирования необходимо проводить для каждого конкретного препарата. Вопрос используемого растворителя (состав, рН, ионная сила) требует отдельного изучения, что связано с влиянием растворителя на размер ЛС и снижением включения лекарственной субстанции в ЛС.

Контроль препарата. При изучении качественных показателей ЛС препаратов мы исходили из определения трех групп показателей: I – показатели, характеризующие свойства индивидуальных биологически активных компонентов препарата (ФХ, доксорубин гидрохлорид, антралин, кверцетин, амфотерицин В, доцетаксел и др.) и вспомогательных веществ (лактоза, витамин Е и др.); II – показатели качества, характеризующие готовую форму препарата (стерильность, величина рН, аномальная токсичность, пирогенность (эндотоксины)); III – показатели, характеризующие свойства ЛС (включение лекарственного вещества, размер ЛС, zeta-потенциал, и др.). Испытания должны затрагивать те свойства продукта, которые подвержены изменениям при хранении и могут влиять на качество готового препарата, причем методы количественного определения должны позволять характеризовать стабиль-

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

ность. Особое внимание необходимо уделять профилю новых продуктов, образующихся при деградации (разложения) компонентов препарата. В этом случае эти новые продукты разложения необходимо квалифицировать. Так, например, должны быть идентифицированы и указаны граничные количества образующихся примесей, например, для ФХ (лизопродукты или свободные жирные кислоты) или для доксорубина (антрациклинов) (агликоны или другие продукты разложения). Испытания должны указать на те свойства, которые подвержены изменению при технологии получения препаратов или при их хранении и могут влиять на качество ЛС препаратов, их эффективность и безопасность применения. Важным вопросом является разработка метода определения количества включенного в ЛС лекарственного средства, причем такие определения должны проводиться как в процессе изготовления ЛС и их лиофилизации, так и при хранении препарата в течение срока его годности. Этот вопрос должен решаться для каждого вида ЛС непосредственно исследователем, при этом валидация является обязательным условием его использования.

Заключение. Приведенные данные доказывают перспективность получения ЛС форм лекарственных препаратов. В каждом конкретном случае необходимо решать поставленные задачи, исходя из конечной цели: подбор липидных компонентов, источник их выделения и содержание; физико-химические свойства вводимого в ЛС вещества; способ получения ЛС; состав консервантов и стабилизаторов; режимы лиофилизации и хранения и ряд других факторов, определяющих качество и биологическую активность ЛС-формы лекарственного средства. Критические стадии технологического процесса получения ЛС препаратов и аналитические методы контроля нами были валидированы.

Нами разработаны и внедрены лекарственные форм ЛС препаратов: «Липин», «Липодокс», «Липофлакон», «Лиолив», «Липоплат». Указанные препараты прошли необходимый объем доклинических и клинических исследований. На различных стадиях исследования находятся ЛС формы ряда препаратов: «Липоэф», «Липотакс», и ряд других. Срок разработки технологии, проведения обязательных исследований и регистрации препаратов такого типа составляет в среднем 5-8 лет.

Работы выполнялись при грантовой поддержке в рамках проекта № 2.1.1./2715 АВЦП Рособразования «Развитие научного потенциала высшей школы»(2009-2010 гг.), Госконтракта № 14.740.110120 по мероприятию 1.1. ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России»(2009-2013 гг.), Соглашения с Минобрнаукой РФ № 02.120.11.3468-НШ.

PERSPECTIVES IN R&D OF NANOSIZED ANTITUMOR LIPOSOMAL PREPARATIONS

Krasnopol'sky Y.M. *, Stepanov A.E. **, Shvets V.I. **

** National Technical University "Kharkov's Polytechnic Institute",
Department of Biotechnology and Analytical Chemistry. Kharkov, Ukraine;
ivolchik@mail.ru*

*** State Educational Institution for High Professional Education "M.V.Lomonosov's Moscow State Academy of Fine Chemical Technology" (MIFCT),
aestepanov@yandex.ru*

The basic principles as well as some technological features in the development of antitumour liposomal preparations are discussed. Such preparations are intended for increasing of the effectiveness of chemotherapy as well as for decreasing of the toxicity action of cytostatics. Phospholipids, active antitumour substances and cryoprotectors were used for the formation of

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

nanosized preparations. Quality control issues based on physico-chemical, pharmacological and microbiological methods are considered. Perspectives of liposomal antitumour preparations for using in the oncology are shown.

МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВОГО МОДУЛЯ БАРНАЗА-БАРСТАР

Никитин М.П.^{1,2}, Здобнова Т.А.², Лукаш С.В.², Стремовский О.А.², Деев С.М.²

¹ *Московский физико-технический институт (ГУ);*

² *Институт Биоорганической Химии им. ак. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН*

Email: max.nikitin@gmail.com

В последнее время наблюдается неуклонный рост использования нанотехнологий в биологии и медицине. Наночастицы представляют большой интерес для медицины XXI века из-за принципиально новых возможностей по сравнению с существующими лекарствами в молекулярной форме. Особый интерес вызывает применение различных наночастиц для лечения и диагностики таких заболеваний, как рак, инсульт, атеросклероз, а также инфекционных заболеваний. На данный момент существует несколько основных типов наночастиц, обладающих различными физико-химическими свойствами: полимерные, золотые и магнитные частицы (МЧ), квантовые точки, наноалмазы и некоторые другие. В то время как некоторые наночастицы уже допущены для введения человеку в диагностических целях (Feridex®), а другие проходят клинические испытания, большая часть разработанных наночастиц еще только изучается в научных лабораториях. Большинство применений *in vitro*, например иммуноанализ, требуют «узкоспециализированных частиц», оптимизированных по таким параметрам как размер, максимальный специфический и минимальный неспецифический сигналы и т.п. Применения *in vivo*, наоборот, требуют в первую очередь большей функциональности частиц, например, одновременную способность к диагностике заболевания и его терапии. Для подобных применений сейчас разрабатываются различные подходы получения многофункциональных структур, содержащих в себе различные вышеперечисленные наночастицы [1].

В работе впервые был предложен уникальный метод синтеза наноструктур, которые могут одновременно содержать наночастицы (маркерные или управляемые внешними воздействиями: магнитные, радиоактивные, золотые наночастицы, квантовые точки, наноалмазы), адресные компоненты (антитела, олигонуклеотиды) и терапевтические агенты (токсины, вирусы, бактерии и т.п.) для применения *in vivo*. Для этого на первом этапе синтезируются составные блоки из указанных элементов и одного из двух комплементарных белков - барназы или барстара. Затем производится связывание двух блоков, на одном из которых барстар, а на втором — барназа. К полученному конъюгату может быть добавлен третий блок, содержащий комплементарный белок и т.д.

В качестве демонстрации метода в работе были синтезированы трифункциональные магнитные и, одновременно, флуоресцентные наноконструкции, нацеленные миантителами на опухолевые клетки. Синтез таких комплексов осуществлялся при комнатной температуре простым смешением блоков. Методика универсальна и, в зависимости от количественного соотношения модулей, позволяет получать наноконструкции с заранее программируемым в широком диапазоне набором свойств. В отличие, от распространенных связующих систем (стрептавидин-биотин), система

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

барназа–барстар имеет ряд преимуществ: отсутствием в организмах млекопитающих, низкой иммуногенностью, совместимостью с генноинженерными методами.

Разработанный метод получения многофункциональных наноконплексов перспективен для исследований в области диагностики и терапии различных заболеваний, в т.ч. онкозаболеваний, на ранних стадиях.

ЛИТЕРАТУРА

1. M. Nikitin, T. Zdobnova, S. Lukash, O. Stremovskiy, S. Deyev, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 107, 5827-5832 (2010).

MAGNETIC MULTIFUNCTIONAL SUPERSTRUCTURES BASED ON BARNASE-BARSTAR PROTEIN PAIR

Nikitin M.P.^{1,2}, Zdobnova T.A.², Lukash S.V.², Stremovskiy O.A.², Deyev S.M.²

¹ *Moscow Institute of Physics and Technology (State University)*

² *Shemyakin-Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry of Russian Academy of Sciences*

E-mail: max.nikitin@gmail.com

A bioengineering method for self-assembly of multifunctional superstructures has been proposed and realized. The method employs two unique strongly-interacting proteins, barnase and barstar, to rapidly join the structural components together directly in water solutions. The properties of the superstructures are designed on demand by linking different agents of various sizes and chemical nature, designated for specific goals. As a proof of concept, colloiddally stable trifunctional structures have been assembled by binding together magnetic particles, quantum dots and antibodies using barnase and barstar. The assembly has demonstrated that the bonds between these proteins are strong enough to hold macroscopic (5 nm – 3 μm) particles together. Specific interaction of such superstructures with cancer cells resulted in fluorescent labeling of the cells and their responsiveness to magnetic field. A remarkable feature of the strategy is the opportunity to attach any protein in its functional form to the key components, barnase and barstar, by gene engineering methods to construct recognition, visualization or cytotoxic modules. Their assembly with nanoparticles of different biochemical and physical nature using the same approach could be an easy and convenient way to create desirable multifunctional superstructures.

НАНОСТРУКТУРНЫЕ КОМПОЗИТЫ ДЛЯ ЛАЗЕРНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ: РАЗЛИЧНЫЕ АСПЕКТЫ БЕЗОПАСНОСТИ

**Панкратов А.А., Андреева Т.Н., Якубовская Р.И., Коган Б.Я.,
Бутенин А.В., Фейзулова Р.А., Рудой В.М.**

ФГУ «МНИОИ им. П.А.Герцена Росмедтехнологий»,

ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»,

ИФХЭ им.А.Н.Фрумкина РАН

e-mail: andreimnioi@yandex.ru

Целью настоящей работы являлось разработка подходов к изучению механизма противоопухолевого действия и безопасности импульсной лазерной гипертермии (ИЛГ) с наноконпозитами в качестве сенсбилизаторов (Тс).

Метод ИЛГ основан на введении в организм животного сенсбилизатора (наноконпозитов) с последующим облучением патологического очага высоко энергетическими лазерными импульсами с длиной волны генерации в области поглощения Тс.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

В качестве Тс нами были исследованы более 15 различных наноструктур отличающихся природой, структурой, формой и размером: наночастицы на основе сульфированного углерода (C_{SO_3}), коллоидного золота (Au_k) и серебра (Ag_k), а также наночастиц на основе различных производных фталоцианина.

На экспериментальных моделях опухолевого роста *in vivo* установлено, что противоопухолевая эффективность ИЛГ с наночастицами ZnPc повышается при увеличении дозы нанокомпозитов с 3 мг/кг до 30 мг/кг, плотности энергии в импульсе с 0,15 Дж/см² до 0,60 Дж/см², суммарной плотности энергии за сеанс ИЛГ с 15 Дж/см² до 60 Дж/см² и уменьшении временного интервала между введением нанокомпозитов и импульсным облучением. В то время как ИЛГ с серебряными наночастицами также повышалась при увеличении дозы Тс и, в отличие от фталоцианиновых частиц, снижалась при уменьшении временного интервала между введением Тс и облучением.

Наиболее детально была исследована противоопухолевая эффективность ИЛГ с наночастицами на основе фталоцианина цинка (ZnPc). Показано, что эта лечебная процедура в оптимальном терапевтическом режиме приводила к длительному торможению роста саркомы S-37, карциномы толстой кишки C-26, карциномы легких Льюис, меланомы В-16 на 100-68%. У части животных (от 10% до 70%) с S-37 и C-26 отмечена полная излеченность.

Однако, в настоящее время механизм противоопухолевого действия ИЛГ с наночастицами в качестве сенсibilизаторов не известен. По нашим представлениям, в основе механизма противоопухолевого действия ИЛГ, по всей видимости, лежит разрушение сосудистой системы опухоли вследствие «микровзрывов» нанокомпозитов в сосудах патологического очага в процессе их облучения высокоэнергетическими лазерными импульсами. В связи с чем нами было изучено влияние ИЛГ с наночастицами на основе ZnPc и Ag_k на степень оксигенации опухолевой ткани в процессе этой лечебной процедуры и состояние микросудистого русла в различные сроки после лечения.

В процессе импульсного облучения патологического очага, после предварительно введенных наночастиц на основе ZnPc и Ag_k , у животных наблюдали снижение парциального давления кислорода в ткани опухоли с 40-60 до 0,5 мм.рт.ст. В случае использования нанокомпозитов на основе ZnPc уже после 50 импульсов опухоль в зоне облучения была практически деоксигенирована – парциальное давление O_2 не превысило величину в 1 мм.рт.ст. При этом восстановления или тенденции к восстановлению парциального давления кислорода, у подавляющего большинства жи-

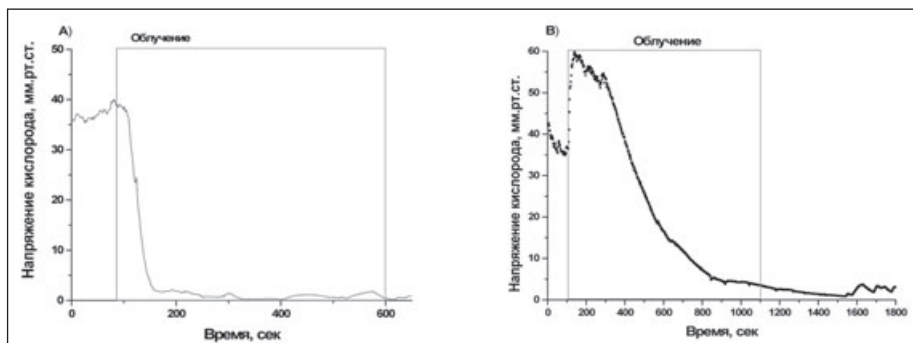


Рис. Изменение парциального давления в опухоли S-37 в процессе ИЛГ с наночастицами на основе ZnPc (А) и Ag_k (Б). Мыши-гибриды F1, самки. S-37 привита под кожу. Наночастицы PсZn вводили внутривенно в дозе, равной 3 мг/кг, а Ag_k – 15 мг/кг. Облучение проводили через 5 мин после введения наночастиц. Параметры импульсного облучения: длина волны излучения – 694 нм, плотность энергии в импульсе – 0,6 Дж/см².

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

вотных (более 60%), в облученной зоне не наблюдали (рис.А). При использовании наноструктур Ag_k снижение парциального давления кислорода в ткани опухоли в процессе процедуры ИЛГ происходило более медленно и носило обратимый характер (у 60% животных после окончания облучения наблюдали постепенное насыщение ткани опухоли кислородом; рис.Б).

Результаты этих исследований согласуются с данными по оценке влияния процедуры ИЛГ на состояние микрососудистого русла в ткани опухоли и окружающих тканях, которые были подвергнуты импульсному облучению (табл.1).

Так, в тканях (опухолевой и окружающих), полученных от животных опытной группы, сразу после воздействия (2-3 минуты) плотность микрососудов значительно снижалась (в 4-13 раз) и оставалась низкой в последующие 24 часа после лечения. На 4 сутки после лечения, плотность сосудов в образцах опытной группы в опухолевом узле и подкожной клетчатке, не менялась ($8,5 \pm 7,4$ и $8,7 \pm 5,2$ сосудов в поле зрения).

В то время как на границе мышца-опухоль отмечена тенденция к увеличению плотности микрососудов (до $18,8 \pm 15,0$ сосудов в поле зрения). При этом плотность сосудов в тканях животных опытной группы была значительно меньше, чем в образцах контрольной группы (табл.1). На 7 сутки после ИЛГ в образцах животных опытной группы наблюдается резкое увеличение плотности сосудов опухолевого узла и в ткани, окружающей опухолевое образование по сравнению с 4-ми сутками после лечения (в 4-14 раз). Плотность сосудов на данный срок исследования сравнима с таковой у животных контрольной группы (табл.). Отмечено, что интенсивная регенерация сосудистой сети в зоне воздействия, наблюдаемая в период с 4-х по 7-е сутки после лечения, коррелировала с возобновлением роста опухолевого узла.

Таким образом, можно сделать вывод, что деструкция опухоли после проведения ИЛГ с наночастицами в качестве

Таблица ПЛОТНОСТЬ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ В ТКАНИ ОПУХОЛИ И ОКРУЖАЮЩИХ ТКАНЯХ ДО И ПОСЛЕ ПРОЦЕДУРЫ ИЛГ С НАНОЧАСТИЦАМИ ZnPS У МЫШЕЙ С САРКОМОЙ S-37		
Срок исследования	Плотность сосудов (среднее количество сосудов на поле зрения)	
	Опытная группа	Контрольная группа
До начала воздействия		
<i>опухоль</i>		46,1±20,3
<i>подкожная клетчатка</i>		63,1±19,5
<i>граница мышца-опухоль</i>		50,3±16,3
Сразу после воздействия		
<i>опухоль</i>	11,1±5,4	46,1±20,3
<i>подкожная клетчатка</i>	10,8±6,8	63,1±19,5
<i>граница мышца-опухоль</i>	4,0±3,8	50,3±16,3
2 часа после воздействия		
<i>опухоль</i>	18,1±10,2	46,1±20,3
<i>подкожная клетчатка</i>	3,5±4,3	63,1±19,5
<i>граница мышца-опухоль</i>	4,2±4,0	50,3±16,3
24 часа после воздействия		
<i>опухоль</i>	5,4±5,0	46,1±20,3
<i>подкожная клетчатка</i>	2,9±2,0	63,1±19,5
<i>граница мышца-опухоль</i>	8±6,9	50,3±16,3
4 сутки после лечения		
<i>опухоль</i>	8,5±7,4	47,0±22,2
<i>подкожная клетчатка</i>	8,7±5,2	48,4±20,3
<i>граница мышца-опухоль</i>	18,8±15,0	40,5±22,8
7 сутки после лечения		
<i>опухоль</i>	116,7±42,7	245,0±72,4
<i>подкожная клетчатка</i>	53,5±31,8	60,3±24,1
<i>граница мышца-опухоль</i>	76±29,3	92±45,2

Мыши-гибриды F1, самки. S-37 привита под кожу. Наночастицы $PcZn$ вводили внутривенно в дозе, равной 3 мг/кг. Облучение проводили через 5 мин после введения наночастиц. Параметры импульсного облучения: длина волны излучения – 694 нм, плотность энергии в импульсе – 0,6 Дж/см²; суммарная плотность энергии – 30 Дж/см².

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

сенсibilизаторов наступает в результате разрушения и окклюзии микрососудов опухолевого узла и окружающих опухоль тканей, которое наблюдается уже в первые минуты лечения.

Особенностью нанокompозитов является то, что они очень медленно подвергаются метаболической трансформации и медленно или вообще не выводятся из организма. Поэтому очень важным является оценка их безопасности, включая определение органов-мишеней в которых происходит накопление наночастиц (фармакокинетические исследования), изучение общетоксических свойств и специфических видов токсичности с длительным (не менее 2,5 лет) периодом наблюдения за животными. При этом токсичность нанокompозитов будет определяться не только их дозой, но и структурой, формой, размером и используемым стабилизатором суспензии.

Наночастицы на основе $ZnPs$ и Ag_k (средний размер ~ 200 нм) быстро выводятся из кровотока (от 30 минут до 3 часов) и накапливаются преимущественно в печени и селезенке и медленно из них выводятся (более 6 месяцев).

Оценка «острой» токсичности наночастиц на основе $PcZn$ показала, что эти наноструктуры при внутривенном введении хорошо переносятся животными и их максимально-переносимая доза более чем в 35 раз выше, чем минимальная терапевтическая доза.

Нанокompозиты $ZnPs$ в 0,2% концентрации и ниже совместимы с кровью и при контакте с ее форменными элементами (эритроцитами и лейкоцитами) в течение 2-х часов не приводили к их разрушению.

При гистологическом исследовании внутренних органов, которые могут являться потенциальными мишенями для токсического действия наночастиц на основе $PcZn$ — легких, печени, почек и селезенки установлено, что однократное внутривенное введение этих нанокompозитов в широком диапазоне доз (от 7 мг/кг — ТД до 500 мг/кг — 71ТД) не приводило к выраженным патологическим изменениям (на морфологическом уровне) в этих органах в течение 12 месяцев после применения наноструктур.

Таким образом:

1. ИЛГ с наночастицами в качестве сенсibilизаторов оказывает противоопухолевое действие, приводя к длительному ингибированию роста опухолей различного гистогенеза на 100% - 68% и полной излеченности 10-70% животных;

2. В основе механизма действия метода ИЛГ лежит повреждение (разрушение и окклюзия) кровеносных сосудов патологического очага;

3. При изучении безвредности нанокompозитов показана их низкая токсичность: максимально-переносимая доза наночастиц на основе $ZnPs$ превышала минимальную терапевтическую дозу более, чем в 35 раз;

- нанокompозиты $ZnPs$ в 0,2% концентрации и ниже совместимы с кровью;

- органами-мишенями, в которых происходит накопление наночастиц на основе $ZnPs$ и Ag_k являются печень и селезенка;

- наночастицы на основе $ZnPs$ в широком диапазоне доз (от ТД до 70 ТД) не приводили к развитию дистрофических, деструктивных, очаговых склеротических изменений в паренхиматозных клетках и строме легких, печени, селезенке и почках, которые являются потенциальными мишенями к токсическому действию этих наноструктур.

NANOSTRUCTURAL COMPOSITIONS FOR LASER HYPERTHERMIA: VARIOUS ASPECTS OF THEIR SAFETY

Andrey A. Pankratov, Tatyana N. Andreeva, Raisa I. Yakubovskaya,
Alexandre V. Butenin, Raisa. K Feizulova, Vitaliy M. Rudoy

*Moscow Hertsen Institute of Oncology, State Research Centre
«Institute of Organic Intermediates and Dyes», Frumkin Institute of Physical and Electric chemistry
E-mail: andreimnoi@yandex.ru*

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

The aim: to develop the approaches to the study of antitumor efficacy and safety of impulse laser hyperthermia (ILH) with nanocompositions as thermosensitizers.

ILH is based on the injection of a nanocomposition to the animal with the further irradiation of the pathological lesion with highly energetic laser impulses with generation wavelength in the area of the thermosensitizer absorption. More than 15 nanostructures varying in origin, structure, form, and size were studied in our research, sulphonated carbon-based nanoparticles (CSO4), colloid Aurum (Auc) and Argentum (Agc)-based nanoparticles, and compositions of various phthalocyanine derivatives (Pc) among them. The treatment of mice bearing transplanted tumors of various histogenesis resulted in total cure of 10 to 70% of animals and in prolonged tumor growth inhibition. It was as much as 100-68% depending on the origin of the sensitizer.

It has been shown that the damage of blood vessels in the pathological lesion (their destruction and occlusion) plays the main role in the mechanism of action of laser hyperthermia with nanoparticles as the sensitizers.

The evaluation of safety of ZnPc and Agc-based nanocompositions revealed their low toxicity: the maximum endurable dose was higher than the minimum therapeutic dose more than 35 times. ZnPc-based nanoparticles in the wide dose range (from therapeutic dose up to 70-fold therapeutic dose) did not damage internal organs that could be nanocomposition targets: lungs, liver, spleen, and kidneys.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТА ДНК-ДОКСОРУБИЦИН У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАР-ЦИНОМОЙ

**Пятаев Н.А., Плотникова Н.А., Минаева О.В.,
Скопин П.И., Шукин С.А., Коровина Е.Ю.**

ГОУВПО «Мордовский государственный университет им. Н.П. Огарева»
Саранск, Россия
E-mail: pyataevna@mail.ru

Цель работы: изучить характер тканевого распределения доксорубина при его введении в форме конъюгата с нативной ДНК и исследовать эффективность комплекса ДНК-доксорубина у крыс с перевитой холангиоцеллюлярной карциномой РС-1. Результаты. Установлено, что введение доксорубина в форме конъюгата с нативной ДНК изменяет характер распределения препарата. Регистрируется преимущественное накопление доксорубина в тканях с высокой митотической активностью (опухолевой и лимфоидной ткани) на фоне снижения плазменной концентрации и концентрации в паренхиматозных органах. Показано, что конъюгированная с ДНК форма доксорубина обладает несколько меньшей антибластомной активностью, но в эквивалентных по противоопухолевому эффекту дозах реже вызывает миокардиострофию и энтеропатию по сравнению с изолированным препаратом.

Введение. В последние годы активно разрабатываются разнообразные транспортные системы для избирательной доставки противоопухолевых химиопрепаратов в раковые клетки. Одним из соединений, которое потенциально может исполнять роль векторной молекулы, может быть экзогенная ДНК. Главной особенностью метаболизма и кинетики этого соединения, позволяющей использовать его в качестве вектора для доставки химиопрепаратов к опухолевым клеткам, является выявленный факт избирательного накопления экзогенной ДНК в быстро пролиферирующих тканях. В исследованиях, проводимых с использованием меченого НЗ-тимидином ДНК, было установлено, что концентрация радионуклида лимфоузлах после внутрибрюшинного введения препарата была в 5-7 раз выше, чем в плазме и ткани паренхиматозных органов [4]. В литературе имеются сведения о создании конъюгатов ряда противоопухолевых химиопрепаратов, в том числе доксорубина, с ДНК in

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

vitro [1, 2, 6-8]. Однако следует отметить, что до настоящего времени не исследована терапевтическая эффективность доксорубина при введении в форме конъюгатов с ДНК, что послужило основанием для проведения настоящего исследования.

Цель работы. Изучить характер тканевого распределения доксорубина при его введении в форме конъюгата с нативной ДНК и исследовать эффективность комплекса ДНК-доксорубин у крыс с перевитой холангиоцеллюлярной карциномой РС-1.

Материалы и методы. Выполнены эксперименты на 72 лабораторных нелинейных крысах. Животным по достижении массы 80-100 г под кожу передней брюшной стенки перевивали штамм холангиоцеллюлярной карциномы РС-1. Животные были разделены на 6 групп (1 контрольную и 5 опытных), по 12 особей в каждой. В контрольной группе животные лечения не получали. В опытных группах на 7-й день после перевивки начинали лечение. В 1-й опытной вводили доксорубин («Teva», Израиль) в дозе 1 мг/кг внутривенно; во 2, 3 и 4-й опытных группах – конъюгат доксорубина с ДНК из расчета соответственно 1, 2 и 4 мг/кг конъюгированного доксорубина, в 6-й – ДНК в дозе 7,5 мг/кг (доза, соответствующая дозе ДНК во 2 - 4-й опытных группах. В качестве источника ДНК использовали препарат «Деринат» (ЗАО «Техномедсервис», Россия)). Инъекции производились 1 раз в 3 дня. На 21-е сутки после начала лечения животных забивали. Приготовление конъюгата дерината с доксорубином осуществляли по методике [3] в собственной модификации. Степень конъюгации доксорубина составляла 60-70%.

В 1-й и 2-й опытных группах исследовали характер тканевого распределения доксорубина. Определение концентрации доксорубина производили в плазме крови, опухолевой ткани, ткани печени, почек, легких, в лимфоузлах, кишечной стенке и в мышечной ткани. Для исследований использовали высокоэффективную жидкостную хроматографию (хроматограф «Милихром 5-3», Россия) [5].

Во всех группах определяли показатели, характеризующие эффективность химиотерапии: индекс массы опухоли (отношение массы опухоли к массе тела животного-го); индекс торможения роста опухоли (ИТРО), рассчитываемый по формуле: $ИТРО = (M_k - M_o) / M_k * 100$, где M_k и M_o – средняя масса опухоли соответственно в контрольной

Таблица 1

**ТКАНЕВОЕ РАСПРЕДЕЛЕНИЕ ДОКСОРУБИНА
В ИССЛЕДУЕМЫХ ГРУППАХ**

Орган (ткань)	1-я опытная	2-я опытная
	(«чистый» доксорубин)	(конъюгат доксорубин-деринат)
Плазма	0,38±0,09	0,17±0,03
Опухоль	0,29±0,04	0,96±0,14
Печень	0,84±0,13	0,37±0,06
Почка	0,65±0,08	0,27±0,03
Легкое	0,57±0,11	0,12±0,02
Лимфоузел	0,42±0,05	0,82±0,16
Селезенка	0,58±0,07	0,73±0,14
Миокард	0,59±0,08	0,19±0,03
Кишечник	0,45±0,06	0,28±0,04

Примечание: Для всех исследованных органов различия между группами достоверны (p<0,05).

Таблица 2

**ПРОТИВООПУХОЛЕВАЯ АКТИВНОСТЬ
РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ТЕРАПИИ**

Группы сравнения	Значения показателей в группах	
	ИМО	ИТРО
Контрольная	44,1±3,1 ²	-
1-я опытная	18,5±1,4 ¹	66,4±4,8
2-я опытная	32,1±2,2 ^{1,2}	30,4±1,9 ²
3-я опытная	20,2±2,7 ¹	69,2±3,4
4-я опытная	7,8±0,8 ^{1,2}	432,7±22,1 ²
5-я опытная	48,1±3,7 ²	- 5,8±0,6 ²

Примечание: 1 – достоверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного в контрольной группе; 2 - достоверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного во 2-й опытной группе.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

и опытных группах. Для оценки токсичности исследовали летальность в процессе лечения, определяли число лейкоцитов периферической крови, проводили морфологическое исследование желудка, кишечника, печени, почек, легких и миокарда.

Результаты и их обсуждение. Тканевые концентрации определяли в 1-й и во 2-й опытных группах, где вводимые дозы доксорубина были эквивалентны. Результаты определения представлены в таблице 1.

В 1-й опытной группе характер распределения препарата был относительно равномерным. В ткани опухоли концентрация препарата составляла 75 % от плазменной. Наиболее высокие концентрации регистрировались в хорошо васкуляризованных тканях – в легких, печени, почках и миокарде. Во 2-й опытной группе регистрировалось преимущественное накопление препарата в быстрорастущих и регенерирующих тканях, причем в большей степени – в лимфоидной и опухолевой ткани и в меньшей – в кишечной стенке. В опухоли концентрация превышала плазменную в 5,5 раза. При этом плазменная концентрация и концентрация доксорубина в паренхиматозных органах и миокарде была в среднем в 2-2,5 раза ниже, чем в 1-й опытной группе.

Результаты исследования антибластомной активности приведены в таблице 2.

Исследуемый штамм карциномы РС-1 проявил достаточную чувствительность к доксорубину: в 1-й опытной группе («чистый» доксорубин в дозе 1 мг/кг) индекс торможения роста опухоли составил 66,4 %. Активность конъюгированной формы препарата была несколько меньшей и возрастала с увеличением дозы. Противоопухолевый эффект, эквивалентный эффекту «чистого» препарата, достигался при использовании дозы конъюгата 2 мг/кг (3-я опытная группа). ИТРО в данной группе был равен 69,2% и достоверно не отличался от такового в 1-й опытной группе. Конъюгированный доксорубин в дозе 4 мг/кг (4-я опытная группа) имел максимально выраженный эффект (ИТРО=432%), который, однако, в 100% случаев сопровождался тяжелыми токсическими реакциями. Деринат в виде монотерапии (5-я опытная группа) не оказывал влияния на опухолевый рост.

Анализ побочных и токсических эффектов химиотерапии показал, что встречаемость и выраженность осложнений при ее проведении различалась в сравниваемых группах (табл.3).

ПОБОЧНЫЕ ЭФФЕКТЫ РАЗЛИЧНЫХ СХЕМ ТЕРАПИИ							<i>Таблица 3</i>
Группы сравнения	Значения показателей в группах						
	Летальность, абс. (%)	Лейкоциты, *10 ⁹ , М±m	Тромбоциты, *10 ⁹ , М±m	Язвенный энтероколит, абс. (%)	Миокардиодистрофия, абс. (%)	Дистрофия печени, абс. (%)	
Контрольная	0	18,9±1,6 ²	318±19 ²	0	0	0	
1-я опытная	2 (16,7) ¹	9,4±0,8 ¹	116±11 ¹	5 (41,7) ¹	4 (33,3) ¹	1 (8,3) ¹	
2-я опытная	0	15,3±1,1 ²	231±14 ^{1,2}	0	0	0	
3-я опытная	1 (8,3) ¹	11,5±0,9 ¹	152±16 ¹	2 (16,7) ^{1,2}	2 (16,7) ^{1,2}	0	
4-я опытная	7 (58,3) ¹	2,7±0,1 ^{1,2}	40,4±2,2 ^{1,2}	12 (100) ^{1,2}	12 (100) ^{1,2}	12 (100) ^{1,2}	
5-я опытная	0	17,1±1,8 ²	326±15 ²	0	0	0	

Примечание: 1 – достоверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного в контрольной группе; 2 – до-стверное (p<0,05) отличие показателя от аналогичного во 2-й опытной группе.

При введении «чистого» доксорубина у всех животных регистрировалась лейкопения ((9,4±0,8)*10⁹/л против (18,9±1,6)*10⁹/л в контроле, p<0,05), язвенные поражения кишечника встречались в 42% наблюдений, у 4 (33%) животных имелись морфологические признаки токсической миокардиодистрофии. Всего в процессе лечения пало 2 (16,7%) животных. Причиной их гибели стал язвенно-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

некротический энтероколит. Во 2-й опытной группе частота побочных эффектов химиотерапии была значительно меньшей. Летальных исходов в данной группе не регистрировалось, количество лейкоцитов в периферической крови достоверно не отличалось от такового в контроле, морфологических изменений со стороны внутренних органов не наблюдалось. В 3-й опытной группе отмечался 1 летальный исход, у выживших животных преобладали токсические эффекты со стороны кроветворной системы. Частота язвенного поражения кишечника и миокардиодистрофии составляла 16%, что почти в 2 раза меньше, чем в 1-й опытной группе. В 4-й опытной группе частота и выраженность токсических эффектов химиотерапии была наибольшей. Летальность в процессе терапии составила 58%. На секции у 4 павших животных обнаружен язвенно-некротический энтероколит, у 3-х - выраженные дистрофические изменения во всех внутренних органах (печени, почках, миокарде). У выживших отмечалась тяжелая миелосупрессия, в 100% случаев обнаруживались язвы кишечника и регистрировались морфологические проявления гепатопатии и миокардиодистрофии.

Выводы

1. У крыс с перевитой карциномой РС-1 введение доксорубина в форме конъюгата с нативной ДНК изменяет характер распределения препарата. Регистрируется преимущественное накопление доксорубина в тканях с высокой митотической активностью (опухолевой и лимфоидной ткани) на фоне снижения плазменной концентрации и концентрации в паренхиматозных органах.

2. Конъюгированная с ДНК форма доксорубина обладает меньшей антибластомной активностью по сравнению с изолированным препаратом. Эквивалентная по противоопухолевой активности доза конъюгированного доксорубина в два раза выше, чем доза «чистого» препарата.

3. Эквивалентная по противоопухолевой активности доза конъюгированного доксорубина оказывает меньшее токсическое воздействие на желудочно-кишечный тракт и миокард по сравнению с изолированным препаратом.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Вайнберг Ю.П. Физико-химические и биологические свойства комплекса ДНК с карминомицином // Медицина. — 1980. — № 9. — С.18–22.
2. Мельников Д.Ю. Применение иммуноконъюгатов в химиотерапии онкологических больных // Медицинская картотека. — 1999. — №7-8. — С.28–32.
3. Патент России № 20049721993, 1994.
4. Русинова Г.Г. Особенности усвоения экзогенной ДНК и ее низкомолекулярных предшественников в организме животных //Биохимия. — 1971. — Т.36. — №5. — С.88 — 89.
5. European pharmacopoeia 5.0. — 2005. — P.1481 — 1482.
6. Baurain R, Deprez-De Campeneere D, Zenebergh A, Trouet A. Plasma levels of doxorubicin after IV bolus injection and infusion of the doxorubicin-DNA complex in rabbits and man. Comparison with free doxorubicin // Cancer Chemother Pharmacol. — 1982. — V 9. — №2. — P.93–96.
7. Brown I, Ward HW. The comparative toxicity and therapeutic efficacy of adriamycin and the adriamycin-DNA complex in the chemotherapy of C3H mice with transplanted mammary adenocarcinoma // Cancer Lett. — 1977. — V 2. — № 4-5. — P.227–232.
8. Deprez-De Campeneere D, Baurain R, Huybrechts M, Trouet A. Comparative study in mice of the toxicity, pharmacology, and therapeutic activity of daunorubicin-DNA and doxorubicin-DNA complexes // Cancer Chemother Pharmacol. — 1999. — V 2. — №1. — P.25–30.

EFFICIENCY OF CONJUGATE DNA-DOXORUBICIN IN RATS WITH EXPERIMENTAL CARCINOMA

Pyataev N.A., Plotnikova N.A., Minaeva O.V., Skopin P.I.,
Tshchukin S.A., Korovina E.J.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

*Mordovian state university,
Saransk, Russia*

The purpose of the work is the investigation of tissue distribution of the doxorubicin-DNA conjugate and efficiency of this drug form at treatment of cholangiocellular carcinoma PC-1 in rats. Results. We have found that injection of doxorubicin in the conjugated form changes the tissue distribution of the drug. The doxorubicin is accumulated in tissues with high mitotic activity (tumor and lymphoid tissues). At same time the concentration of drug in blood and parenchymatous organs was decreased. We have shown that DNA-conjugated form of doxorubicin has smaller antineoplastic activity than pure doxorubicin. We have found that the side effects rate of the DNA-doxorubicin conjugate is much lower than for pure drug.

КЛАССИФИКАЦИЯ ЛИПОСОМ ПО СПОСОБАМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Сейфулла Р.Д.

Институт неврологии РАМН

Липосомы по своей структуре и функции подразделяются на несколько групп, которые предназначены в клинической медицине для оптимального транспорта и воздействия на клеточные мембраны в зависимости от пораженного органа, на который направленно их действие (Е.Г. Лобанова, Н.В. Чекалина, 2006; N.A. Kshirsagar, 2000; A. Kozubek et al., 2000; Mozafari M., Mortazavi M., 2005; V.R Torchilin, 2006; A. Samad et al. 2007; А.В. Дудниченко, Ю.М., Крас-нопольский В.И. Швец, 2001). Это, прежде всего, касается систем доставки лекарств при экологических, кардиологических, нервных, инфекционных, иммунодефицитных, кожных и других болезнях (Drug delivery systems), особенно в тех случаях, когда классическая медицина констатирует высокую токсичность традиционных лекарств (антиметаболитов, алкилирующих соединений, антибиотиков и других). Современная клиническая медицина практически не обращается к системам пассивной диффузии при транспорте лекарств липосомами, так как они не снабжены молекулярным компасом, указывающим направление движения в кровотоке при поиске поврежденных органов.

Разработка систем адресной доставки лекарств дала возможность не только преодолеть загруженными липосомами гистогематические барьеры и клеточные мембраны, но и сделать их невидимыми для фагоцитов (stelh liposomes). С другой стороны в последние годы новые липосомы снабжены системами поиска больших клеток организма (антителами, покрытие мембран полиэтиленгликолем (ПЭГ), магнитоуправляемостью, рН - и термочувствительностью и другими механизмами).

1. Классические липосомы для пассивного транспорта лекарственных веществ, предохраняющие, благодаря своей мембране, преждевременный их метаболизм ферментами крови, печени и других органов.

2. Термолипосомы способные при гипертермии к их концентрации в больном органе и триггерному выходу лекарств (при гипертермии в тканях пораженного органа), они состоят из липидов, фазовый переход которых при температуре выше +37° С, в тканях деградируют и освобождают лекарство, которое начинает действовать по месту доставки (Н.А. Оборотова с соавторами, 2006).

3. рН-зависимые липосомы, реагирующие на изменение рН в кислую сторону, триггером которых является кислая среда пораженных тканей при онкологических заболеваниях.

4. Американские ученые под руководством Джастина Ханеса разработали специальное покрытие для крупных наночастиц полиэтиленгликолем, вследствие чего

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ



Рис.1. Классическая незагруженная липосома.

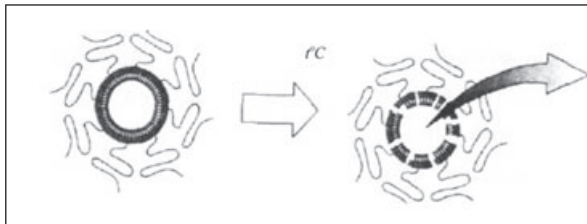


Рис.2. Освобождение лекарство (доксорубин) из внутренней полости термочувствительной или pH-зависимой липосомы.

скорость проникновения сквозь слизистые оболочки увеличивается в тысячу раз. Этот метод эффективен при производстве большинства лекарственных препаратов, но особенное значение приобретает при лечении легочных заболеваний, поскольку лёгкие обладают очень толстой слизистой оболочкой, которая затрудняет проникновение фармакологических средств.

Эти стерически стабилизированные (пегелированные) ПЭГ липосомы для доксорубина или даунорубина предохраняют от метаболической трансформации мембран липосом, а также снижают кардиотоксичность антраци-клиновых антибиотиков у человека (Gabizon A. et al., 2004; Ю.А. Горячева с соавторами, 2005, Д.А. Безруков с соавторами, 2006, Д.А. Безруков 2007 и другие). ПЭГ защищает липосомы (делает их невидимыми стеллс - липосомы) от захвата фагоцитарной системой и позволяет поддерживать высокую концентрацию Доксила и Келикса длительный период с белком причаливания.

В настоящее время в клинике используются такие липосомальные формы антрациклинов как паклитаксел, камптотецины, винкристин и другие.

7. Иммунолипосомы описаны рядом авторов (А.Ю. Барышников с соавторами, 2001; А.К. Бегдуллаев с соавторами, 2008, Цибулькина, 2008 и другими). Являются наиболее перспективными транспортёрами лекарственных веществ, которые в настоящее время используются в клинической практике.

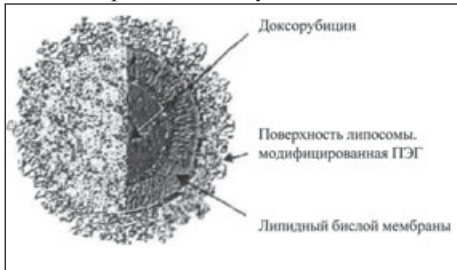


Рис.3. Пегелированная липосома

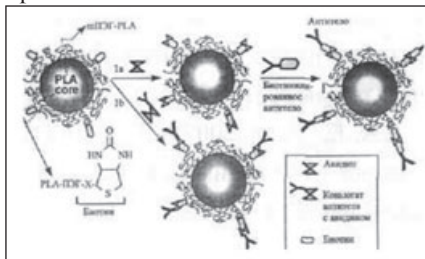


Рис.4. Свойства вектора наночастиц на основе ПЭГ- полилактида путём присоединения антител с использованием комплекса авидинбиотин (по С.Э. Гельпериной. и В.И. Швецу, 2009).

Эта технология используется для доставки противораковых средств к пораженным органам. Они представляют собой липосомы, модифицированные моноклональными антителами (МКА), которые обеспечивают специфическое связывание липосом с антиген-положительными клетками. Сами липосомы могут нести гидрофобный или гидрофильный фармакологический препарат (рис.5).

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

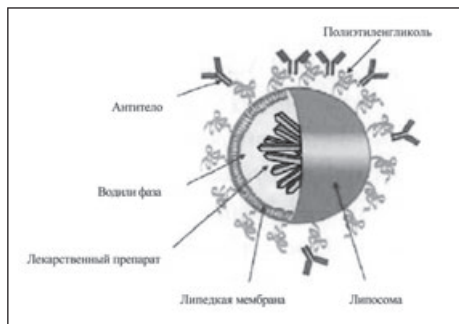


Рис.5. Схематическое строение пегилированной (ПЭГ) иммунолипосомы с антителами на её поверхности.

8. Магнитоуправляемые липосомы предназначены для направленного транспорта лекарственных веществ к органам-мишеням с помощью внешних физических воздействий. Они кроме лекарственных веществ содержат инкапсулированные мелкодисперсные частицы магнитных материалов (Г.К. Исмаилова, А.Г. Курегян, 2004, П.К. Исмаилова, 2005; П.К. Исмаилова с соавторами, 2005; А.И. Галанов с соавторами, 2008; В.А. Митькина с соавторами, 2008; А.Г. Першина с соавторами, 2008 и другие). Концентрирование липосом со стабилизированными коллоидами магнитными частицами обеспечивают доставку лекарств к пораженному органу. Ф.М. Байбуртский (2002) считает, что липосомы, содержащие курарепадобные препараты диадоний, пирокурин и дипироний локализуются в органе-мишени, помещённом в магнитном поле. При этом магнитная жидкость не оказывала дестабилизирующего действия на липосомы. Перспективы исследования и использования магнитоуправляемых липосом с инкапсулированным цитостатиком и наноразмерными ферромагнетиками продемонстрировали Г.Ц. Дамбаев с соавторами, 2009).

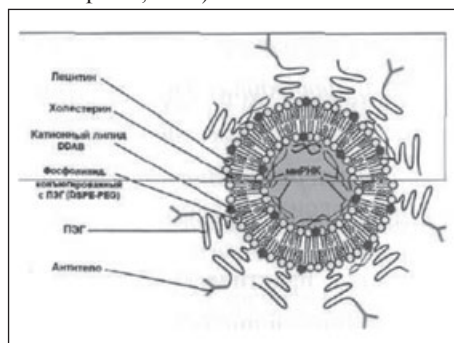


Рис.6. Геносомы - перенос генов в липосомах в клетку и клеточное ядро с целью проведения генной терапии.

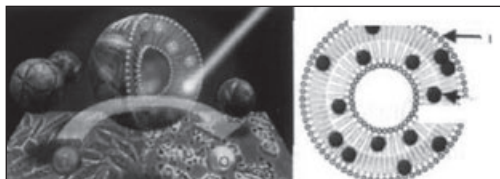


Рис.7. Углеродные наноструктуры фуллеренов C60 (мелкие 2-5 нм), встроенные в бимолекулярную мембрану липосомы (крупную 150 нм) (по А. Ikeda et al., 2007). Связанные с липидной мембраной фуллереины C60 индуцируют высвобождение синглетного кислорода, убивающего раковые клетки (фотодинамическая терапия). Слева пространственное изображение липосом и встроенных в их мембрану фуллеренов. Внизу синглетный кислород, уничтожающий раковые клетки (справа).

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Таким образом, магнитоуправляемые липосомы представляют определённый интерес для экспериментального исследования и практического применения в клинике.

9. Липосомальные векторы в генной терапии настоящее время применяются для ингибирования механизмов резистентности. Принцип разработки транспортных систем заключается в использовании катионных липидов/липосомы для упаковки нуклеиновых кислот. Они более стабильны, чем нейтральные липосомы при длительной циркуляции, которая необходима для конструкции, содержащей ген при генной терапии.

В настоящее время в клинике используются такие липосомальные формы антрациклинов как паклитаксел, камптотецины, винкристин и другие.

10. Липосомы с внедренными в их мембрану других наночастиц (фуллеренов) с целью повышения противораковой активности.

Таким образом, в практическом использовании липосом открываются дальнейшие перспективы в клинической фармакологии. Кроме медицины, они могут быть полезны в сельском хозяйстве, уже сейчас они находят применение в генной инженерии: с их помощью можно более эффективно, чем обычным путем, вводить генетическую информацию внутрь клеток.

КОЛЛОИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА КАК СРЕДСТВО НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЦИТОСТАТИКОВ: ПРОСПИДИНА И ЦИСПЛАТИНА

Соломевич С.О.¹, Бычковский П.М.¹, Кладиев А.А.², Щеголев С.Ю.³, Богатырев В.А.³, Юркинович Т.Л.¹, Капуцкий Ф.Н.¹, Беляев С.А.¹, Красный С.А.⁴, Истомин Ю.П.⁴, Александрова Е.Н.⁴

¹ - Учреждение БГУ «НИИ физико-химических проблем», Минск

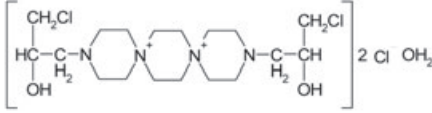
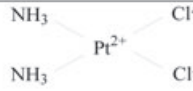
² - ООО «Биотехнологическая компания ТНК», Москва, Россия

³ - Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, г. Саратов, Россия

⁴ - ГУ «РНПЦ ОМР им. Н.Н. Александрова», Минск

Многочисленные опухолевые патологии остаются одними из самых коварных и непредсказуемых заболеваний, вносящих большой вклад в смертность населения планеты. Для большинства видов опухолей до сих пор не предложено эффективных схем терапевтического воздействия. Существующие лекарственные формы обладают низким терапевтическим эффектом, воздействуют не только на опухолевые клетки, но и на здоровые, вызывая тем самым огромное количество различных побочных эффектов. К таким препаратам можно отнести цитостатические препараты проспидин (N,N'''-бис-(γ -хлор- β -оксипропил)-N''N''-диспиротрипиперазиния дихлорид) и цисплатин (цис-диамминдихлорплатина (II)) (табл.1). Для оптимизации действия цитостатиков необходимо обеспечить целенаправленную доставку к пораженному органу, уменьшить вводимую дозу и повысить эффективность цитостатиков. Перспективной представляется доставка лекарственных веществ с помощью биологически совместимых наночастиц. Из всего многообразия наночастиц, используемых в медицине, отдельного внимания заслуживают золотые наночастицы, как одни из наиболее перспективных носителей для адресной доставки лекарственных веществ [1,2]. Цель работы – разработка противоопухолевых препаратов с использованием коллоидного золота (КЗ) в качестве носителя для адресной доставки цитостатиков.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Исследуемые в работе цитостатики			Таблица 1
Цитостатик	Структурная формула	Молекулярная масса	
Проспидин		500	
Цисплатин		300	

Были исследованы водные растворы КЗ со средним диаметром частиц 25 нм, приготовленные по методике [3], стабилизированные полиэтиленгликолем. Сорбцию противоопухолевых препаратов цисплатина и проспидина КЗ проводили из их водных растворов с концентрациями $8,33 \cdot 10^{-5}$ – $3,33 \cdot 10^{-3}$ и $1 \cdot 10^{-1}$ – $4 \cdot 10^{-1}$ ммоль/мл соответственно при $T=293$ К. Показано, что максимальное количество иммобилизованного проспидина составляет около 0,36 моль на 1 г используемого раствора коллоидного золота (в пересчете на золото). Максимальное содержание цисплатина в фазе КЗ составляет 36,3 ммоль/г при его концентрации в исходном растворе $3,3 \cdot 10^{-3}$ ммоль/мл (рис.1).

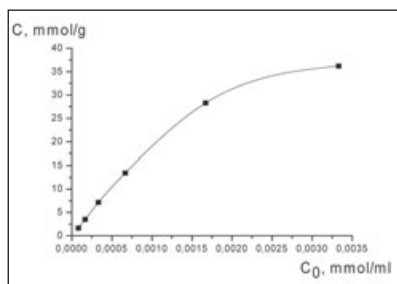


Рис.1. Изотерма сорбции цисплатина КЗ.

ПОДАВЛЕНИЕ КЛЕТОК HELa КЗ					Таблица 2
Препарат	Разбавление	Число клеток ($\times 103$)			Прирост в % к контролю
		Нисх.	N	N–Нисх	
Контроль	0	200 \pm 20	825 \pm 97	625	100
КЗ	1:400		735 \pm 48	535	86
	1:200		700 \pm 32	500	80

Исследование цитостатической активности проведено на монослойной культуре опухолевых клеток HeLa (эпителиоидная карцинома шейки матки человека, клон М). Культуру клеток выращивали в питательной среде 199 с добавлением 10% сыворотки крови плодов коровы и 50 мкг/мл канамицина. Для оценки цитостатического и цитотоксического эффектов препаратов количество выживших клеток сравнивали с числом клеток в контроле и с исходным числом клеток, до воздействия препарата. Снижение числа клеток после воздействия ниже исходного уровня свидетельствует о преобладании цитотоксического действия, а выше исходного, но ниже контроля – о преобладании цитостатического действия [4].

Перед анализом несвязанные цитостатики удалялись с раствором после центрифугирования, осадок КЗ с иммобилизованными цитостатиками ресуспензировался. Отдельно оценивалась цитостатическая активность КЗ (табл.2).

Противоопухолевая активность проспидина, иммобилизованного на КЗ, практически соответствует активности водного раствора проспидина при значительном

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

уменьшении его содержания (рис.2). Противоопухолевая активность цисплатина, иммобилизованного на КЗ, изучена для концентраций, соответствующих терапевтической дозе цитостатика. Активность образцов иммобилизованного КЗ цисплатина оказалась ниже, чем в случае его водного раствора (рис.3).

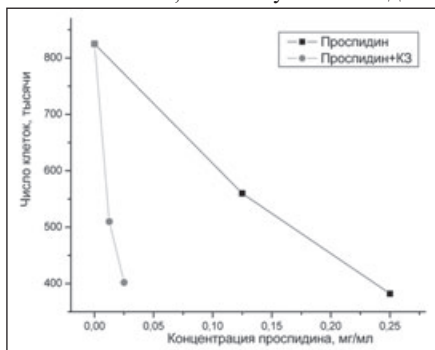


Рис.2. Подавление клеток HeLa иммобилизованным проспидином и его водным раствором.

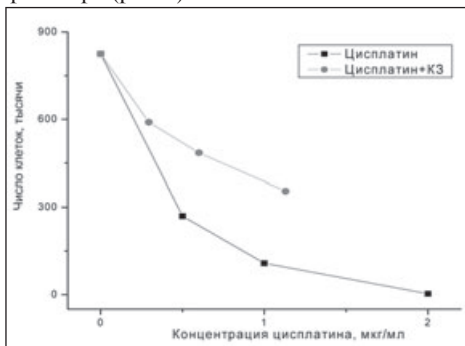


Рис.3. Подавление клеток HeLa иммобилизованным цисплатином и его водным раствором.

Таким образом, была изучена иммобилизация цисплатина и проспидина для концентраций, соответствующих их терапевтической дозе. Показано, что подавление клеток HeLa иммобилизованным КЗ проспидином соответствует подавлению клеток HeLa раствором проспидина, при существенном уменьшении концентрации проспидина. Для иммобилизованного КЗ цисплатина подавление клеток HeLa также значительно, но меньше, чем для его водных растворов. Было показано проявление цитостатической активности КЗ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Vyas S.P., Sihorkar V. Endogenous carriers and ligands in nonimmunogenic site-specific drug delivery // Adv. Drug Deliv. Rev. 2000. Vol. 43. P. 101-164.
2. Hughes G.A. Nanostructure-mediated drug delivery // Nanomedicine. 2005. Vol. 1. P. 22-30.
3. Маракушев С.А. Геомикробиология и биохимия золота. Наука, Москва, 1991.
4. Michalakos J., Georgatos S.D., Romanos J., Koutala H., Georgoulis V., Tsiftsis D., Theodoropoulos P.A. Micromolar taxol, with or without hyperthermia, induces mitotic catastrophe and cell necrosis in HeLa cells. Cancer Chemother. Pharmacol. 2005, 56: 615-22.

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИБРИДНЫХ НАНОСТРУКТУР НА ОСНОВЕ ФУЛЛЕРЕНА C₆₀ И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ

*Файнгольд И.И., Котельникова Р.А., Котельников А.И., Коновалова Н.П., Мищенко Д.В., Полетаева Д.А., Богданов Г.Н., *Романова В.С.*

*Институт проблем химической физики РАН, Черноголовка,
ifaingold@mail.ru*

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН,*

В настоящее время большое внимание уделяется проблеме создания гибридных наноструктур на основе фуллерена C₆₀ (ГНФ). Согласно многочисленным публикациям, посвященным производным фуллерена C₆₀, перспектива их использования

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

в биологической и фармакологической практике заслуживает особого внимания. Интерес к производным фуллерена C_{60} обусловлен уникальной структурой углеродного сфероида, наличием липофильных и мембранотропных свойств [1], его способностью перевести кислород в синглетное состояние, проявлять антирадикальные свойства [2], противовирусную активность [3] и цитотоксическое действие на опухолевые клетки при фотодинамической терапии [4]. Именно по этой причине фуллерен C_{60} рассматривается в химической фармакологии как весьма перспективный носитель функциональных группировок, обладающих фармакологической активностью. К их числу относятся алкилирующие группировки цитотоксического действия, антрациклины, группировки, обеспечивающие антиоксидантную активность, а также доноры монооксида азота (NO).

Перспектива внедрения производных фуллерена C_{60} в медицинскую практику обусловлена потребностью в новых лекарственных препаратах, которые при максимальном цитостатическом действии на опухолевые клетки минимально повреждали бы нормальные ткани организма. Именно это определяет особую актуальность проблемы по дизайну и исследованию свойств новых водорастворимых ГНФ, направленных на высокоэффективную лекарственную терапию злокачественных заболеваний.

В полной мере это относится к теме, цели и задачам настоящей работы, посвященной изучению биологической активности ГНФ и их применению в экспериментальной химиотерапии.

В качестве исследуемых соединений в работе использовались впервые синтезированные ГНФ [5]: фуллерилпролин (ФП), фуллерилпролинмононитрат (ФПМН) и фуллерилпролиндинитрат (ФПДН).

Важным условием для применения ГНФ в биологии и медицине является возможность их транспорта через клеточную мембрану. Методом триплетных зондов показано, что используемые соединения выступают тушителями фосфоресценции триплетных зондов в водных растворах и в составе фосфатидилхолиновых липосом. По изменению интенсивности фосфоресценции эритрозина, показана способность ГНФ проникать через липидный бислой биологических мембран.

В работе были изучены антиокислительные свойства ГНФ по их способности к ингибированию пероксидного окисления липидов (ПОЛ) на модели клеточных гепатоцитов. Было показано, что все изученные ГНФ являются биоантиоксидантами.

Способность водорастворимых гибридных соединений на основе фуллерена C_{60} проникать через липидный бислой фосфатидилхолиновых липосом позволяет предположить, что они могут вызывать изменения каталитической активности мембраносвязанных ферментов. В качестве примеров таких ферментов в работе были выбраны моноаминоксидазы митохондрий головного мозга А (MAO-A) и В (MAO-B), осуществляющие реакцию окислительного дезаминирования биогенных аминов. Показано, что все исследованные ГНФ в концентрации 10^{-4} М значительно (до 2-х раз) увеличивали каталитическую активность MAO-A и несколько менее значительно (в 1,2-1,3 раза) снижали каталитическую активность MAO-B.

Так как в ряду исследованных ГНФ наибольшей активностью обладали ФПМН и ФПДН, изучалась способность этих соединений генерировать NO, эффективность этого процесса оценивалась по изменению каталитической активности митохондриального фермента цитохром с-оксидазы, основная функция которого заключается в создании градиента протонов на митохондриальной мембране. Обнаружено, что ФП (в молекуле которого ONO_2 группа отсутствует) не влияет на каталитическую активность цитохром с-оксидазы. ГНФ, содержащие эту группировку, ингибируют каталитическую активность цитохром с-оксидазы, причем этот эффект зависит от числа донирующих ONO_2 групп. ФПМН и ФПДН в процессе биотрансформации в митохондриях генерируют монооксид азота, который взаимодействует с гемами и ионами меди активного центра фермента.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Одной из главных проблем экспериментальной онкологии является разработка новых средств и методов по ограничению опухолевого роста и метастазирования. За последние годы было создано множество новых высокоэффективных противоопухолевых лекарственных препаратов и разработаны схемы комбинированной терапии с их применением. Однако, несмотря на несомненный прогресс в лечении злокачественных опухолей, монокимиотерапия или комбинированная терапия не всегда приводит к желаемому эффекту. Одним из возможных путей улучшения результатов химиотерапевтического лечения является применение различных хемосенсибилизаторов, которыми, в частности, могут являться ГНФ. В работе изучены ГНФ в качестве хемосенсибилизаторов терапевтического действия противоопухолевых препаратов. Исследование противоопухолевого эффекта циклофосфида (ЦФ) при комбинированной терапии с ГНФ проводили на самцах-гибридах BDF₁ с лейкемией P-388. Для проведения эксперимента были выбраны низкие субтерапевтические дозы цитостатика. Препараты вводили внутривенно. Было показано, что монокимиотерапия ГНФ не оказывает противоопухолевого эффекта. При комбинированной терапии все водорастворимые ГНФ приводили к повышению противоопухолевого эффекта ЦФ и излечению части животных. Максимальный терапевтический эффект проявлялся излечением 65% и 80% животных при сочетанном применении ЦФ с ФПМН и ФПДН, соответственно.

Антиметастатическую активность ГНФ и их комбинаций с адриамицином (АДР) исследовали на мышях BDF₁ со спонтанно метастазирующей опухолью – карциноме легких Льюис. Обнаружено повышение антиметастатической эффективности АДР при его комбинированном применении с ГНФ. Величина индекса ингибирования метастазов в легких мышей с карциномой Льюис при восьмикратном введении АДР в дозе 1 мг/кг была ниже величины индекса ингибирования метастазов при комбинированном введении ГНФ с АДР. Усиление антиметастатического действия адриамицина при его комбинации с ФПМН и ФПДН в данном случае обусловлено содержанием ONO₂-групп в структуре производных фуллерена C₆₀. Максимальный ингибирующий эффект отмечен при совместном применении адриамицина и ФПДН, индекс ингибирования метастазов при этом составил 40%. Один из возможных механизмов усиления антиметастатического действия АДР при его комбинации с ФПМН и ФПДН, по-видимому, связан с действием оксида азота на тромбоциты.

Полученные в работе данные, свидетельствуют о возможности применения гибридных наноструктур на основе фуллерена C₆₀ в качестве хемосенсибилизаторов, повышающих противоопухолевую и антиметастатическую эффективность цитостатиков при комбинированной химиотерапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kotelnikova R. A., Kotelnikov A. I., Bogdanov G. N., Romanova V. S., Kuleshova E. F., Parnes Z. N., Volpin M. E., FEBS Letters, 1996, 389, 111-114.
2. Tokuyama H., Nakamura S., Nakamura E., J. Am. Chem. Soc., 1993, 115, 7918.
3. Фрог Е.С., Котельникова Р.А., Богданов Г.Н., Штолько В.Н., Файнгольд И.И., Куш А.А., Федорова Н.Е., Меджидова А.А., Романова В.С., Технологии живых систем. 2006, 3, 42-46.
4. Nakamura E., Tokuyama H., Yamago S., Shiraki T., Sugiura Y., Bull. Chem. Soc. Japan., 1996, 69, 2143-2151.
5. Котельников А.И., Романова В.С., Богданов Г.Н., Коновалова Н.П., Писаренко О.И., Котельникова Р.А., Файнгольд И.И., Фрог Е.С., Бубнов Ю.Н., Давыдов М.И., Алдошин С.М., Патент РФ № 2009140099, 2009 г.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

BIOLOGICAL ACTIVITY OF THE HYBRID NANOSTRUCTURES BASED ON FULLERENE C₆₀ AND THEIR APPLICATION IN EXPERIMENTAL CHEMOTHERAPY

Faingold I.I., Kotelnikova R.A., Kotelnikov A.I., Konovalova N.P., Mishenko D.V.,
Poletaeva D.A., Bogdanov G.N., *Romanova V.S.

*Institute of Problems of Chemical Physics RAS, Chernogolovka, Moscow region.
A.N. Nesmeyanov Institute of Organoelement Compounds RAS, Moscow.
ifaingold@mail.ru*

New hybrid nanostructures based on fullerene C₆₀ (HNF) are presented in the work. The compounds were shown to be a phosphorescence quenchers for the triplet probes in water solutions as well as in the phosphatidylholine liposomes. The compounds were also demonstrated to penetrate through lipid bilayer of biological membranes, to inhibit lipid peroxidation in the mitochondria of hepatocytes and to effect the catalytic activity of the membrane-bound enzymes of the oxidative desamination – monoaminoxidase A (MAO-A) and monoaminoxidase B (MAO-B). It was studied the effect of HNF on the catalytic activity of the mitochondrial enzyme cytochrome c oxidase. It was found that HNF efficiently generated NO in mitochondria of rat brain. Maximum efficiency of inhibition of HNF is characteristic of compounds containing several ONO₂ groups. It was shown the capability of the HNF to increase the antitumor and antimetastatic activity of cytotoxic drugs (cyclophosphamide, doxorubicin) in combination chemotherapy.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА, СОДЕРЖАЩЕГО КДНК Т-КАДГЕРИНА, ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ КЛЕТОК МЫШИНОЙ МЕЛАНОМЫ V16F10

Юрлова Е.И. , Рубина К.А. , Сысоева В.Ю., Ткачук В.А.

*Факультет Фундаментальной медицины Московского Государственного Университета имени
М.В.Ломоносова
katerina-u48@mail.ru*

В данной работе было исследовано влияние введения плазмидного вектора, содержащего кДНК Т-кадгерина, на экспрессию клетками мышинной меланомы генов, отвечающих за рост и инвазивность опухолей. В ходе исследования было обнаружено, что при гиперэкспрессии Т-кадгерина значительно увеличивается уровень экспрессии клетками мышинной меланомы VEGF, p27 и c-Met, а также снижается уровень экспрессии uPaR. Также нами была обнаружена обратная зависимость между уровнем экспрессии Т-кадгерина клетками мышинной меланомы и уровнем экспрессии TGFβ. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы приводит к изменению профиля экспрессии этих клеток и возможно, к снижению их пролиферативной активности и инвазивности.

Т-кадгерин – уникальный представитель суперсемейства кадгеринов. В отличие от «классических» кадгеринов он не имеет ни трансмембранного, ни цитоплазматического доменов и удерживается на плазматической мембране при помощи гликозилфосфатидилинозитольного (GPI) якоря [1]. В результате многочисленных исследований было обнаружено, что экспрессия Т-кадгерина снижена или отсутствует во многих образцах опухолей и в опухолевых клеточных линиях, включая рак молочной железы, рак лёгких, рак толстой кишки, нейроblastому, рак простаты, рак

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

мочевого пузыря и меланому [2, 3, 4]. Трансфекция клеток карциномы молочной железы кДНК Т-кадгерина значительно подавляет пролиферацию клеток в культуре, что также сопровождается изменением фенотипа раковых клеток с инвазивного на фенотип, характерный для нормальных эпителиальных клеток [2]. Гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках нейробластомы приводит к подавлению инвазии клеток, а также к потере способности клеток отвечать усилением пролиферации на добавление эпидермального фактора роста (EGF) [3]. Гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках глиомы С6 сопровождается уменьшением клеточной миграции и подавлением роста и пролиферации клеток (остановка клеточного цикла на стадии G2) [5]. Эти данные позволили нам предположить, что гиперэкспрессия Т-кадгерина в клетках опухолей может приводить к изменению не только фенотипа клеток, но и влиять на профиль экспрессии этих клеток.

Для исследования влияния Т-кадгерина на профиль экспрессии генов, клетки мышинной меланомы В16F10 трансфицировали кДНК Т-кадгерина человека, клонированной в плазмиду для эукариотической экспрессии pсDNA3.1 (Invitrogen). Путём отбора в среде, содержащей селективный антибиотик, были получены несколько клонов клеток мышинной меланомы с различным уровнем экспрессии Т-кадгерина. В качестве контроля использовали клон клеток мышинной меланомы, трансфицированных контрольной плазмидой pсDNA3.1. На отобранных клонах с разным уровнем экспрессии Т-кадгерина и контрольном клоне клеток мышинной меланомы методом полимеразной цепной реакции с детекцией в режиме реального времени определяли уровень экспрессии следующих генов: VEGF, TGF β , c-met, uPaR, uPa, p27, PDGF β , MMP-2.

В ходе исследования было обнаружено, что при гиперэкспрессии Т-кадгерина значительно увеличивается уровень экспрессии клетками мышинной меланомы генов VEGF, p27 и c-Met, а также снижается уровень экспрессии uPaR по сравнению с контрольным клоном. Также нами была обнаружена обратная зависимость между уровнем экспрессии Т-кадгерина клетками мышинной меланомы и уровнем экспрессии TGF β . Не было обнаружено изменений в уровне экспрессии uPa, MMP2 и PDGF β в зависимости от количества Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы.

Полученные нами результаты позволяют предполагать, что при гиперэкспрессии Т-кадгерина изменяется профиль экспрессии клеток мышинной меланомы. Известно, что VEGF является фактором, запускающим ангиогенез, и увеличение его экспрессии является неблагоприятным прогностическим фактором при канцерогенезе. При развитии злокачественных новообразований c-Met также способствует росту и инвазии опухоли. Однако в нашем исследовании в клоне клеток мышинной меланомы с гиперэкспрессией Т-кадгерина помимо увеличения уровня экспрессии VEGF и c-Met одновременно наблюдается увеличение уровня экспрессии p27, который приводит к торможению деления клеток за счёт задержки их в G1 фазе клеточного цикла. Нами было обнаружено снижение уровня экспрессии uPaR при гиперэкспрессии Т-кадгерина, что свидетельствует об уменьшении в таких клетках инвазивной способности. Кроме того нами была обнаружена чёткая обратная зависимость между количеством Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы и уровнем экспрессии в них TGF β . В норме TGF β способен подавлять рост нетрансформированных клеток, однако при развитии опухолей он поддерживает их рост, способствует инвазии и метастазированию, а также подавляет иммунный ответ со стороны клеток иммунной системы хозяина [6]. То есть можно предположить, что снижение экспрессии TGF β будет сопровождаться понижением инвазивных характеристик и иммуноотолерантности опухоли. Изменений в уровне экспрессии uPa, MMP2 и PDGF β в зависимости от количества Т-кадгерина в клетках мышинной меланомы не было обнаружено.

Итак, полученные нами результаты подтвердили, что при гиперэкспрессии Т-кадгерина в клетках меланомы изменяется профиль экспрессии генов, отвечающих за рост и инвазивные характеристики опухоли и может способствовать их снижению.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ranscht B., Dours-Zimmermann M.T. T-cadherin, a novel cadherin cell adhesion molecule in the nervous system lacks the conserved cytoplasmic region // *Neuron*. 1991. V.7. N.3 P. 391-402.
2. Lee S.W. H-cadherin, a novel cadherin with growth inhibitory functions and diminished expression in human breast cancer // *Nature Medicine*. 1996. V.2. P. 229-235.
3. Takeuchi T., Misaki A., Liang S.B., Tachibana A., Hayashi N., Sonobe H., Ohtsuki Y. Expression of T-cadherin (CDH13, H-cadherin) in human brain and its characteristics as a negative growth regulator of epidermal growth factor in neuroblastoma cells // *J. Neurochem*. 2000. V.74. P. 1489-1497.
4. Takeuchi T., Ohtsuki Y. Recent progress in T-cadherin (CDH13, H-cadherin) research // *Histol. Histopathol*. 2001. V.16. P. 1287-1293
5. Huang Z.Y., Wu Y., Hedrick N., Gutmann D.H. T-cadherin-mediated cell growth regulation involves G2 phase arrest and requires p21 (CIP1/WAF1) expression // *Mol. Cell. Biol*. 2003. V.23. P. 566-578.
6. Kaminska B., Wesolowska A., Danilkiewicz M. TGF beta signalling and its role in tumour pathogenesis // *Acta Biochimica Polonica*. 2005. V.52. N. 2. P. 329-337.

USE PLASMID VECTOR CONTAINING CDNA OF T-CADHERIN TO CHANGE THE EXPRESSION PROFILE OF MURINE MELANOMA CELLS B16F10

Yurlova E.I., Rubina K.A., Syssoeva V.Yu. , Tkachuk V. A.

In this work we studied the effect of plasmid vector containing cDNA of T-cadherin on the expression of murine melanoma cells of genes responsible for the growth and invasiveness of tumors. The study found that, overexpression of T-cadherin significantly increased the level of expression VEGF, p27 and c-Met in murine melanoma cells, as well as reduced levels of expression uPaR. Also, we found an inverse relationship between expression levels of T-cadherin in murine melanoma cells and the expression levels of TGFβ. Our data suggest that overexpression of T-cadherin in murine melanoma cells leads to a change in the expression profile of these cells and perhaps reduce their proliferation activity and invasiveness.

ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВОГО КОМПЛЕКСА ФТАЛОЦИАНИНА КОБАЛЬТА

Р.И.Якубовская, А.А.Панкратов, Ю.Б.Венедиктова, О.А.Безбородова, Е.Р.Немцова, А.Н.Калиниченко, В.И.Чиссов, Г.Н.Ворожцов

ФГУ «МНИОИ им. П.А.Герцена Росмедтехнологий», ФГУП «ГНЦ «НИОПИК»
e-mail: raisayakub@yandex.ru

В начале девяностых годов впервые в России в качестве потенциальных противоопухолевых средств были предложены бинарные каталитические системы (БКС) на основе катализатора (комплексы переходных металлов) и субстрата окисления (различные биогенные соединения и, в частности, аскорбиновая кислота; Ак), обладающие выраженным противоопухолевым, химио- и радиомодифицирующими свойствами. При каталитическом окислении Ак происходит образование высокоэнергетических активных форм кислорода и других свободных радикалов органического и неорганического характера, обладающих высоким цитотоксическим потенциалом [1-4, 8, 10, 11].

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

В первой бинарной каталитической системе (БКС), дошедшей до клинических испытаний, используется натриевая соль октакарбокисфталоцианина кобальта (препарат «Терафтал-лио»; Тф-лио [6, 7, 9]). При создании препаратов второго поколения это соединение, имеющее свойства комплексона металлов, заменено на его производное - тетра[метилпента(гекса)этиленгликолевый] эфир терафтала (ЭТФ), обладающий значительно менее выраженной токсичностью. Однако, существенным недостатком ЭТФ является его низкая растворимость в воде. Поэтому, с целью улучшения растворимости этого соединения в водных растворах была создана наноструктура, представляющая собой комплекс включения ЭТФ с поли-О-(1-гидрокси-2-пропил)циклогептадекстрином. На основе этой субстанции разработан лекарственный препарат «Эфитер».

Настоящее исследование направлено на доклиническое изучение фармакологических эффектов БКС «Эфитер + Аскорбиновая кислота» *in vivo*.

Противоопухолевая эффективность БКС «Эфитер+Ак» изучена на мышцах с перевиваемыми опухолями различного гистогенеза (карцинома, саркома, лейкоз) и различной формой роста (асцитные и солидные опухоли). Установлено, что терапевтическая эффективность этой БКС зависит от дозы металлокомплекса, молярного соотношения катализатор: восстановитель, временного интервала между их введением, а также от схемы лечения.

Оптимальным терапевтическим режимом применения БКС «Эфитер + Ак» для лечения асцитных опухолей являлось однократное, последовательное введение эфитера в дозе, равной 1250 мг/кг и аскорбиновой кислоты в дозе, равной 443 мг/кг (молярное соотношение ЭТФ:Ак – 1:30). Максимальный противоопухолевый эффект был отмечен у мышей с АОЭ где УПЖ составило 92%

При лечении мышей с солидными опухолями (Са-755, LLC, P-388, РШМ-5, АКА-ТОЛ) наиболее эффективным было курсовое (ежедневно в течение 5-и дней) введение эфитера в дозе, равной 1250 мг/кг, с последующим, через 60 минут, введением аскорбиновой кислоты в дозе равной 443 мг/кг (молярное соотношение ЭТФ:Ак – 1:30). Наибольшая эффективность при использовании этой схемы лечения была достигнута у мышей с карциномой молочной железы Са-755, солидной формой лимфолейкоза P-388 и карциномой легких Льюис: у мышей наблюдали ингибирование роста опухоли на 89-50% (сохранение эффекта от 11 до 20 дней после окончания лечения).

В ходе изучения терапевтической эффективности комбинированного применения БКС на основе препарата «Эфитер» и официальных противоопухолевых препаратов (цисплатин, доксорубин, циклофосфан, фторурацил, таксол) наибольшая терапевтическая эффективность лечения была достигнута при комбинированном применении этой БКС и препарата «Цисплатин». Так, БКС «Эфитер+Ак» в схемах комбинированного применения с цисплатином, позволила уменьшить дозу высокотоксичного цитостатика в 2 – 4 раза без снижения эффективности лечения.

При сравнении противоопухолевой эффективности БКС «Эфитер+Ак» и «Терафтал-лио+Ак», как в монотерапии, так и в схемах комбинированного применения с препаратом «Цисплатин» в оптимальных режимах применения показано, что эти БКС характеризуются сопоставимой противоопухолевой активностью и являются эффективными модификаторами терапевтической эффективности цисплатина (рис.1).

На мышцах с S-37 (модель выросшей опухоли) показано, что комбинированное применение БКС «Эфитер + Ак», ЛГТ (43°C, 10 мин) и препарата «Цисплатин» по схеме:

ДДП, 24 часа → Эфитер, 1 час+Ак, 5 мин → ЛГТ

оказывало выраженное лечебное действие при использовании терапевтических доз цитостатика и БКС – 8 мг/кг и 1250+443 мг/кг, соответственно (ТРО на уровне 90-72% сохранялось более 18 дней после лечения).

Включение БКС на основе эфитера в схему комбинированного применения лучевой и химиотерапии способствовало выраженному увеличению эффективности

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

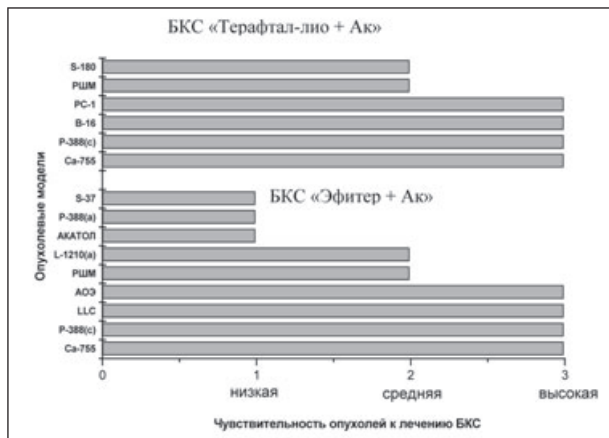


Рис. 1. Чувствительность перевиваемых опухолей животных к лечению БКС «Эфитер+Ак» и «Терафтал-лио+Ак».

лечения на животных с ОЭ и LLC. Терапевтический вырывш при этом составлял от 40 до 65% в зависимости от применяемой схемы лечения.

При оценке токсических свойств («острая» токсичность) БКС на основе препаратов «Эфитер» и «Терафтал-лио» установлено, что БКС «Эфитер+Ак» оказывала значительно менее выраженное токсическое действие, чем БКС на основе аналога – препарата «Терафтал-лио» (табл. 1).

В экспериментах по изучению «хронической» токсичности БКС на основе препарата «Эфитер» на крысах и собаках установлено, что многократное введение этой БКС животным в высокой токсической дозе не выявило токсического действия каталитической системы на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы, легких, почек, поджелудочной железы и других органов. В тоже время данные патоморфологических исследований показали, что внутривенное применение каталитической системы собакам вызывало у животных длительно сохраняющиеся, но обратимые деструктивные и дистрофические изменения в печени и почках, а в легких – выраженные воспалительные изменения.

Характеристика дозы	Дозы металлокомплекса и аскорбиновой кислоты, мг/кг	
	БКС «Эфитер+Ак»	БКС «Терафтал-лио+Ак» [5]
LD ₁₀ (МПД)	1665+590 1485+525 ÷ 1865+660	42+92 36,2+79,6 ÷ 48,7+107,1
LD ₅₀	2150+761 1920+680 ÷ 2410+853	61+134 52,6+115,7 ÷ 70,8+155,8

Мыши F₁, самцы. Компоненты БКС вводили внутривенно. Интервал времени между введением металлокомплекса и аскорбиновой кислоты составил 1 час. Молярное соотношение ЭТФ:Ак – 1:30. Молярное соотношение Тф-лио:Ак – 1:10.

Таким образом:

- противоопухолевая эффективность БКС на основе препарата «Эфитер» сопоставима с эффективностью БКС на основе своего предшественника – препарата «Терафтал-лио»;

- БКС «Эфитер+Ак» имеет широкий спектр противоопухолевого действия, характеризуется средней противоопухолевой эффективностью и является эффективным химио-, радио- и термомодификатором.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

- БКС на основе препарата «Эфитер» оказывала значительно менее выраженное токсическое действие, чем БКС на основе аналога – препарата «Терафтал-лио».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Менщикова Е.Б., Ланкин В.З., Зенков Н.К. и др./Окислительный стресс Прооксиданты и антиоксиданты, М, 2006.
2. елков В.М. / Дисс. канд. биол. наук. М., -1996.
3. Борисенкова С.А., Гиренко Е.К., Калия О.Л./ Российский химический журнал.-1998.-т. XLII, N5.-с.111.
4. Вольпин М.Е., Крайнова Н.Ю., Москалев И.В. и др /Изв. АН, сер. химич. –1996, -№ 8. –с.2105.
5. Кульбачевская Н.Ю./ Дисс. канд. биол. наук. М., -2008.
6. Кульбачевская Н.Ю., Манзюк Л.В., Михайлова Л.М./Российский биотерапевтический журнал. -2004, -№2, -Т.3, -с. 70
7. Манзюк Л.В., Бредер В.В., Гершанович М.Л. и др./ Российский биотерапевтический журнал. -2005, -№1, -Т.4, -с. 105-107
8. Панкратов А.А., Андреева Т.Н., Якубовская Р.И./Российский онкологический журнал, № 2, 2006 г., с. 23 - 26
9. Сыркин А.Б., Жукова О.С., Кикоть Б.С. и др.// Российский химический журнал, № 5, 1998 г., с.140 - 146;
10. Чиссов В.И., Якубовская Р.И., Панкратов А.А. и др./Российский онкологический журнал, № 6, 2000 г., с. 23 - 26;
11. Vol,pin M.E., Novodarova G.N./ J. Molec. Catalysis, 1992, v. 74, p. 153.

EFFICACY AND SAFETY OF ANTI-TUMOR COMPOSITION INCLUDING COBALT PHTHALOCYANINE AND CYCLODEXTRIN

Raisa I. Yakubovskaya, Andrey.A.Pankratov, Julia B.Venediktova, OlgaA.Bezborodova, Elena R.Nemtsova, Anna N.Kalinichenko, Valeriy I.Chissov, Georgiy N.Vorozhtsov

*Moscow Hertsen Institute of Oncology, State Research Centre "Institute of Organic Intermediates and Dyes"
e-mail: raisayakub@yandex.ru*

Results of the in vivo study of the Ehyter+Ascorbic acid binary catalytic system (BCS) are presented in this work. Ehyter is a nanostructure formed by the composition of tetra[methylpenta(hexa)ethylenglycol] ether of cobalt octacarboxyphthalocyanine with poly-O-(1-hydroxy-2-propyl)cyclodextrin.

It has been shown using animals bearing transplanted tumors of various histogenesis that Ehyter+Ascorbic acid BCS is characterised by middle antitumor efficacy but it demonstrates wide spectrum of antitumor effects and it is active as a chemo-, radio, and thermomodifier. The comparative evaluation of Ehyter and Teraphthal-based BCS toxicity revealed that Ehyter+Ascorbic acid BCS was less toxic to experimental animals (mice, rats, and dogs) than Teraphthal+Ascorbic acid BCS independent of multiplicity of their injections.

CELLULAR UPTAKE AND TRANSCELLULAR TRANSPORT OF BENEFICIAL FOOD COMPOUNDS FROM SUBMICRO/NANOMETER SCALE FORMULATIONS

K. Briviba^I, S. Unser^I, CE Rüefer^{II}, P. Butz^{II}

*Max Rubner-Institute (MRI), Federal Research Institute of Nutrition and Food,
Haid-und-Neustraße 9, 76131 Karlsruhe, Germany*

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

¹ *Department of Physiology and Biochemistry of Nutrition, Karlsruhe, Germany,
Tel: ++49-721-6625407, Fax: ++49-721-6625404, email: karlis.briviba@mri.bund.de*

¹¹ *Department of Safety and quality of fruit and Vegetables*

Nanoparticles offer a perspective for many food applications including improved delivery properties, solubility and an efficient absorbance of beneficial food ingredients in order to reduce the risk of certain diseases including cancer. Based on scientific evidence, there are many recommendations for an increased intake of fruits and vegetables to reduce the risk of some cancers and other degenerative diseases. Application of submicro/nano technology to food processing of plant material can be designed to achieve products with increased bioavailability of food ingredients with health promoting properties. Bioavailability includes a number of processes (I) availability for absorption or the so-called bioaccessibility, (II) absorption, (III) tissue distribution and (IV) bioactivity. In nutritional sciences it is often assumed that any compound that is absorbed will be bioactive since it has metabolic consequences, although this activity can vary enormously.

Here, we will focus our attention on the first two stages; bioaccessibility and absorption. Bioaccessibility is defined as the amount of an ingested compound that becomes available for absorption in the gastrointestinal tract. There are a number of variables which can affect bioaccessibility including the state of the food, such as raw and processed, particle size, mode of size disruption, composition of meal (e.g. content of fat, protein, carbohydrate), digestive enzymes and product of digestion, presence of bile acids. A lot of reports show that many bioactive compounds, such as carotenoids, will be better absorbed from processed food with disrupted food matrix than from raw food. Lower particle size leads to faster solubilization of fat soluble compounds into micelles and more effective absorption. Processing of liquid food, like soy milk, using ultra high-pressure homogenisation technique is a mechanical food processing process which includes disruption of food matrix with subsequent particle size reduction. These could be crucial factors leading to modified bioavailability of health beneficial food compounds.

High pressure homogenisation

Food preservation using heat treatment has some drawbacks and it is accompanied by a change of taste, colour and reduction of vitamin concentrations. Processing methods, which do not include direct heat treatment such as UV irradiation, ionising radiation, pulsed electric field treatment and high pressure homogenisation (HPH), have been proposed as alternatives to thermal pasteurisation. High pressure homogenisation (50-4000 bar) inactivates microorganisms and enzymes resulting in higher shelf life with minimal effect on nutritional and sensory quality (Butz and Tauscher, 2002). HPH is widely used in the food industry for emulsion stabilisation of many products, such as milk, milk cream and ice cream and is the ideal mechanical process for producing droplet sizes below 1 μm . Ultra high-pressure homogenisation (1750-4000 bar) is a subclass of high pressure homogenisation. This method was first used in the biotechnology and pharmaceutical industries to recover intracellular compounds due to cell disruption or to produce nanocrystals of poorly water soluble drugs in order to increase their bioavailability (Junghans and Müller, 2008). For this reason a drug powder is usually dispersed in aqueous surfactant solution and then homogenised by pressures up to 4000 bar. The drug particles are reduced in size (below 100 nm) due to high shear forces, turbulent flow and shockwaves. There are also a number of research papers describing advantages and application of UHPH to increase the bioavailability of poor water soluble pharmaceutical compounds (Müller and Moeschwitzer, 2005; Junghans and Müller, 2008). But there is no available literature on the effect of ultra-high pressure homogenisation of food on the bioavailability of food components.

In vitro models to investigate cellular uptake

In vitro cell culture models make it possible to investigate the absorption of food components by intestinal cells and to avoid the effects of some factors which are difficult to

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

control: efficacy of food matrix disruption, solubilisation of carotenoids and incorporation into mixed micelles. There are a number of cell culture models, such as Caco-2, HT 29 and others, that mimic human intestinal epithelia and thus make it possible to investigate cellular uptake and transcellular transport of compounds. Caco-2 cell monolayers grown on permeable supports mimic intestinal absorptive epithelium and show good correlation between the drug transport through cell monolayer and that seen across the human intestine *in vivo* (Travelin et al., 2002). Caco-2 or HT29 cells grown in culture dishes can be used as a model for cellular uptake (Ribeiro et al., 2006).

Cellular uptake of lipid soluble compounds based on the example of carotenoids from HPH treated preparations

Incubation of HT 29 colon epithelial cells on 35 mm culture dishes were incubated with O/W emulsions loaded with 10 μM β -carotene or astaxanthin and resulted in an increase in the cellular concentration of carotenoids. O/W emulsions were prepared with palm oil and polyoxyethylene-20-sorbitan-monolaurate (Tween 20) as the disperse phase. The O/W emulsions were homogenised at 1200 bar using the Microfluidizer equipment. Emulsion particle size was in the range from 0.28 to 0.8 μm . A slight dependence of the cellular carotenoid concentration on droplet size was observed (Ribeiro et al., 2006). The cellular uptake of astaxanthin and β -carotene from O/W emulsions were comparable.

The cellular uptake of carotenoids from HPH-produced emulsions depends on the emulsifiers used. Whey proteins combined with Tween 20 or sucrose laurate significantly increased carotenoid (astaxanthin, lycopene) uptake from emulsions (Ribeiro et al., 2006).

Effective cellular uptake of carotenoids (astaxanthin, β -carotene, lycopene) from carotenoid-enriched liposomes prepared from phosphatidylcholine was observed. Carotenoid uptake from liposomes was more effective than from Tween 20 emulsions but comparable to or lower than from whey protein/Tween 20 emulsions (Ribeiro et al., 2006).

Thus the uptake of carotenoids by the intestinal cells depends on carotenoid, species, carrier type (emulsions, liposomes) and the chemical ingredients of the formulation (e.g. whey proteins).

Cellular uptake and transcellular transport of water soluble compounds using the example of isoflavones from UHPH-treated and non-treated soy milk

Soy milk is rich in bioactive compounds such as isoflavones. These compounds are thought to be responsible for a number of beneficial health effects of soy exposure including benefits for bone, cardiovascular diseases, menopausal symptoms and certain types of cancer (for review see Franke et al., 2009). However, there is also evidence from animal studies that soy isoflavone, genistein, can cause adverse effects, such as developmental toxicity in male and female mice and rats (for review see Rozman et al., 2006) and genistein and soy products can stimulate mammary tumour growth in a mouse model depending on soy processing. Soybeans are the richest source of isoflavones. In whole soybeans the isoflavones occur mostly as 6''-O-malonylglucoside conjugates. Soya milk is produced from soybeans by hot water extraction which results in the formation of β -glucoside forms of isoflavones, e.g. genistin and daidzin. In soy milk the concentrations of aglycones, genistein and daidzein are usually lower than the concentrations of their glycosides.

UHPH change the properties of the food matrix and consequently can change the bioavailability and activity of these biologically active compounds; depending on the dose and the subject this can result in no effects, beneficial or adverse effects.

The aim of this investigation was to compare the cellular uptake and transcellular transport of isoflavones from a commercial soy milk and soy milk treated with ultra-high pressure homogenisation (2000 bar). Commercial soy milk (Alpro soya) was purchased from a local grocery store. The concentration of isoflavonoids was measured by an HPLC/MS system. The concentrations of isoflavones in soy milk were estimated to be: genistin (genistein-glucoside) 124.5 ± 19.5 mg/L, genistein 5.1 ± 1.9 mg/L, daidzin (daidzein-glucoside) 23.8 ± 4.4 mg/L and daidzein 5.6 ± 1.6 mg/L. Ultra-high pressure homogenisation of soya milk was performed

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

with a home-built ultra-high pressure homogenisator at 2000 bar and 30°C. There was no statistically significant effect on the isoflavone concentration caused by UHPH treatment.

The cellular uptake and transcellular transport of isoflavones from soya milk preparations was investigated using intestinal Caco-2 cells grown on permeable supports (Transwell-system) as a model of intestinal absorption. The soy milk preparations were diluted with the cell culture medium to a final concentration of 20 and 3.3% (V/V) and added to the apical medium chamber for 1 and 24 h, respectively. After incubation the cells and the samples from apical and basolateral chambers were collected and analysed for isoflavones by HPLC/MS.

Our data on cellular uptake of isoflavones confirmed these observations. We found that although the concentration of glucosides in soy milk was about 4 to 25 times higher than that of their aglycones, the cellular concentration of aglycones was about 10 to 30 times higher than that of glucosides. This shows that similar to animal and human studies the isoflavone aglycones are much more effectively taken up by intestinal cells than their glucosides. The efficacy of cellular uptake was similar for daidzein and genistein expressed as percentage of isoflavone uptake. There was no difference in cellular uptake of isoflavones (aglycones and glucosides) between UHPH-treated and non-treated soy milk.

Similar effects were also observed for the transcellular transport of isoflavones and their glucosides. Again, aglycones were transported much more effectively across the monolayer of intestinal cells than their glucosides and there was no difference between UHPH-treated and non-treated samples.

In conclusion the UHPH-treatment of soy milk did not affect bioaccessibility and cellular uptake/transport of water soluble components of soy milk, such as isoflavones and their glucosides.

Conclusions

The uptake of carotenoids by the intestinal cells depends on carotenoid, species, carrier type (emulsions, liposomes) and the chemical ingredients of the formulation (e.g. whey proteins). HPH/UHPH treatment can lead to formation of particles in the nanometer range in which components can be very effectively absorbed. It seems that the cellular uptake and transport of water soluble compounds, such as soy isoflavones, are not affected by UHPH treatment of soy milk. According to our data and the data from literature, bioavailability of poor water soluble compounds (such as carotenoids) from submicro/nanopreparations can be increased significantly. Thus, UHPH of liquid food can modify the bioavailability of poor water soluble compounds, which can result in beneficial or adverse effects depending on the compound with increased bioavailability.

THE INFLUENCE OF HUMAN INTRON INSERTION ON EUKARYOTIC VECTOR EXPRESSION

*M.A Karimi¹, N. Pirooznia¹, M. Eskandani¹, F. Rahbarizadeh² and S. Hasannia^{*1}*

¹ Department of biology, Faculty of science, The university of guilan, Rasht, Iran

² department of medical biotechnology, Tarbiat modares University, Tehran, Iran

The rising rate of cancer-related diseases underscores the need for new approaches to fight cancer. Cancer immunotherapy is the use of the immune system to reject cancer. The specific activation of the immune system to control cancer growth has been long-lasting goal in cancer immunotherapy. T cells expressing chimeric receptors are able to discriminate between antigen-expressing and normal cells. T cells are well suited to penetrate and destroy solid tumors. In this study, we use chimeric T Cell Receptor (CR) with four proteins fused

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

at the DNA level in such a way that, once expressed, they result in a single TCR polypeptide chain consisting of four moieties: camelid heavy chain antibody moiety (VHH), a spacer (FcγRIIa), A transmembrane or signaling moiety (CD3Zeta) and co-stimulating moiety (CD28). Various methods, such as using various promoters, selection of specific untranslated region (UTRs), various signal sequences, appropriate inducer and other biotechnological procedures are being employed to increase expression in eukaryotic vectors. In this study we use human intron integration to study its effect on gene expression. After intron insertion in vector containing chimeric T- cell receptor cassette, this new construct has been transform into the eukaryotic cell line, jurkat E6.1. Expression analysis through RT-PCR method and their function using bioassay have been examined. The results showed more expression and better function of constructed chimeric receptor. Therefore we can use intron sequence to increase expression in eukaryotic vectors in immunotherapy. Base of previous studies, this high expression effect is related to the increase of mRNA stability.

OVERCOMING BIOLOGICAL BARRIERS OF TARGETED TUMOR THERAPY USING ULTRASOUND-RESPONSIVE DRUG LOADED NANOPARTICLES

Natalya Rapoport

University of Utah, Salt lake City, Utah 84112, USA

We have recently developed multifunctional nanoparticles that combine properties of tumor-targeted drug delivery vehicles and ultrasound and fluorine MRI contrast agents. The particles comprise perfluorocarbon nanoemulsions stabilized with the shells formed by biodegradable amphiphilic block copolymers. Lipophilic drugs such as paclitaxel (PTX) or hydrophobized doxorubicin (DOX) are loaded into the internal hydrophobic blocks of nanodroplet shells. Under the action of therapeutic ultrasound, nanodroplets convert into microbubbles in a process called acoustic droplet vaporization (ADV). Ultrasound-induced cavitation of microbubbles formed via ADV triggers drug release from nanodroplets and enhances drug release from other carriers (e.g. micelles or liposomes), which makes drug loaded nanodroplets excellent vehicles for ultrasound-mediated drug delivery.

Image-guided therapy is a promising route to personalized medicine, with patient's treatment being programmed based on the information obtained by imaging technique. Among various imaging modalities, ultrasonography is the most accessible and cost effective. In addition, ultrasound imaging provides real time information (though loses in resolution to MRI or CT). Due to large differences in acoustic impedances between water or tissue and perfluorocarbon, nanodroplets generate ultrasound contrast at localization site, which allows monitoring drug carrier biodistribution with ultrasound imaging. In addition, some perfluorocarbons generate strong ^{19}F NMR peak, which allows complementary MRI monitoring of nanodroplet biodistribution.

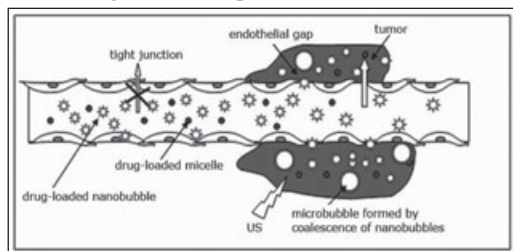


Figure 1. Schematic presentation of ultrasound-mediated drug delivery. Encapsulated drug is injected systemically. After carrier accumulation in tumor, ultrasound is applied in order to release drug and enhance the intracellular uptake of both released and encapsulated drug.

ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Ideal tumor-targeted drug delivery system for ultrasound-mediated drug delivery should satisfy following requirements: Stability in Circulation; drug retention; long circulation time for effective tumor accumulation; size that allows extravasation; and ultrasound responsiveness. These requirements are satisfied by perfluorocarbon nanoemulsions.

Due to a nanoscale size (300-500 nm) and PEG coating, nanodroplets effectively accumulate in vascularized tumors after systemic injections. Anticipated mechanism of ultrasound-mediated drug delivery in nanoemulsions is schematically shown in Figure 1. A scheme of tumor sonication experiments is presented in Figure 2. *In vivo* experiments showed that without ultrasound, drug (PTX) was tightly retained by circulating nanodroplets and was released locally into the tumor under the action of tumor-directed ultrasound (Figure 3). With this treatment modality, dramatic tumor regression was observed in mouse models of breast, ovarian, and pancreatic cancer as exemplified in Figures 4 and 5. Using red fluorescence protein (RFP) transfected tumor cells allowed *in vivo* visualization of tumor cell killing and shed light on the mechanisms involved in ultrasound-mediated nanochemotherapy (Figure 6).

Mechanism of ultrasound action is associated with ultrasound effect on the biological barriers – tumor microvasculature, plasma membranes, nuclear membranes. Corresponding examples will be provided.

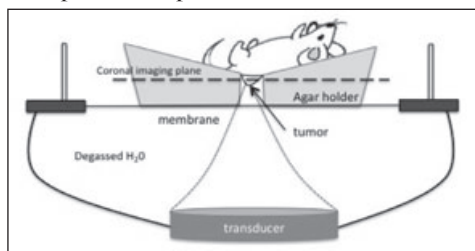


Figure 2. Scheme of the tumor sonication experiments.

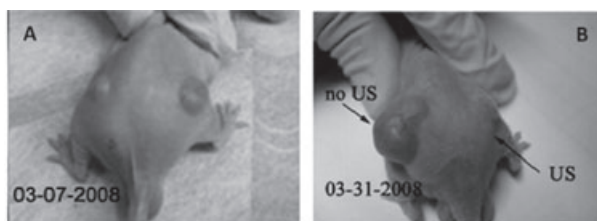


Figure 3. A mouse was treated by four systemic injections of nanodroplet encapsulated PTX, nbGENPFP (20 mg/kg as PTX) given twice weekly; only one (the right) tumor was sonicated (1-MHz CW ultrasound at a nominal output power density 3.4 W/cm², exposure duration 1 min; ultrasound was delivered 4.5 hours after the injection of the drug formulation).

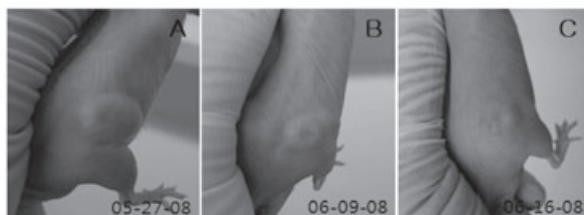


Figure 4. Effective regression of the ovarian carcinoma tumor treated by systemic injections of the nanodroplet formulation of PTX, nbGENPFP and unfocused ultrasound. The first photograph was taken before the start of the treatment.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

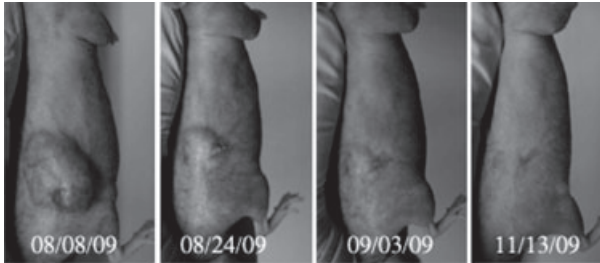


Figure 5. Dramatic regression of breast cancer MDA MB231 tumor treated by PTX-loaded PFCE nanoemulsion and focused 1-MHz CW ultrasound at a rarefactional pressure of 1.74 MPa.

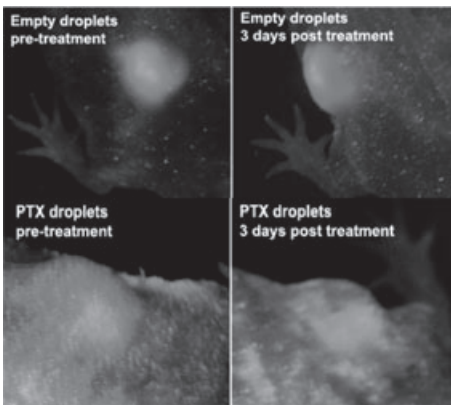


Figure 6 A. Subcutaneous pancreatic tumors transfected with red fluorescence protein (RFP) were systemically injected with empty (i.e. not drug loaded) or paclitaxel (PTX) loaded nanodroplets and sonicated by focused ultrasound delivered in a 4-mm circle. Cell death was observed only for drug-loaded nanodroplets.

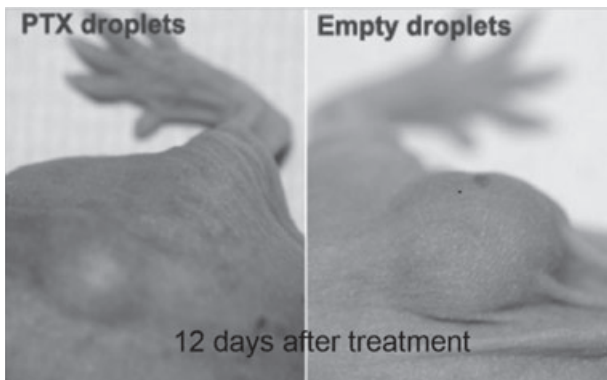


Figure 6B. Tumor sizes of the mice presented in Figure 6A. Photographs were taken 12 days after the treatment.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ МОЛЕКУЛ АЛЬБУМИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ ЗОЛОТА И КРЕМНИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА ФОТОННО-КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Апенкова К.А., Гибизова В.В., Федорова К.В.

*Физический факультет МГУ имени М.В.Ломоносова
vika2000-05@mail.ru*

В современной медицине для диагностики и лечения различных заболеваний в организме человека, в том числе и онкологических, используются наночастицы кремния и золота.

В связи с этим особенно важным представляется исследование механизма взаимодействия наночастиц кремния и золота с основными белками сыворотки крови (альбумина и γ -глобулина). [1, 2]

Метод динамического рассеяния света позволяет определить молекулярную подвижность и размеры рассеивающих частиц в водных растворах. В этом методе исследуется корреляционная функция флуктуаций интенсивности рассеянного света, обусловленных броуновским движением частиц раствора. При этом могут быть определены коэффициенты трансляционной диффузии и гидродинамические радиусы рассеивающих частиц.[3, 4]

В данной работе были получены концентрационные зависимости коэффициента трансляционной диффузии и гидродинамического радиуса в водных растворах белка альбумина с добавлением наночастиц золота и кремния при различных значениях рН (рН 5.5 – изоэлектрическая точка для белка альбумина, рН 7.4 – средний водородный показатель крови человека).

На основе полученных результатов были сделаны выводы об отсутствии взаимодействия между исследуемыми наночастицами и молекулами белка альбумина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М. “Сильные электростатические взаимодействия заряженных биополимеров в водных растворах”// Биомедицинская радиоэлектроника, 2000г., №3.
2. Петрусевич Ю.М., Петрова Г.П. “Сильные электростатические взаимодействия в растворах заряженных биополимеров”// Биомедицинская радиоэлектроника, 2000, №3, С. 41-47.
3. Камминс Г., Пайк Э. «Спектроскопия оптического смешения и корреляция фотонов»// М., Книжный дом «Университет», 2002.
4. Петрова Г.П., Петрусевич Ю.М., Тен Д.И. “Образование дипольных комплексов в растворах с малой концентрацией ионов тяжелых металлов: диагностика методом лазерного светорассеяния”// Квантовая электроника., 2002, 32, №10.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

INVESTIGATION OF INTERACTION OF ALBUMIN'S MOLECULES WITH NANOPARTICLES OF GOLD AND SILICON IN SOLUTION OF WATER BY PHOTON CORRELATION SPECTROSCOPY

Anenkova K.A., Gibizova V.V., Fedorova K.V.

Faculty of Physics, M.V. Lomonosov Moscow State University

In modern medicine to diagnose and treat widespread diseases including oncological, are used various nanomolecules, in particular particles of gold and silicon. Gold is applied to diagnostics and treatment malignant tumours.

Besides traditional chemotherapy exist and actively develop new methods based on introduction in a tumoral fabric gold nanocapsules. Biocompatibility of silicon with living tissues along with property of its fast deducing from an organism allows to use nanomolecules of silicon as photosensitizers for photodynamic therapy of a cancer.

Therefore it is represented especially important to investigate mechanisms of interaction of these nanomolecules with molecules of albumin's fiber, one of which basic functions is transport of various substances.

ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ПРОЦЕССА РАЗЛОЖЕНИЯ ПЛЕНОК ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА И ЕГО КОМПОЗИТОВ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ

Багров Д.В.¹, Бонарцев А.П.¹, Босхонджиев А.П.², Махина Т.К.², Мышкина В.Л.², Филатова Е.В.², Яковлев С.Г.², Воинова В.В.¹, Бонарцева Г.А.², Шайтан К.В.¹

¹ Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова, кафедра биоинженерии

² Институт биохимии имени А.Н.Баха РАН, dbagrov@gmail.com

Поли-3-гидроксибутират (ПГБ) и другие полимеры из класса полигидроксиалканоатов являются перспективными материалами в современной медицине и фармакологии. В данной работе были исследованы пленки из ПГБ и композитные пленки из ПГБ с лекарственными веществами (ЛВ). Методом атомно-силовой микроскопии (АСМ) было показано, что при ферментативном разложении пленки *in vitro* происходит увеличение ее шероховатости, а при ее разложении *in vivo* происходит дополнительное структурирование поверхности. Были приготовлены пленки из ПГБ, содержащие различные ЛВ (левофлоксацин, индометацин, флурбипрофен). При хорошей совместимости ЛВ с полимером, как в случае индометацина, добавление лекарства слабо влияет на шероховатость и особенности структуры поверхности. Быстрый выход ЛВ из полимера не всегда является следствием его кристаллизации на поверхности пленки.

Спектр применений поли-3-гидроксибутирата (ПГБ), а также композитов на его основе и аналогичных ему полимеров полигидроксиалканоатов в медицине непрерывно расширяется. Полигидроксиалканоаты могут применяться в качестве шовных материалов, материалов для изготовления стентов и матриц для тканевой инженерии, для покрытия имплантируемых изделий и в ряде других приложений [1,2]. Ранее были описаны системы на основе ПГБ для пролонгированного контролируемого высвобождения лекарств: дипиридамола, индометацина [3], фурацилина [4].

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

В данной работе были исследованы пленки из ПГБ и композиты из ПГБ с лекарственными веществами: левофлоксацином, индометацином, флурбипрофеном, – при их исследовании решались две задачи. Во-первых, исследовались изменения, происходящие на поверхности пленки в ходе ее ферментативного разложения. Во-вторых, исследовалось влияние лекарственных веществ на морфологию поверхности пленок ПГБ.

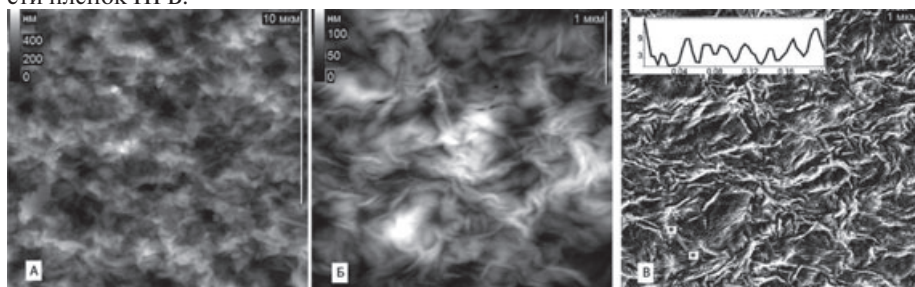


Рис.1. (А) – шероховатая сторона контрольной пленки ПГБ, топографическое изображение. (Б) – гладкая сторона контрольной пленки ПГБ, топографическое изображение. (В) – гладкая сторона контрольной пленки ПГБ, фазовое изображение. Представлены график сечения вдоль линии между двумя звездочками на кадре (В).

Для изучения изменений структуры поверхности в ходе разложения использовались пленки ПГБ молекулярной массы 950 ± 25 кДа толщиной 42 ± 7 мкм. Они были приготовлены методом полива и формования на стеклянной поверхности из раствора полимера в хлороформе в чашке Петри. При этом получались пленки с существенно различающимися по шероховатости сторонами: сторона, обращенная к стеклу, оказывалась существенно более гладкой, чем сторона, имевшая контакт с воздухом. АСМ-изображения обеих сторон представлены на рисунке 1 – существенное различие между поверхностями типично для пленок, приготовленных методом полива. На гладкой стороне различимы ламели шириной от 7 до 40 нм, ориентированные на ребре (edge-on) – такая ориентация ламелей типична для пленок достаточно толстых (толщина $h \sim 100$ нм и более) пленок.

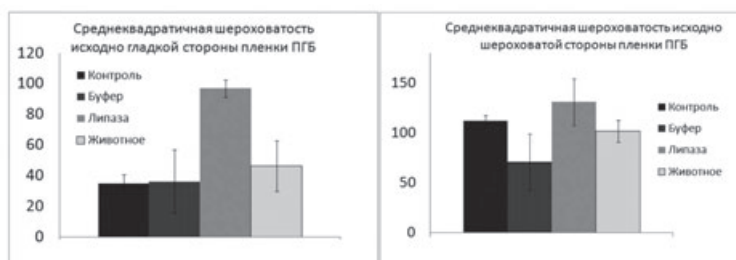


Рис.2. Значения шероховатости исходно гладкой (слева) и исходно шероховатой (справа) поверхности пленки ПГБ.

На рисунке 2 сопоставлены значения среднеквадратичной шероховатости для четырех пленок: контрольной пленки ПГБ, пленки, подвергавшейся ферментативному разложению панкреатической липазой (концентрация липазы 10 мг/мл) в течение 83 суток, пленки, находившейся в Tris-буфере (рН 7,7) в течение 83 суток, а также пленки, имплантированной под кожу крысе (Вистар) на 90 суток. Видно, что инкубирование пленки с липазой существенно увеличивало шероховатость гладкой

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

стороны, а на другую (исходно шероховатую сторону) процесс разложения повлиял сравнительно слабо. На пленке, которая инкубировалась в присутствии липазы, и на пленке, которая находилась в буфере, не удалось получить изображения ламелей — доля аморфного полимера на поверхности возрастала.

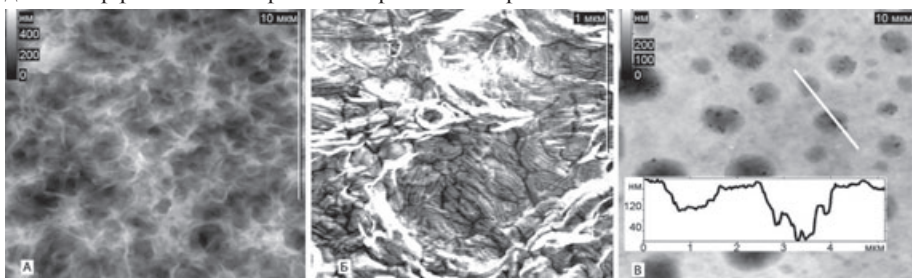


Рис.3. (А) – шероховатая сторона пленки ПГБ, имплантированной животному, (В) – фазовое изображение, на котором видна ламеллярная структура. (С) – изображение поверхности с углублениями на гладкой стороне пленки.

На поверхности пленки, которая была имплантирована животному, наблюдалось дополнительное структурирование — на ее исходно гладкой поверхности возникли углубления, причем они не мешали возможности наблюдения поверхностных ламелей. Эти углубления на 100–200 нм имели латеральный размер 0,5–2,5 мкм, пространство между ними имело структуру, похожую на структуру контрольной пленки ПГБ. На более шероховатой стороне удалось получить изображение ламелей (рисунок 3). При этом все пленки, за исключением обработанной в липазе, имеют существенную разницу между морфологией сторон.

Описанные эксперименты позволяют сделать следующие выводы: при ферментативном разложении *in vitro* кристалличность поверхности пленки ПГБ уменьшается, а при разложении *in vivo* она может сохраняться. При разложении пленки *in vivo* не наблюдается структурирование поверхности, а рост ее шероховатости не является необходимым условием процесса разложения.

Композиты из ПГБ с лекарственными препаратами были приготовлены с использованием ПГБ молекулярной массы 510 ± 15 кДа. Из трех исследованных лекарственных веществ левофлоксацин и флурбипрофен быстро высвобождаются из пленки (приблизительно за 2 суток — наблюдается «взрывной эффект» высвобождения), а индометацин высвобождается медленно (на протяжении 22–28 суток). Пленки ПГБ/индометацин и ПГБ/флурбипрофен имели морфологию поверхности, аналогичную морфологии контрольной пленки ПГБ. В то же время, на поверхности пленки ПГБ/левофлоксацин наблюдались микрокристаллы, которые легко удалялись при отмывке водой — они были интерпретированы как кристаллы левофлоксацина (рисунок

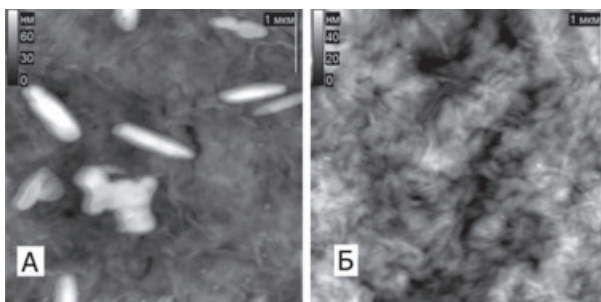


Рис.4. Пленка ПГБ/левофлоксацин до (А) и после (Б) отмывки водой.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

4). Таким образом, было показано, что при низкой совместимости лекарственного вещества с полимером оно кристаллизуется на его поверхности, однако в общем случае это не является необходимым условием быстрого высвобождения лекарства из пленки.

Работа выполнена в рамках реализации ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы (ГК П717, П548, П1351).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chen, G.-Q., Wu, Q. // *Biomaterials*, 2005, vol. 26, no. 33, pp. 6565–6578.
2. A.P. Bonartsev, V.L. Myshkina, D.A. Nikolaeva, E.K. Furina, T.A. Makhina, V.A. Livshits, A.P. Boskhomdzhiiev, E.A. Ivanov, A.L. Iordanskii, G.A. Bonartseva // *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, Ed. M ndez-Vilas A., Formatex, Spain, 2007, V.1, 295-307.
3. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Лучинина Е.С., Лившиц В.А., Босхомджиив А.П., Маркин В.С., Иорданский А.Л. // *Прикладная биохимия и микробиология*, 2006, Т. 42, №6, 710-715.
4. Косенко Р.Ю., Иорданский А.Л., Маркин В.С., Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А. // *Химико-фармацевтический журнал*, 2007, Т. 41, No. 12, 27–30.

THE STUDY OF STRUCTURE AND DEGRADATION PROCESS OF POLY(3-HYDROXY BUTYRATE) AND POLY (3-HYDROXY BUTYRATE)-BASED COMPOSITE SYSTEMS WITH DRUGS

Bagrov D.V.¹, Bonartsev A.P.¹, Boskhomdzhiiev A.P.², Makhina T.K.², Myshkina V.L.², Filatova E.V.², Yakovlev S.G.², Voinova V.V.¹, Bonartseva G.A.², Shaitan K.V.¹

¹ *Lomonosov Moscow State University, Faculty of biology, Chair of bioengineering*

² *Bakh Institute of Biochemistry, Russian Academy of Sciences*
dbagrov@gmail.com

Poly(3-hydroxybutyrate) (PHB) and other poly(hydroxy alcanoates) are prospective materials for modern medicine and pharmacology. In the current work PHB films and PHB-based composites with drugs were studied by atomic force microscopy (AFM). It was shown that in vitro enzymatic degradation of a PHB film is accompanied by an increase in surface roughness, and during in vivo degradation surface heterogeneity emerges. PHB-based films containing various drugs (levofloxacin, indometacin, flurbiprofen) were made. When the drug has a good compatibility with the polymer, it doesn't influence on the roughness and the morphology of the film. Burst-effect is not always caused by the crystallization of the drug on the surface of the film.

ВОЗМОЖНОСТИ КОГЕРЕНТНОЙ ФАЗОВО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ В ДИАГНОСТИКЕ НАРУШЕНИЙ ТРОМБОЦИТАРНОГО ЗВЕНА ГЕМОСТАЗА У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ

Василенко И.А., Матвеева А.В., Кастрикина И.С., Быченков О.А., Бабакова С.В., Метелин В.Б.

*Филиал ГОУ ВПО РГМУ Росздрава «Научно-клинический центр геронтологии»,
svia@rambler.ru
МОНИКИ им. М.Ф.Владимирского*

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Онкологические заболевания занимают второе место в структуре общей заболеваемости Российской Федерации. При этом наиболее часто они развиваются в возрасте 60–70 лет. По мере старения развивается гиперкоагуляция и тормозится фибринолиз [1]. Это связано с известными биологическими закономерностями, согласно которым на позднем этапе жизни происходят не только изменения сосудистой стенки, но и нарушается баланс между про- и антикоагулянтами, а также компонентами фибринолитической системы крови [2, 3].

Исследование механизмов тромбообразования и метастазирования в онкологической практике убедительно показало важную роль тромбоцитов в этих процессах. Циркуляция в кровеносном русле онкологических больных большого количества тромбопластинного фактора и специфических прокоагулянтов, активация перекисного окисления липидов, влияние окислительного стресса и лучевой терапии оказывает негативное воздействие на тромбоцитарное звено гемостаза путем повреждения белкового слоя мембран тромбоцитов, что может стать причиной их активации и провоцировать развитие тромбогенных осложнений [4]. Активированные тромбоциты создают благоприятные условия для метастазирования опухолевых клеток. Следовательно, зная степень активации тромбоцитов можно прогнозировать резервные возможности биологических систем организма конкретного пациента, готовность компенсировать предполагаемые нагрузки, просчитать риск развития осложнений, начать их коррекцию и профилактику задолго до появления угрожающих жизни клинических признаков.

Исследование и коррекция системы гемостаза имеют принципиальное значение для улучшения качества жизни и снижения смертности у онкологических больных пожилого и старческого возраста. Поэтому актуальными и важными являются изучение морфофункционального состояния тромбоцитарного звена гемостаза. Однако в настоящее время внутрисосудистая агрегация тромбоцитов, хотя и представляет большой практический интерес, изучена недостаточно, не разработаны подходы, позволяющие определить степень на эти клетки крови. Существующие на сегодняшний день скрининговые методы исследования системы гемостаза направлены на определение активности плазменных факторов свертывания крови, но не учитывают состояние сосудисто-тромбоцитарного звена.

Цель настоящего исследования – оценить особенности морфофункционального состояния тромбоцитов у больных разных возрастных групп со злокачественными опухолями ротовой полости.

Объекты, материал и методы исследования

Обследовано 30 пациентов среднего и пожилого возраста со злокачественными опухолями ротовой полости (ЗОРП), находившихся на лечении в отделении радиологии МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского (Таблица 1).

СТРУКТУРА РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ОБСЛЕДОВАННОГО КОНТИНГЕНТА		
Клинические группы	Количество больных	
	ЗОРП 1-2 стадия	ЗОРП 3-4 стадия
Пациенты с ЗОРП среднего возраста (45-60) лет	6	7
Пациенты с ЗОРП пожилого возраста (60-75) лет	7	10

Группу сравнения составили 30 практически здоровых добровольцев, сопоставимых по полу и возрасту с группами пациентов ЗОРП.

Морфофункциональное состояние тромбоцитов периферической крови исследовали в режиме реального времени методом витальной фазово-интерференционной

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

микроскопии на базе отечественного компьютерного лазерного фазово-интерференционного микроскопа (КФМ) «Цитоскан» (МГИРЭА, Москва), представляющего собой модифицированный интерферометр Линника с модуляцией фазы опорной волны.

В основе принципа действия микроскопа, содержащего идентичные объективы в сигнальном и реперном плечах, лежит сравнение волнового фронта, прошедшего через объект, с опорным, отраженным от высококачественного зеркала. Преобразование сигнала состоит в его дискретизации с последующей записью распределения фаз в виде цифровой матрицы x, y , размером $m \times n$, где m – число строк, n – число столбцов. Значения x, y представляют собой оптическую толщину объекта H в точке с координатами x, y :

$$H(X, Y) = [n(x, y) - n_c] h(x, y),$$

где $n(x, y)$ – показатель преломления, $h(x, y)$ – физическая толщина в направлении Z , n_c – показатель преломления среды.

Результат обратного преобразования цифрового массива в видимое изображение и восстановление фазового портрета объекта отображался на экране монитора компьютера.

Источником света является гелий-неоновый лазер ($\lambda = 633$ нм). Основные параметры КФМ: объектив 30X, общее увеличение системы 500X, точность измерения по высоте 0,5 нм, по полю – 20,0 нм; дискретность изображения 128X128, при минимальном размере пиксела – 3 нм. Микроскоп обладает разрешением, незначительно уступающим растровому электронному микроскопу, и позволяет регистрировать параметры биологических объектов, не подвергавшихся предварительной фиксации или окрашиванию.

Для приготовления плазмы, обогащенной тромбоцитами, кровь центрифугировали при 1000 об/мин в течение 5 минут. Взвесью клеток заполняли камеру Горяева, рабочая поверхность которой имела зеркальное напыление. После 3-5 минутного интервала, необходимого для оседания клеток, производили сканирование изучаемых цитообъектов. Оптимальный объем выборки составлял 50-100 клеток.

Статистический анализ проводили с помощью алгоритмов среды MatLab и математического пакета «Statistica 6». Различия между сравниваемыми группами рассчитывали по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни. Уровень значимости устанавливался равным 0,05.

Результаты исследования

В образцах крови идентифицировали 4 морфологических типа тромбоцитов, характеризующих ту или иную степень их активации. Основой для дискриминации структурно измененных тромбоцитов служили различные варианты их формы, характера рельефа поверхности, наличие псевдоподий, их количество и величина. (Рис.1).

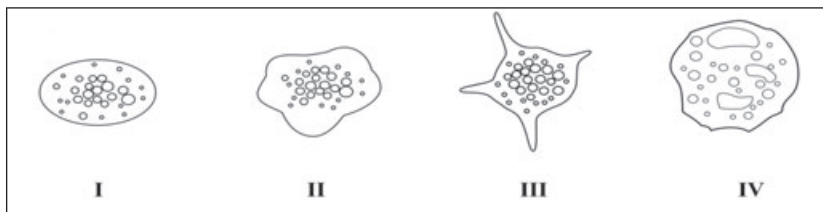


Рис.1 Схематическое изображение морфофункциональных типов тромбоцитов периферической крови: I – тромбоцит «покоя»; II – тромбоцит с низким уровнем активности; III – высоко активированный тромбоцит; IV – дегенеративно-измененный тромбоцит.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Установлено, что в группе здоровых добровольцев соотношение морфологических типов (1:2:3:4) тромбоцитов у лиц среднего возраста составляет 58,3:33,8:5,6:1,3%, а в пожилом возрасте - 56,2:36,8:6,6:1,3%, соответственно.

В таблице 2 представлены результаты оценки морфологической структуры циркулирующей популяции тромбоцитов у обследованных пациентов.

Таблица 2

Клинические группы		Содержание (%)			
		1 тип	2 тип	3 тип	4 тип
Средний возраст	Больные с ЗОРП (1-2 стадия)	26,7±2,7	50,7±3,6	21,3±1,9	1,3±0,2
	Больные с ЗОРП (3-4 стадия)	32,1±3,1	44,2±4,1	22,2±2,1	1,7±0,3
Пожилой возраст	Больные с ЗОРП (1-2 стадия)	24,6±2,5	42,1±3,5	30,1±2,5	3,3±0,3
	Больные с ЗОРП (3-4 стадия)	32,7±1,9	39,8±3,1	25,1±1,6	2,3±0,2

При сравнении соотношения морфологических типов тромбоцитов периферической крови пациентов с ЗОРП среднего возраста обращает на себя внимание резкое увеличение числа активированных тромбоцитов – клеток с начальной (1,5 и 1,3 раза) и высокой степенью активации (3,8 и 4,0 раза), а также снижение тромбоцитов «покоя» (в 2,2 и 1,8 раза) на ранних и поздних стадиях заболевания. Кроме того, для 3-4 стадии ЗОРП характерна тенденция к увеличению числа дегенеративных клеток.

В пожилом возрасте различия между активационными показателями тромбоцитов больных с ЗОРП в зависимости от стадии аналогичны

результатам пациентов среднего возраста: наблюдается увеличение активных форм тромбоцитов, снижение числа тромбоцитов покоя, увеличение дегенеративных клеток.

В таблице 3 представлены средние данные оптико-геометрических показателей

Таблица 3

Клинические группы		Диаметр (D), мкм	Периметр (P), мкм	Высота (H), мкм	Площадь (S), мкм ²	Объем (V), мкм ³
Средний возраст	Здоровые добровольцы	2,86±0,68*	8,44±2,36*	1,03±0,38	4,67±2,60*	1,90±1,12
	Больные с ЗОРП	3,45±0,29	10,2±1,0	1,28±0,37	6,6±1,17	3,25±0,72
Пожилой возраст	Здоровые добровольцы	2,96±0,71	8,68±2,32	1,04±0,36	5,17±2,81	2,20±1,37*
	Больные с ЗОРП	3,25±0,27	9,8±0,8	1,2±0,17	5,9±1,03	2,88±0,73

рических показателей (диаметра, периметра, оптической высоты, площади и объема) циркулирующих тромбоцитов периферической крови в группах среднего и пожилого возраста.

Анализ морфометрических параметров циркулирующих тромбоцитов у онкологических больных показал, что средние в циркулирующей популяции размерные показатели клеток достоверно превышали нормативные значения. Так, у больных среднего возраста диаметр, периметр, высота, площадь и объем тромбоцитов были увеличены на 17,0 17,3, 19,5, 29,2 и 41%.

Изменения средних в циркулирующей популяции размерных показателей клеток у пациентов пожилого возраста имели аналогичный характер: диаметр, периметр, высота, площадь и объем тромбоцитов на 8,9, 11,4, 13,3 и 12,3 и 23,6% превышали показатели нормы.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

Представленные результаты свидетельствуют, что на морфофункциональное состояние сосудисто-тромбоцитарного звена гемостаза оказывают непосредственное влияние возраст пациентов и стадия ЗОРП. Использование компьютерной фазово-интерференционной микроскопии обеспечивает достаточную степень объективности и информативности при характеристике выявленных изменений тромбоцитарного звена гемостаза, может способствовать улучшению диагностики и оценки тяжести патологического процесса.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Muscari A., De Pascalis S., Cenni A. et al. Determinants of mean platelet volume (MPV) in an elderly population: Relevance of body fat, blood glucose and ischaemic electrocardiographic changes // *Thromb. Haemost.*—2008.—Vol. 99, № 6.—P.1079-1084.
2. Баркаган З.С. Момот А.П. О мониторинговании антикоагулянтной терапии у больных пожилого и старческого возраста // *Клиническая геронтология*.2000.Т. 6, № 3-4.С.47-53.
3. Момот А.П. Патология гемостаза. Принципы и алгоритмы клинико-лабораторной диагностики. СПб.: ФормаТ., 2006. — 208 с.
4. Шишло Л.М., Шамов Е.В., Александрова Е.Н., Прохорова В.И. Действие опухолевых клеток карциномы шейки матки на тромбоциты человека. *Онкологический журнал*,—2008—Т.2, №3(7).—С.1-5.

THE POSSIBILITY OF COHERENT PHASE-INTERFERENCE MICROSCOPY IN DIAGNOSIS OF PLATELET DAMAGES IN ONCOLOGIC PATIENTS

Vasilenko I.A., Matveeva A.V., Kastrikin I.S., Bichenkov O.A., Babakova S.V., Metelin V.B.

*Scientific clinical center of gerontology,
Moscow regional scientific research clinical institute named M.F.Vladimirsky,
svia@rambler.ru*

We attempted to evaluate the damages of platelet hemostasis in oncologic patients in real time using vital computer coherent microscopy. The distinct correlation between the level of platelet activity, cancer stage and metastases were found out.

НАНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ

**А.А. Вазина^{1,3}, А.А. Васильева¹, А.В. Забелин³, Н.Ф. Ланина¹,
Е.И. Маевский¹, В.Н. Корнеев², Г.Н. Кулипанов⁴, Т.А. Куприянова⁵,
В.П. Летягин⁶, В.Г. Станкевич³, А.Л. Черняев⁷**

¹ *Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Пущино*

² *Институт биофизики клетки РАН, Пущино*

³ *РНИЦ «Курчатовский институт», Москва*

⁴ *Институт ядерной физики им. Г.И. Будкера СО РАН, Новосибирск*

⁵ *Институт общей и неорганической химии РАН, Москва*

⁶ *Российский онкологический научный центр им. Н.Н. Блохина, Москва*

⁷ *Институт пульмонологии МЗ РФ, Москва*

vazina@iteb.ru

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Выяснение структурного механизма функциональной активности биологических систем является центральным вопросом современной биофизики. Медицинская диагностика — одна из главных задач современной структурной биологии, основывается на изучении характера отклонений от нормы различных биологических структур при заболеваниях и врожденных патологиях. Несмотря на громадные успехи современной молекулярной и клеточной биологии, структурная биология живых тканей выпала из поля зрения исследователей прошлого века, не имевших в своем арсенале экспериментальных подходов. Клетки ткани погружены в межклеточный матрикс, состоящий из тканеспецифичных фибриллярных белков (коллаген и эластин) и основного вещества протеогликановой природы, в котором полисахаридные цепи ковалентно связаны с белковым кором. Гигантские молекулы протеогликанов формируют наноструктурный каркас, являющийся пластическим барьером, экранирующим клетки ткани от внешних воздействий, обеспечивая тем самым структурные основы гомеостаза. Гетерогенность полисахаридов по составу, длине, величине электрического заряда и степени разветвленности усложняет применение многих физических методов, созданных для работы с гомогенными системами, таких как седиментация, электрофорез, хроматография, светорассеяние и др. Мощный арсенал генетических методов в случае полисахаридов не столь полезен, как в исследовании белков и нуклеиновых кислот, т.к. зависимость структуры полисахаридов от генов не является прямой. Из-за малой концентрации (менее 1%) протеогликанов в межклеточном матриксе неадекватными оказались также традиционные малоугловые рентгendifракционные методы, успешно использованные для исследования некоторых биологических тканей, таких, как мышца, нервные волокна, волосы и др., высокая упорядоченность которых регистрируется в нанометровом диапазоне 1-100 нм.

Описание структурных особенностей биологических полимеров в наномасштабной шкале открывает принципиально новые возможности в структурных исследованиях живых систем. Метрические и топологические свойства физического пространства и поля, в которых образуются и существуют нанобъекты, обуславливают их функциональные особенности. Концептуальная революция в области изучения наноструктурированных ансамблей обусловлена в свою очередь инструментальной революцией, связанной с развитием структурных методов на основе использования интенсивного синхротронного излучения электронных ускорителей. Нами были предложены подходы и создана экспериментальная техника, пригодная для нового направления исследований — структурной биологии ткани, а именно, методы скоростной малоугловой дифрактометрии с временным разрешением, которые позволяют проводить неинвазивные исследования функциональной динамики непосредственно в живой ткани. Методические разработки основаны на достижениях в области высоких технологий с использованием синхротронного излучения, новой элементной базы микроэлектроники и новых материалов. Удобным индикатором элементного состава нативной ткани в различных физиологических состояниях могут служить также рентгенфлуоресцентные спектры.

В последние годы мы начали широкомасштабные рентгendifракционные и флуоресцентные исследования различных нативных и онкотрансформированных биологических тканей человека и животных с использованием синхротронного излучения. Работы проводятся в Центрах синхротронного излучения Сибири (ИЯФ СО РАН, Новосибирск), Московского региона (РНЦ «Курчатовский институт», Москва) и ESRF (Гренобль, Франция). Практической задачей наших исследований является поиск наноструктурных маркеров, пригодных для диагностики онкологической патологии эпителиальных тканей. Идея об универсальном скрининговом тесте на рак представляется очень привлекательной, поскольку возможность выявления этого заболевания на ранней стадии значительно повышает шансы на эффективность лечения.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

Проблему канцерогенеза следует рассматривать в двух аспектах: в исследовании механизмов трансформации нормальных клеток, инициированной повреждениями в ДНК (мутациями), и этапов прогрессии опухоли – процессов размножения малигнизированных клеток, инвазии и метастазирования, ведущих к появлению злокачественной опухоли. *Согласно Дж. Уотсону, проблема рака состоит не в том, почему он возникает, а в том, почему он возникает не так уж часто. Почему наш организм не переполнен непрерывно появляющимися мутантными клонами, имеющими селективное преимущество перед нормальными клетками? Организация структуры интактной ткани, своего рода тюрьмы для собственных клеток и их потомства, способствует тому, чтобы клетки оставались в пределах своих территорий.*

Идея об универсальном скрининговом тесте на рак кажется очень привлекательной, поскольку если рак удастся выявить достаточно рано, это повысит шансы на эффективное лечение. В последние годы огромный интерес вызывает скрининг на конкретные виды рака. Для клинической идентификации опухоли важно располагать опухолевыми маркерами. В современной онкологии можно выделить два направления поиска опухолевых маркеров. Первое, наиболее широко распространенное, сосредоточено на выявлении определенных химических веществ, секретируемых опухолью, которые приводят к появлению генерализованных симптомов. Обычно такими маркерами являются белки, которые продуцируются опухолевой клеткой или синтезируются другими клетками, взаимодействующими с опухолевыми.

Второе направление, значительно менее разработанное, основано на поиске структурного маркера. Известно, что до начала развития рака затронутые ткани утрачивают стабильность и выглядят менее упорядоченными по сравнению с нормой. При малигнизации клетки каких-либо заметных нарушений в течение довольно длительного времени не заметно. Скорость этого процесса зависит от многих факторов. Необходимо создание методов структурного исследования интактных тканей в норме и при патологии.

Мы были пионерами в использовании синхротронного излучения для структурных исследований тканей и слизей. Было обнаружено, что рентгенограммы нативных слизей демонстрируют в наноразмерном диапазоне от 10 до 0.4 нм серию острых дебаевских колец с основным периодом 4.65 нм. Подобные дифракционные картины были получены и от различных эпителиальных тканей человека и животных. *Выявлено, что период повторяемости 4.65 (± 0.15) нм является наноразмерным инвариантом структуры и слизей, и биологических тканей. Наноструктурный инвариант атрибутирован нами как период идентичности, обусловленный регулярным прикреплением полисахаридных цепей к белковому кору гигантской молекулы протеогликанов слизи и межклеточного матрикса тканей.*

Выявлена корреляция между интегральной интенсивностью рентгенограмм и элементарным содержанием тканей; кальций является доминирующим элементом в минеральном составе ткани. Экспериментально показано, что структура протеогликанов может быть обратимо трансформирована катионами металлов и хелатирующими агентами.

Были выявлены принципиальные различия взаимодействия катионов металлов с различными компонентами тканей: если присоединение металлов к белковым компонентам цитоскелета может быть *изоморфным*, то связывание катионов металлов с полианионами протеогликанов межклеточного матрикса *меняет конформацию* полисахаридных цепей, другими словами, изоморфные производные протеогликанов с катионами металлов в принципе не могут быть получены. Поэтому соли различных металлов и хелатные соединения следует рассматривать как уникальный инструмент исследования особенностей *структурной динамики протеогликанов* под воздействием различных эндогенных и экзогенных факторов. Обнаружена высокая температурная стабильность протеогликановых структур различной природы.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Проведены исследования эпителиальных тканей молочной железы и респираторного тракта при онкологической трансформации. На обширном экспериментальном материале тканей молочной железы на разных стадиях патологии выявлены значительные изменения элементного содержания, обнаружено многократное, до 200 раз, увеличение концентрации кальция. Минерализация ткани приводит к существенным изменениям дифракционной картины. Интенсивность диффузного рассеяния и дифракционного кольца 4.5 нм варьирует в широком интервале и коррелирует с изменением содержания кальция в пораженных тканях. Финальная стадия патологического процесса характеризуется значительными изменениями рентгеновской картины тканей: все дифракционные кольца исчезают, а малоугловое диффузное рассеяние значительно увеличивается. Обработка ткани хелатирующими агентами, такими как ЭГТА и ЭДТА, в этом случае оказалась неэффективной. Необратимость этого процесса свидетельствует о необратимости структурной трансформации протеогликановых структур, сопряженной с нарушением клеточных взаимодействий, вызванных процессами как эндогенной, так и экзогенной природы, что, по-видимому, является основой патологических явлений в тканях.

Обсуждается роль минерализации протеогликанового каркаса межклеточного матрикса ткани в процессах нарушения структурного гомеостаза ткани, в частности, при инвазии и метастазировании. Деструкция межклеточного матрикса ткани может быть причиной ослабления клеточной адгезии, что повышает вероятность того, что мутантные клетки выйдут из тканевого плена и будут свободно мигрировать в организме. Проникновение канцерогенно-трансформированных клеток в другие ткани вызывает взрыв метастазирования.

Мы полагаем, что стабильность структуры протеогликанового каркаса может быть интерпретирована в терминах физики полимерных сеток. Температура плавления статистически связанных полимеров гораздо более чувствительна к незначительному изменению плотности поперечных сшивок, чем к их химической природе. Протеогликановые системы, по-видимому, можно рассматривать, как полидентантные лиганды, обеспечивающие хелатирующий эффект: их комплексы с Са характеризуются высоким коэффициентом устойчивости. Таким образом, катионы Са могут формировать статистические поперечные сшивки с отрицательно заряженными карбоксильными и сульфатными группами, вызывая изменения в конформации полисахаридных цепей и вовлекая их в формирование трехмерной сетки.

Взаимодействие протеогликанов с катионами можно рассматривать как фактор, обеспечивающий модификационную адаптацию организма к широкому диапазону экзогенных и эндогенных воздействий. Спектр элементного содержания и дифракционная картина ткани могут служить биомаркерами и использоваться для диагностических и терапевтических целей.

Работы выполняются при поддержке грантов РФФИ № 09-04-92663 и 09-05-00926.

NANOSTRUCTURAL STUDY OF TUMOR EPITHELIAL TISSUES USING SYNCHROTRON RADIATION

A.A. Vazina^{1,3}, A.A. Vasilieva¹, A.V. Zabelin³, N.F. Lanina¹, E.I. Maevsky¹, V.N. Korneev², G.N. Kulipanov⁴, T.A. Kupriyano⁵, V.P. Letyagin⁶, V.G. Stankevich³, A.L. Chernyaev⁷

¹ Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS, Pushchino

² Institute of Cell Biophysics, RAS, Pushchino

³ Russian Research Center «Kurchatov Institute», Moscow

⁴ Budker Institute of nuclear physics, SD RAS, Novosibirsk

⁵ Institute of General and Inorganic Chemistry, RAS, Moscow

⁶ Blokhin Science Center of Oncology, Moscow

⁷ Pulmonology Institute, MH RF, Moscow

vazina@iteb.ru

Several hundred samples of intact and cancer transformed epithelial tissues were systematically investigated by methods of small-angle X-ray diffraction and fluorescence using synchrotron radiation. A variety of changes in SAXS and elemental content of tumor transformed tissues were observed. In terminal stages of tumor transformation specific density and rigidity of tissue increase, no discrete reflections are observed; increased intensity of diffuse small-angle scattering is displayed. The Ca-content at local sites is increased by hundreds of times, and during such mineralization the nanostructure of proteoglycan fibrils undergoes a sacramental irreversible destruction. X-ray study of tissues indicates that it may be possible to use diffraction characteristics of proteoglycan structures as new and novel markers of pathological transformation of tissues. The role of dynamics of proteoglycan structures in structural homeostasis and modifying adaptation of tissue during temperature changes is discussed in the terms of thermodynamics of polymeric network.

НОВЫЙ КОНЦЕПТУАЛЬНЫЙ ПОДХОД К ХИРУРГИЧЕСКОМУ ЛЕЧЕНИЮ ГЛИОМ БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОБИОТЕХНОЛОГИЙ

Грачёв Ю.Н.

Республиканский научно-практический центр неврологии и нейрохирургии,

г. Минск, Республика Беларусь.

E-mail: lukas55@yandex.ru

Основной метод лечения нейроонкологических больных хирургическое удаление новообразования. При первичных опухолях головного мозга это единственный способ предупредить возникновение необратимых витальных дисфункций и улучшить качество жизни пациента.

Хирургическая тактика при глиомах больших полушарий головного мозга постоянно обсуждается нейрохирургами. Еще нет достоверных доказательств, что объем оперативного вмешательства существенно влияет на выживаемость и качество жизни пациентов с низкодифференцированными глиомами больших полушарий головного мозга, так как соответствующих рандомизированных исследований не было. Сравнение последствий тотального удаления поверхностно расположенных небольших глиом и бессимптомных медиобазальных опухолей некорректно. Грубый неврологический дефицит со снижением качества жизни делают не обоснованным тотальное/субтотальное удаление глиом расположенных глубоко в полушариях головного мозга и распространяющихся к мозолистому телу, желудочкам мозга или подкорковым ядрам. Частичное удаление глубоких опухолей или биопсия для патоморфологической верификации с целью проведения адекватной адьювантной терапии является наиболее целесообразным решением.

В прошлом десятилетии тенденция к выполнению максимально возможного удаления глиом была обусловлена появлением новых технологий визуализации границ опухоли, нейронавигации и ультразвуковой диссекции, картирования моторных, сенсорных и речевых функций. Вышеперечисленные технологические достижения сделали «операбельными» многие, ранее недоступные хирургическому удалению глиомы, а также уменьшили количество послеоперационных осложнений и леталь-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

ность. Однако радикальное хирургическое излечение пациентов с глиомами не было возможным из-за ранней диссеминации неопластических клеток и возникновения новых очагов продолженного роста. В общепринятых стандартах и рекомендациях по хирургическому лечению глиом отражено стремление разрешить извечную дилемму «максимально возможного удаления с минимизацией послеоперационного неврологического дефекта». В большинстве случаев подобная нейрохирургическая тактика уместна и позволяет эффективно уменьшить внутричерепную гипертензию и иметь резерв времени для адьювантной терапии [1].

Применение дополнительного интраоперационного местного воздействия (локальная химиотерапия, брахитерапия) незначительно увеличили длительность безрецидивного периода и выживаемость пациентов. В наших наблюдениях (80 пациентов с супратенториальными глиомами) имплантация цитостатика (цисплатина) в ложе удаленной опухоли для уничтожения возможно оставшихся неопластических клеток блокировала локальный продолженный рост (полный или частичный ответ). Однако возникновение новых очагов опухолевого роста и клинический рецидив заболевания были отмечены у всех пациентов. Данный факт объяснялся тем, что инвазивные опухолевые клетки перифокальной зоны активно не пролиферировали, находились вне гематоэнцефалического барьера и поэтому не отвечали на проапоптотическое (антипролиферативное) воздействие используемого химиопрепарата. При этом они сохраняли способность к инвазии и миграции, что подтверждалось световой микроскопией с обнаружением «сателлитоза» в периваскулярных пространствах и вдоль аксональных миелиновых трактов. Эти микроскопления опухолевых клеток долгое время оставались не доступными для интраоперационной визуализации [2].

В настоящее время для обнаружения и удаления отдельных опухолевых клеток имеются соответствующие биотехнологии. В частности предлагаются материалы, устройства и конструкции на молекулярном или даже атомарном уровне (1-100 нм), которые могут «вылавливать» в организме даже единичные опухолевые клетки и определять пути их «прицельной» миграции.

Многофункциональные наночастицы полиакриламида (40 нм) с молекулами окиси железа и фотосенсибилизатором усиливают отображение глиомы на МРТ, а при лазерном освещении разрушают опухолевые клетки в больших полушариях головного мозга [3]. Наночастицы золота, селективно захваченные неопластическими клетками, усиливают в несколько раз термоэффект лазерного воздействия [4]. Другие наночастицы с магнитными свойствами и способностью к флуоресцентному окрашиванию клеток делают видимыми границы опухоли в инфракрасной части спектра [5]. Квантовые точки (QDs) «высвечивают» отдельные молекулы и визуализируют инвазивные клетки глиом в биоптатах, а также в головном мозге во время проведения операции. [6].

Таким образом, возможность элиминации инвазивных мигрирующих опухолевых клеток, прежде чем они вызовут клинический рецидив заболевания, открывает перспективное ультрамикрочirurgическое направление и новый концептуальный подход к оптимизации хирургического лечения глиом больших полушарий головного мозга.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Стандарты, рекомендации опции в лечении глиальных опухолей головного мозга у взрослых. (2008) А.Н. Коновалов, А.А. Потапов, В.А. Лошаков, и др. НИИ нейрохирургии им. акад. Н.Н. Бурденко РАМН, Москва, Российский нейрохирургический институт им. проф. А.Л. Поленова, Санкт-Петербург.
2. Смянович А.Ф., Короткевич Е.А., Шанько Ю.Г., Лукашейко Ю.Н. Применение цисплатина иммобилизированного на рассасывающемся полимере при локальной химиотерапии супратенториальных глиом головного мозга // Материалы VI Международного симпозиума. – СПб., 2001. – С. 235–236.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

3. Kopelman R, Philbert M, Koo YEL et al.: (2005) Multifunctional nanoparticle platforms for *in vivo* MRI enhancement and photodynamic therapy of a rat brain cancer. *J Magn Magn Mater* 293: 404-410.
4. Лихачев С.А., Лапотко Д.О., Лукашейко Ю.Н. Перспективы лазерных нанобиотехнологий в диагностике и лечении первичных нейроэпителиальных опухолей головного мозга. // *Материалы Всероссийской научно-практической конференции Поленовские чтения*. 11-13 апреля 2009, СПб. – СПб., 2009. – С. 229–230.
5. Trehin R, Figueiredo JL, Pittet MJ et al (2006) Fluorescent nanoparticle uptake for brain tumor visualization. *Neoplasia* 8: 302-311.
6. Wang J, Yong WH, Sun Y et al (2007) Receptor-targeted quantum dots: fluorescent probes for brain tumor diagnosis. *J Biomed Opt* 12: 144-148.

THE NEW CONCEPTUAL APPROACH TO SURGICAL TREATMENT GLIOMAS OF THE BIG CEREBRAL HEMISPHERES WITH USE NANOBIOLOGICAL TECHNOLOGIES

Grachev Yury

Modern nanobiotechnologies allow to find out invasive cells gliomas in the big cerebral hemispheres and to make them ultramicrosurgical elimination. In our opinion, possibility of liquidation of the potential centres of the continued growth an innovation in strategy and tactics of surgical treatment gliomas.

«ТВЕРДЫЕ» НАНОКОНСТРУКЦИИ ДНК ДЛЯ МЕДИЦИНЫ

Ю.М.Евдокимов, С.Г.Скуридин, В.А.Дубинская*

*Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН,
* Научно-исследовательский и учебно-методический центр
биомедицинских технологий ГУ ВИЛАР РАСХН,*

1. Несколько замечаний по поводу специфических свойств наночастиц металлов и наноконструкций на основе биологических молекул.
2. Наноконструкции на основе двухцепочечной ДНК - простая система для определения генотоксического эффекта наночастиц.
3. Наноконструкции на основе двухцепочечной ДНК - «носители» ионов гадолиния при нейтрон-захватной терапии.

ПРОИЗВОДНЫЕ ФУЛЛЕРЕНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

**Коновалова Н.П., Котельникова Р.А., Гончарова С.А., Файнгольд И.И.,
Мищенко Д.В., Раевская Т.А., Берсенева Е.Н., Сашенкова Т.Е.,
Блохина С.В., Богданов Г.Н., Трошин П.А., Хакина Е.А.,
*Романова В.С., Котельников А.И.**

*Институт проблем химической физики РАН, 142432, Черноголовка,
kotel@icp.ac.ru*

**Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва*

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

В настоящее время фуллерены рассматриваются, как одна из систем доставки лекарственных препаратов к мишеням, наряду с липосомами, нанотрубками и др.

В представляемой работе на моделях экспериментальных опухолей исследовано действие ряда производных фуллеренов различной структуры.

Показано, что фуллерены при совместном введении с противоопухолевыми препаратами, усиливают активность последних. Это, по-видимому, объясняется повышенной доставкой препарата в опухоль и хемосенсибилизирующей активностью фуллерена, за счет его антиоксидантных свойств и способности инициировать апоптоз.

Интересные данные были получены при изучении противоопухолевой активности смеси водорастворимых производных фуллерена и препарата Рубоксил (нитроксильного производного даунорубина). В этом случае также был отмечен эффект повышения противоопухолевой эффективности.

Исследованы также гибридные соединения фуллеренов с противоопухолевыми препаратами. Показано снижение токсичности и повышение активности последних.

КРЕМНИЕВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ СОНОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЗВУКА

Осминкина Л.А.^а, Гонгальский М.Б.^а, Тимошенко В.Ю.^а, Кудрявцев А.А.^б

^а *Физический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Россия, smile1111@mail.ru*

^б *Институт Теоретической и Экспериментальной Биофизики РАН, 142290, Пущино, Россия*

Известно, что высокое проникающее и направленное действие ультразвука (УЗ) широко используется в диагностике и лечении различных заболеваний. Использование УЗ для лечения онкологических заболеваний, в частности, разрушения массивных опухолей и отдельных клеток, ограничено недостаточной селективностью УЗ-воздействия при мощностях, требуемых для достижения лечебного эффекта. Применение наночастиц кремния при диагностике и лечении онкологических заболеваний открывает ряд неоспоримых преимуществ перед используемыми в настоящее время методами. Так, в [1-3] доказано свойство биосовместимости и биодegradуемости кремниевых наночастиц. В частности, работе [1] представлены данные, согласно которым наночастицы пористого кремния постепенно деградируют в живом организме, образуя кремниевые кислоты. В [2] с помощью in-vivo экспериментов продемонстрирована биосовместимость термически окисленных пленок пористого кремния с тканями глаза, что может быть использовано для совершенствования существующих терапевтических методик у больных с дисфункцией роговицы эпителиальных клеток и болезнями глазной поверхности. Согласно данным работы [3] общее содержание кремния в теле здорового взрослого человека весом 70 кг в норме составляет 0,5-1,0 г, что делает кремний одним из наиболее распространенных микроэлементов в организме человека. Известно, что кремниевые наночастицы могут выступать как активаторы (сенсibilизаторы) кислорода [4] при фотодинамической терапии рака. Однако данный способ лечения рака имеет существенные ограничения, ввиду малой глубины проникновения света в биологических тканях.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

Целью настоящей работы являлось разработать метод создания кремниевых наночастиц с помощью механического измельчения пластин кристаллического и пористого кремния, исследовать структурные свойства и свойства биосовместимости получаемых наночастиц, а также изучить новый способ уничтожения раковых клеток при сочетанном действии кремниевых наночастиц и ультразвука в экспериментах *in vitro*.

Наночастицы кристаллического (nc-cSi) и пористого (nc-pSi) кремния изготавливались с помощью метода механического измельчения пластин кристаллического и пленок пористого кремния в планетарной мельнице FRITSCHE «Pulverisette 7 premium line». Пленки пористого кремния, в свою очередь, формировались стандартным методом электрохимического травления пластин кристаллического кремния (100) p^{++} 25 мОм · см в растворе HF(50%):C₂H₅OH при плотности тока травления 60 мА/см² и времени травления 60 минут. Плёнка отслаивалась кратковременным увеличением плотности тока до 600 мА/см². Размеры кремниевых наночастиц определялись в просвечивающем электронном микроскопе LEO912 AB OMEGA. Состав поверхностного покрытия наночастиц исследовался с помощью ИК-спектрометра Bruker IFS 66v/S. В работе изучалось воздействие кремниевых наночастиц и ультразвука (УЗВ6-0,063/37) на клетки линии Нер 2 — рака лёгкого человека.

Согласно данным микроскопии, порошки nc-cSi и nc-pSi представляли собой 2 мкм ÷ 60 нм пористые агломераты слипшихся в процессе помола мелких наночастиц с размерами около 2÷5 нм (рис. 1а,б). При этом поверхность наночастиц по данным ИК-спектроскопии преимущественно покрыта кислородом, о чем свидетельствуют линии поглощения на деформационных (800 см⁻¹) и валентных (1050 1200 см⁻¹) колебаниях Si O Si. Оксидное покрытие поверхности обуславливает гидрофильные свойства получаемых кремниевых, что делает возможным изготовление их стабильных водных суспензий.

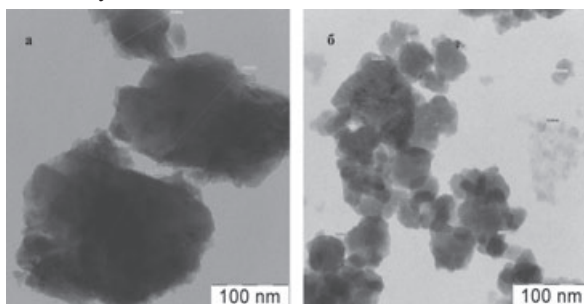


Рис.1. Картины ПЭМ порошков наночастиц nc-cSi (а) и nc-pSi (б).

Данные цитотоксического действия порошков nc-cSi и nc-pSi, взятых с различными концентрациями, на раковые клетки в *in vitro* экспериментах показало, что они не обладают токсичностью при концентрациях меньше, чем 2.5 мг/мл. Цитотоксическое действия наночастиц на клетки при больших концентрациях связано, возможно, с адсорбцией питательных веществ на их поверхность. При этом клетки не разрушаются, а лишь замедляют скорость своей пролиферации. Для изучения токсичности кремниевых наночастиц было также проведено исследование генотоксической и тератогенной активности получаемых образцов *in vivo* [5]. Для этого препараты, содержащие порошок наночастиц вводили внутривентрально мышам или беспородным белым крысам в дозах 5 и 25 мг/кг. В проведенном исследовании не было выявлено цитогенетических и тератогенных эффектов nc-pSi, что указывает на биосовместимость полученных кремниевых наночастиц.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Было изучено влияние сочетанного действия порошков кремниевых наночастиц *nc-cSi* и *nc-pSi*, взятых с концентрациями 1 г/л, и ультразвука на раковые клетки Her 2 в экспериментах *in vitro*. Показано, что после получасового сеанса УЗ-воздействия (озвучивания при плотности мощности УЗ до 5 Вт/см²) в присутствии наночастиц наблюдается уменьшение численности раковых клеток вплоть до их полного уничтожения. При этом в контроле (озвучивание без наночастиц) число клеток практически не изменялось. Так, в опытах с *nc-cSi* в контроле количество клеток после получасового озвучивания составляло 240 тыс на чашку, в то время как число клеток после озвучивания в присутствии *nc-cSi* составляло 55±4 тыс. на чашку (см. рис.2).

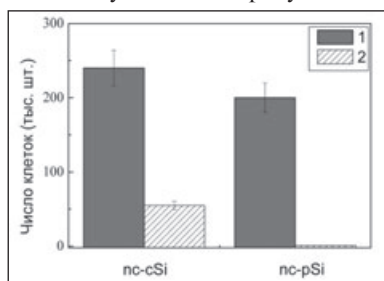


Рис.2. Количество раковых клеток после получасового озвучивания в контроле (столбцы 1), и в присутствии наночастиц *nc-cSi* и *nc-pSi* (столбец 2).

В опытах с *nc-pSi* после получасового сеанса озвучивания при микроскопическом изучении ростовой поверхности Карреля и объема культуральной среды, клеток не обнаружено ни на поверхности Карреля, ни в культуральной среде (см. рис.2). С целью обнаружения сохранившихся раковых клеток культуральная среда была высеяна в чашки Петри. Через трое суток клеток на поверхности чашек не обнаружено.

В последующих опытах исследовалась гибель клеток при уменьшенных мощностях ультразвуковой волны (озвучивания при плотности мощности УЗ до 0.5 Вт/см²). Показано, что ультразвуковое озвучивание чашек в контроле (клетки без добавления *nc-pSi*) не препятствовало клеточной пролиферации. Сразу после озвучивания число клеток в контроле и в экспериментальных образцах было примерно одинаково. Клетки контрольной и экспериментальной группы были высеяны в чашки Петри. Замечено, что рост числа клеток в экспериментальной группе практически отсутствует по сравнению с контролем. В частности, в одной серии экспериментов, число клеток в экспериментальной группе после озвучивания продолжало уменьшаться и к 84 часам после озвучивания клетки практически полностью исчезли. Представленные выше данные могут означать, в клетках после озвучивания в присутствии *nc-pSi* появляются дефекты, которые препятствуют их дальнейшей пролиферации или инициируют их гибель по механизму апоптоза.

Таким образом, обнаружено, что сочетанное действие кремниевых наночастиц и ультразвука приводит к уничтожению раковых клеток. Данный эффект можно объяснить следующим образом: 1) раковые клетки гибнут вследствие их локального разогрева колеблющимися под УЗ-воздействием кремниевыми наночастицами, т.е. вследствие гипотермии; 2) наночастицы выступают в роли наноскальпеля и разрезают раковые клетки; 3) наночастицы могут служить центрами возникновения кавитирующих пузырьков внутри раковых клеток, что приводит к уничтожению последних. Дальнейшие эксперименты необходимы для уточнения механизмов и усиления наблюдаемого эффекта, а также проведения *in vivo* исследований.

Представленные результаты работы направлены на применение в новых технологиях лечения онкологических заболеваний.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Park J., Gu L., von Maltzahn G., Ruoslahti E. etc "Biodegradable luminescent porous silicon nanoparticles for *in vivo* applications" // Nature Materials, 2009, Vol. 8, pp. 331-336.
2. Low S.P., Voelcker N.H., Canham L.T. etc "The biocompatibility of porous silicon in tissues of the eye" // Biomaterials, 2009, 30, pp. 2873–2880.
3. Canham L.T. "Nanoscale semiconducting silicon as a nutritional food additive" // Nanotechnology, 2007, 18, 185704, pp. 1-6.
4. Тимошенко В.Ю., Кудрявцев А.А., Осминкина Л.А и др. "Кремниевые нанокристаллы как фотосенсибилизаторы активного кислорода для биомедицинских применений" // Письма ЖЭТФ, 2006, том 83, № 9, стр. 492-495.
5. Дурнев А.Д., Соломина А.С., Даугель-Дауге Н.О. и др. "Исследование генотоксической и тератогенной активности нанокристаллов кремния" // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2010, том 149, №4, стр. 429-433.

SILICON NANOPARTICLES AS EFFECTIVE SONOSENSITIZER FOR CANCER TREATMENT USING ULTRASOUND

Osminkina L.A.^a, Gongalsky M.B.^a, Timoshenko V.Yu.^a, Kudryavtsev A.A.^b

^a Moscow State M.V. Lomonosov University, Physics Department, 119991 Moscow, Russia;

^b Institute of Theoretical and Experimental Biophysics of RAS, 142290 Pushino, Russia

In this paper we report that biocompatible nanoparticles of silicon can significantly improve the efficiency of the ultrasound, aimed at the selective destruction of cancer cells. Silicon nanoparticles were produced by mechanical grinding of crystalline and porous silicon and used as sonosensitizer for the destruction of human larynx cancer cells Hep 2 in experiments in vitro. It was found that the combined effect of silicon nanoparticles and ultrasound results, depending on the chosen power of ultrasound waves, or the complete destruction of cancerous cells, or the appearance of defects, leading in turn to loss of properties of cell proliferation and cell death. The analysis of structural and optical properties of the obtained nanoparticles, and the properties of their biocompatibility was done in experiments in vitro. Found that in the process of mechanical grinding of the films produced silicon nanopowder, which is a 2 micron \div 60 nm agglomerates of nanoparticles with sizes of about 2 \div 5 nm. The surface of silicon nanoparticles mainly covered with oxygen, which allows to receive its stable water suspensions.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ТРАНСПОРТНОГО МОДУЛЯ ВНУТРИСОСУДИСТОГО МИКРОРОБОТА.

**Решетов И.В., Саврасов Г.В., Васильев В.Н.,
Башлай А.П., Сухарев С.С., Копьлов А.В.**

ФГУ МНИОИ им П.А.Герцена,
МГТУ им. Н.Э.Баумана

Целью настоящей работы является разработка медико-биологической модели испытаний роботизированной внутрисосудистой системы и выработка на основе их результатов предложений по доработке конструкции транспортного модуля внутрисосудистого робота (ВМР).

В ходе выполнения работы осуществлялась проверка способности макетов ВМР к передвижению внутри сосудистого препарата с оценкой его воздействия на стенки сосудов на предмет возможности нанесения необратимых повреждений. Испытанию подвергались образцы движителя ВМР с полимерными опорными элементами.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

В состав испытуемого образца ВМР входит контроллер, который с двигателем ВМР связан системой гибких трубопроводов гидравлического привода. Управление непосредственно двигателем осуществлялось с пульта персонального компьютера

Во время испытаний использовались сосудистые препараты крупных артерий, взятые у трупа и протез кровеносного сосуда из ПТФЭ (производство Экофлон).

Испытания способности к передвижению ВМР по сосудистому руслу

На первом этапе образец помещался в начало протеза и под управлением серий гидравлических транзакций, формируемых контроллером по командам с компьютера, продвигался вглубь протеза. Положение ВМР внутри протеза контролировалось рентгенографически.

За один цикл гидравлических транзакций ВМР продвигался примерно на 15 мм. Через несколько циклов начала проявляться негерметичность соединений гидравлической части образца. Это приводило к потере рабочей жидкости (физраствора), подсасыванию воздуха и к потере способности передвигаться. Для купирования наиболее вредных последствий негерметичности (потеря рабочей жидкости и подсасывание воздуха) оперативно было принято решение проводить испытания в среде физраствора, для чего образец ВМР предварительно помещали банку с физраствором), а испытание проводили на протезе, заполненном физраствором и помещенном в лоток. В этих условиях макет ВМР функционировал устойчиво и был способен пройти сосудистый протез на всю длину. Также протез был помещен в лоток с физраствором по радиусу более 200 мм и образец ВМР прошел по протезу сосуда на всю длину по криволинейной траектории, что было проконтролировано с помощью рентгенологических исследований.

При переходе к испытаниям на сосудистом препарате, помещенном в лоток с физраствором, было констатировано, что образец ВМР не смог самостоятельно продвинуться внутрь общей подвздошной артерии из-за ее малого диаметра. Поэтому микроробот был механически выведен в просвет брюшной аорты и затем ВМР прошел в автоматическом режиме по всей длине аорты. Положение ВМР внутри аорты контролировалось с помощью рентгеновского аппарата.

Изучение сосудистого препарата после опытов средствами АСМ

Для изучения сосудистого препарата после опытов применялся атомно-силовой микроскоп Ntegra производства ЗАО «НТ-МДТ», Зеленоград. Был выполнен подбор процесса пробоподготовки препарата интимы сосуда с применением микрохирургической техники. а также режимов сканирования таких, чтобы обеспечить визуализацию поверхности интимы. В ходе проведения опытов описанными процедурами с применением микрохирургической техники было взято по 10 препаратов как с интактных участков интимы сосуда, так и с подвергшихся воздействию опорных элементов ВМР, в том числе и с оставлением видимых микроскопически следов воздействия.

По результатам сравнительного исследования средствами АСМ внутренних поверхностей сосудов, подвергшихся воздействию опорных элементов двигателя ВМР и интактных различий не обнаружено.

BIOLOGICAL TRIALS OF TRANSPORTATION MODULE OF INTRAVASAL MICROROBOTS

I.V.Reshetov, G.V.Savrasov, V.N.Vasiliev, A.P.Bashlay, S.S.Sukharev, A.V.Kopylov

РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО И КЛИНИЧЕСКОГО ЭТАПА АПРОБАЦИИ МИНИТИТАНОВЫХ ПЛАСТИН С НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМИ ПОКРЫТИЯМИ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ЛИЦЕВОГО СКЕЛЕТА

*И.В. Решетов, Д.В. Штанский, М.В. Ратушный,
М.М. Филюшин, С.С. Сухарев*

МНИОИ им. П.А. Герцена.

Государственный институт Стали и Сплавов (Технологический Университет).

Лучевая и химиотерапия, необходимые при комплексном лечении опухолевой патологии значительно уменьшают регенераторные способности организма, и ведут в 10-15% к отторжению синтетических материалов применяемых при реконструкции костных дефектов челюстно-лицевой зоны. Для реконструкции тканевых дефектов, образующихся после обширных хирургических вмешательств в настоящее время используются различные методы алло- и аутотрансплантации, а так же осуществляется поиск и разработка новых биосовместимых материалов для восстановления дефектов. Среди множества био материалов перспективными являются пористые керамические материалы на основе фосфатов кальция, в связи с их близостью по составу к внеклеточному веществу. Современные биоматериалы, используемые в реконструктивной хирургии должны обладать высокой прочностью, повышенной коррозионной и износостойкостью, хорошей биологической совместимостью и нетоксичностью. В то время как многие металлы и сплавы соответствуют многим из этих требований, они обеспечивают достаточно неплотное соединение между металлической поверхностью и костной тканью. Для обеспечения наиболее эффективного контакта между костными фрагментами и имплантатом необходимо наличие многофункционального биологически активного наноструктурного покрытия на поверхности имплантата.

На базе МНИОИ им. П.А. Герцена проведены экспериментальные работы по имплантации в область костного дефекта титановых пластин с различными вариантами биокерамического напыления. На первом этапе использовались две группы крыс, каждая из которых включала четыре животных. Животным выполнялась трепанация теменной кости размером до 3-4 мм, с замещением костного дефекта титановой пластиной соответствующего размера с наноструктурным биокерамическим напылением и титаном без напыления. Животные обеих групп выводились из эксперимента на 15 и 30 сутки с предварительным рентгенологическим исследованием и последующим морфологическим исследованием области хирургического воздействия. Данные рентгенологического исследования показали отсутствие патологической периостальной реакции, вокруг имплантации титана в обеих группах, и восстановление опорной функции резецированного костного фрагмента. При гистологическом исследовании и электронной микроскопии имплантированных образцов титана (без напыления и с биокерамическим напылением) выявлено плотное заселение пористого биокерамического покрытия остеобластами с началом неоостеогенеза, подобной картины на поверхности титана без биокерамического покрытия не отмечено.

На втором этапе экспериментальной работы использованы крупные лабораторные животных, близких по своим массо-габаритным характеристикам к человеку. Для оценки остеоиндуктивных и механико-несущих потенциалов наноструктурированных покрытий титановых имплантов при остеосинтезе в области костного дефекта баранам выполняли остеотомию скуловой и локтевой костей. В послеоперационном периоде животные находились на стандартном пищевом и питьевом рационах. По-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

ложение титановых пластин в области остеосинтеза контролировалось непосредственно в день имплантации посредством рентгенологического исследования, контроль положения имплантов, а также окружающих тканей, проводился в сроки 4 и 6 недель после операции. При рентгенологическом исследовании отмечается отсутствие признаков воспаления, периостальных реакций, патологической подвижности соединяемых фрагментов костей, формирование полноценной костной мозоли. Через 4 и 6 недель после операции фрагменты опорных конструкций (скуловой и локтевой костей животного) хирургически удалялись и подвергались гистологическому исследованию. При сравнении с контрольной группой у животных с имплантированными титановыми наноструктурированными пластинами, через 4 недели в области перелома отмечается формирование костной мозоли с созреванием зрелой костной ткани, через 6 недель в области перелома отмечается выраженное формирование зрелой костной ткани без признаков нарушения целостности кости.

Таким образом нами разработана оптимальная экспериментальная модель для исследования механизмов остеоинтеграции и остеогенеза в области интеграции титановых имплантатов. Исследования средствами световой микроскопии показали тенденцию к ускорению остеогенеза в окрестности имплантов, имеющих наноструктурные покрытия. Электронная микроскопия и иммуногистохимические исследования позволят определить количественные характеристики остеогенеза и доказать преимущества имплантов с наноструктурными покрытиями. Полученные в эксперименте данные позволили перейти к ограниченным клиническим испытаниям титановых наноструктурированных пластин при остеосинтезе костных структур челюстно-лицевой зоны у онкологических больных. На базе отделения микрохирургии МНИОИ им.П.А.Герцена проведены ограниченные клинические испытания перфорированных титановых пластин для остеосинтеза в черепно-челюстно-лицевой хирургии производства ООО «Конмет» (ТУ 9438-003-11458417-2004) с использованием композиционных СВС мишеней $\text{TiC}_{0.5}+10\%\text{CaO}$ (ТУ 1984-015-11301236-2003) и $\text{TiC}_{0.5}+10\%\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (ТУ 1984-019-11301236-2005) производства ЗАО НПО «Металл». Испытания проведены на 20 пациентах находящихся на различных этапах специального лечения. Операции по остеосинтезу посредством перфорированных титановых пластин производства ООО «Конмет» осуществлялись по комбинированной анестезией в асептических условиях операционного блока МНИОИ им.П.А.Герцена. Предварительно все образцы подвергались стерилизации в аппарате холодной плазменной обработки в парах перекиси водорода в течении 50 мин. после предварительной упаковки в контейнер «stericlin». Послеоперационный период оценивали: по клиническому течению раневого процесса (наличию отека и гиперемии слизистой оболочки в области хирургического вмешательства, состоятельности швов, общей температурной реакции организма), клинико-лабораторными показателям (общий анализ крови, биохимический анализ крови), рентгенологически - картина состояния области пластики костного дефекта и окружающих тканей). Во всех 20 случаях отмечено заживление операционной раны первичным натяжением; швы сняты на 10-14 сутки. Контрольный осмотр и рентгенологический контроль осуществляли согласно требованиям к срокам динамического наблюдения онкологических больных.

ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ РЗЭ-СОДЕРЖАЩИХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ В МРТ И ИК-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИК И НЗТ ОПУХОЛЕЙ

К.В. Родионов¹, А.В. Рябова¹, А.В. Попов¹, В.А. Крутько²,
О.Б. Петрова³, Ю.К. Воронько¹, В.Б. Лощенко¹

¹ – Учреждение Российской академии наук Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН

² – Учреждение Российской академии наук Институт общей
и неорганической химии им. Н.С. Курнакова РАН

³ – Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева?
nasya.ryabova@gmail.com

Поликристаллические боратогерманаты $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:Nd_3+(Nd_3+: 0.5, 3.0, 7.0 \text{ ат\%})$ получали при 1520К методом твердофазного синтеза. Водные коллоиды наночастиц получали из приготовленных поликристаллов и стекол путем последовательного измельчения сначала в агатовой ступке, затем при ультразвуковом (мощность ультразвукового генератора 10 Вт) диспергировании в воде. Размер гидродинамического радиуса наночастиц оценивался с помощью спектрометра динамического рассеяния света Photocor Complex.

Для регистрации спектров люминесценции ионов Nd^{3+} в частицах использовался волоконно-оптический спектрометр ЛЭСА-01-Биоспек (в том числе для регистрации люминесценции *in-vivo*). Модификация ЛЭСА-01-Биоспек заключалась в дополнительном использовании непрерывного ИК лазера с длиной волны 810 нм, изготовлением и заменой оптических фильтров.

Нами проведено предварительное исследование фармакокинетики наночастиц поликристаллов $Gd_{14}(BO_3)_6(GeO_4)_2O_8:Nd_3+$ на лабораторных мышах с перевитыми опухолями карциномы Эрлиха в мышечную ткань задней лапы. Водный коллоид наночастиц вводили внутривенно. Доза введенного препарата в расчете на массу животного составила 16 мг/кг. С помощью флуоресцентной спектроскопии установлено распределение этих наночастиц по органам и тканям мыши спустя час после введения.

Распределение по органам существенно зависит от нескольких факторов: от размеров наночастиц, от поверхностного заряда наночастиц, от типа используемого полимерного покрытия наночастиц. Для развития этого направления представляется важным провести исследование по влиянию этих параметров на распределение наночастиц по тканям и органам в норме и при некоторых патологиях, в частности при злокачественных опухолях и атеросклеротических изменениях сосудов.

PROSPECTS OF RE-CONTAINING INORGANIC MATERIALS IN MRI AND IR FLUORESCENT DIAGNOSTICS AND TUMOR NCT

K.V. Rodionov, A.V. Ryabova, A.V. Popov, V.A. Krutko,
O.B. Petrova, Yu.K. Voronko, V.B. Loschenov.

The work deals with the spectroscopic characteristics of nanoparticles based on borate polycrystals and glasses doped with Nd^{3+} in aspect of neutron capture therapy with the possibility of fluorescent navigation.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЫ КЛЕТОК МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

Роскошная А.С., Багров Д.В., Онищенко Г.Е., Шайтан К.В.

*Биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова
annarask@gmail.com*

Для исследования клеточных структур микроскопические методы являются основополагающими в гистологии и клеточной биологии. Главными из них являются оптическая микроскопия и – для получения высокого разрешения – просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ). Атомно-силовая микроскопия применяется для исследования гистологических препаратов чрезвычайно редко: стандартные способы подготовки образцов для АСМ позволяют исследовать поверхность образца, но не его внутреннюю структуру.

Цель данной работы состоит в развитии экспериментальных методик, которые позволили бы проводить сканирование срезов тканей на атомно-силовом микроскопе (АСМ). В основе этих методик лежит сочетание различных режимов АСМ с протоколами иммобилизации исследуемого материала в твердой среде и приготовления срезов, которые применяются для ПЭМ. При этом если для ПЭМ требуется приготовление ультратонкого среза, проникаемого для электронного пучка, то для АСМ значение имеет только гладкость поверхности, получаемой после резки.

В работе было показано, что АСМ применима для изучения поверхности ультратонких срезов и блоков эпоксидной смолы, при этом обнаруживаются рельеф и неоднородность свойств на поверхности, которые соответствуют структуре биологического материала.

Предлагаемые методики визуализации были опробованы на образцах тканей животных (препараты печени и селезенки крыс), и растений (меристема корешка риса), а также на культуре (A549). Исследуемые объекты фиксировались, проходили процедуру обезвоживания, заливки в смолу и приготовления ультратонких срезов. После этого осуществлялось сканирование блоков или срезов на АСМ. На поверхности блоков эпоксидной смолы с залитыми образцами с использованием различных режимов работы атомно-силового микроскопа были получены изображения субклеточных структур.

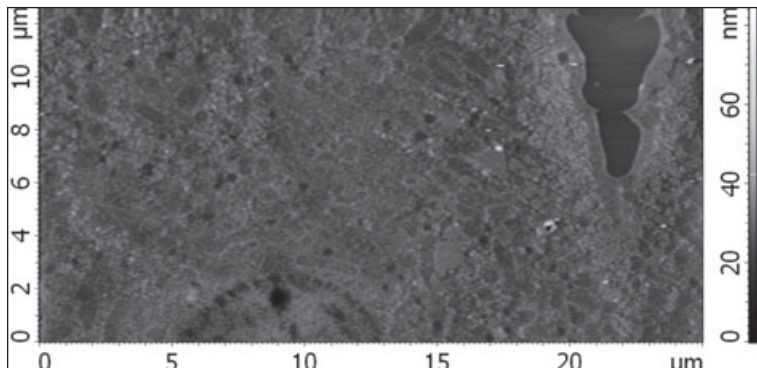


Рис.1. Поверхность эпоксидного блока, препарат печени мыши.

Некоторые полученные изображения исследуемых образцов представлены на рисунках 1 и 2. На рисунке 1 представлено изображение поверхности блока эпок-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

сидной смолы с тканью печени мыши, зафиксированным в нем. На изображении видна структура гепатоцита – фрагмент ядра и цитоплазмы, так же видны митохондрии, липосомы и вакуоли. В правой части изображения видна цитоплазма соседней клетки с органеллами, а немного вверху – кровеносный капилляр с фрагментами нескольких эритроцитов.

Одним из других объектов исследования являлся препарат меристемы корешка риса (рис.2). При заливке препарата в эпоксидную смолу растительная ткань пропитывается хуже, чем животная, ввиду особенностей анатомического строения (наличия толстых клеточных стенок). На изображении видны клетки меристемы и хорошо различимые клеточные стенки, а так же ядра, располагающиеся по середине клеток.

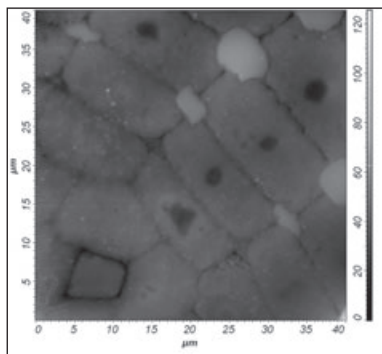


Рис.2. Поверхность эпоксидного блока, препарат меристема корешка риса.

Измерения, проведенные на нескольких блоках, показывают, что наиболее заметными объектами всегда являются ядра и ядрышки: на топографических изображениях они выглядят как углубления до 100 нм, которые очень заметны на фоне относительно гладкой цитоплазмы.

На полученных изображениях видна структура клеток: ядерная оболочка и хроматин ядер, плазматическая мембрана, мембраны вакуолярной системы (аппарат Гольджи, везикулы), митохондрии (рис.3) и другие органеллы. Было показано, что при использовании алмазного ножа поверхность для исследования получается более ровной, а рельеф – более информативным, чем при резке стеклянным ножом.



Рис.3. Изображение митохондрии в препарате культуры клеток. Видны кристы, расстояние между ними ~100 нм.

Исследования срезов на АСМ дают возможность получать изображения, сопоставимые с малым увеличением (менее ~25000) просвечивающего электронного микроскопа. Дальнейшее развитие методик позволит использовать АСМ как дополнительный метод исследования тканей, используемый в сочетании с другими видами микроскопии.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА НАНОЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ *IN VIVO*

Т.А. Савельева, С.Ю. Васильченко, А.В. Рябова, В.Б. Лощенко

Учреждение Российской академии наук Институт общей физики им. А.М. Прохорова РАН (ИОФ РАН)

savelevat@gmail.com

Задачи исследования

Разработка методов неинвазивной оценки концентрации наночастиц в биологических тканях *in vivo* с целью создания научного задела по диагностике и лечению злокачественных новообразований и ряда других заболеваний.

Материалы и методы

Исследование проведено на модельных растворах с оптическими свойствами, аналогичными свойствам биологических тканей, и на экспериментальных животных (мышь с привитой карциномой Эрлиха).

Для характеристики коллоидных растворов наночастиц, приготовленных для системного введения экспериментальным животным, использовали спектрометр динамического рассеяния света Photocor Complex (определение гидродинамического радиуса наночастиц), спектрофотометр Hitachi U-3400 с интегрирующей сферой и волоконно-оптический спектрометр Lesa-01-Biospec с набором твердотельных лазеров для возбуждения флуоресценции (оптические свойства).

Исследование биологических тканей экспериментальных животных, содержащих наночастицы, осуществлялось методами люминесцентной спектроскопии и спектроскопии диффузного отражения с применением волоконно-оптического спектрометра. Для оценки концентрации наночастиц в биологических тканях был разработан специальный алгоритм анализа получаемых спектральных данных.

Результаты и выводы

Показано, что оптико-спектральные методы могут эффективно использоваться для высокоточного неинвазивного количественного анализа накопления наночастиц в биологических тканях.

Работа выполнена при поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации в рамках ФЦП «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг. (ГК № П544).

SPECTROSCOPIC METHODS FOR MONITORING OF NANOPARTICLE ACCUMULATION IN BIOLOGICAL TISSUES IN VIVO

T.A. Savelieva, S. Yu. Vasilchenko, A.V. Ryabova, V.B. Loschenov

Prokhorov General Physics Institute, Russian Academy of Sciences

The methods of noninvasive, in vivo assessment of nanoparticle concentration in biological tissues were developed. The research of nanoparticle-containing solutions with tissue-like optical properties and biological tissues of the laboratory animals was carried out with luminescence and diffuse-reflectance spectroscopic techniques. The special algorithm of spectroscopic data processing was developed. It was shown that optical spectroscopic methods can be used for high-precision noninvasive quantitative analysis of nanoparticle accumulation in biological tissues in vivo.

ТЕХНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ТРАНСПОРТНОГО МОДУЛЯ ВНУТРИСОСУДИСТОГО МИКРОРОБОТА

Саврасов Г.В., Копылов А.В., Башлай А.П.

МГТУ им. Н.Э.Баумана

В рамках разработки внутрисосудистого микроробота (ВМР) проводились предварительные испытания одной из модификаций транспортного модуля ВМР, направленные на изучение передвижения транспортного модуля ВМР в беспульсовом потоке жидкости, кроме того, проводились испытания, направленные на изучение поведения робота и моделирование реальной ситуации страгивания робота (отрыва его от стенок сосуда).

1. Испытания транспортного модуля ВМР в беспульсовом потоке жидкости.

Для предварительной проверки работоспособности транспортного модуля внутрисосудистого микроробота (ВМР) использовался комплекс для испытаний ВМР в беспульсовом потоке жидкости в трубках различного диаметра, имитирующих различные участки сосудистого русла организма человека.

В основании стенда установлен бак с жидкостью, в которой проводятся испытания. С помощью насоса жидкость из бака подается в гидросистему стенда. На верхней стороне насоса находится переключатель режимов, используемый для регулировки параметров работы стенда. Шунт служит для регулировки количества подаваемой в гидросистему жидкости. Работа насоса контролируется выключателем, расположенным рядом с переходной камерой. Жидкость, не вернувшаяся в бак через шунт, поступает в гребенку, к которой через шаровые краны подключены трубки различного диаметра, имитирующие различные участки сосудистого русла организма человека. С другой стороны трубки подключены к переходной камере. Из камеры жидкость возвращается в бак, проходя расходомер РМ4-0,25 ЖУЗ-К (диапазон измерений 0,05-0,25 м³/час, $\Delta = \pm 0,00625$ м³/час) и кран, регулирующий поток через гидросистему. Давление контролируется с помощью манометров ММТ-1 (диапазон измерений 14-306 мм рт.ст., $\Delta = \pm 3$ мм рт.ст. в диапазоне 60-240 мм рт.ст., $\Delta = \pm 4$ мм рт.ст. в остальном диапазоне), подключенных к переходной камере и к гребенке. В стенке переходной камеры установлены пять штуцеров для подключения ТМ ВМР.

Таким образом образуется замкнутый контур тока жидкости: бак – насос – гребенка – трубки – переходная камера – расходомер – бак. Путем изменения режима работы насоса и положения шунтирующего крана регулируется объем подаваемой в гребенку жидкости. С помощью кранов на гребенки осуществляется выбор необходимых в данный момент трубок. Кран, расположенный после расходомера позволяет регулировать объемный поток жидкости через систему и давление.

Испытания проходили в несколько этапов:

На первом этапе испытаний проверялась работоспособность конструкции ВМР, выявлялись ее недостатки, такие как негерметичность силифона, сильное влияние жесткого фала на движение ВМР и др., отрабатывались способы прокачки ТМ ВМР, способы укладки фала в переходной камере. Изучалось влияние циклической нагрузки на опорные элементы. Подбирались значения управляющих параметров в программе *microrobot*. Параллельно отлаживалась сама программа *microrobot*, анализировалась и расширялась ее функциональность.

На втором этапе работы проводились испытания, целью которых было определение максимальной скорости движения ВМР при параметрах потока равных усредненным физиологическим параметрам кровотока. При давлении 120-140 мм рт.ст. и объемной скорости потока 18-20 мл/с максимальная скорость ТМ ВМР (усредненная за несколько циклов) составила 1,3 мм/с.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

На третьем этапе работы проводились испытания, целью которых было определение критических параметров потока, при которых происходит срыв ВМР при его фиксации на всех опорных элементах или в различные фазы движения. Установлено, что ВМР пригоден для работы при параметрах потока соответствующих средним параметрам кровотока в подвздошной артерии.

На четвертом этапе работы проводились испытания, целью которых было изучение влияния технологической головки ВМР на скорость движения и критические параметры потока. Не выявлено существенного влияния технологической головки на движение ВМР.

2. Определение силы страгивания транспортного модуля ВМР.

Цель испытаний заключалась в оценке сил взаимодействия (трения) между транспортным модулем ВМР и моделью сосудистой системы, в зависимости от давления в опорах транспортного модуля ВМР.

Исследования проводились с использованием испытательного комплекса, построенного на базе машины INSTRON3365. Данный комплекс обеспечивает контроль за приложенной нагрузкой. С помощью специальных приспособлений было возможно устанавливать различные макеты сосудов. Испытания проводились в различных условиях – в жидкости или в сухой модели.

В качестве модели сосуда использовалась силиконовая трубка, внутрь которой при необходимости закачивалась вода через приспособление для сопряжения с INSTRON3365. В основании этого приспособления установлен краник, к которому можно подключать шприц с жидкостью и вводить нужное ее количество в модель сосуда.

Транспортный модуль ВМР крепился к траверсе испытательной машины с помощью приспособления для протяжки. Приспособление для протяжки представляет собой стакан с отверстиями, через которые проходят опоры, таким образом, робот может свободно касаться опорами стенок модели. Стакан крепится с помощью лески на траверсу испытательной машины.

С помощью смесителя шприц подключается к трубкам, управляющим опорами транспортного модуля. Таким образом, с помощью шприца можно ввести в опоры робота жидкость. Контроль давления в опорах осуществляется с помощью манометра. По достижении заданного давления, контролируемого при помощи манометра, кран, ведущий к шприцу, перекрывается, и образуется замкнутая система с необходимым нам давлением в опорах.

Опоры, по достижении определенного уровня давления значительно расширяются и упираются в стенки трубки, препятствуя перемещению робота.

При проведении испытаний, траверса поднимается вверх и тянет за собой транспортный модуль ВМР. Вначале из-за давления в опорах транспортный модуль находится в состоянии покоя. По мере роста осевой нагрузки наступает момент срыва транспортного модуля, что соответствует переходу силы трения покоя в силу трения скольжения и робот начинает двигаться вместе с траверсой.

В файл-отчет программы испытания записывается зависимость силы от перемещения траверсы. По этим зависимостям определялась сила трения.

После проведения серии испытаний и их математической обработки (фильтрация, усреднение, определение максимальной силы и силы на «плато») были получены зависимости силы от приложенного давления.

В результате испытаний транспортного модуля ВМР в беспульсовом потоке жидкости получены следующие результаты:

1. Отработаны методика подготовки и подключения ВМР и блока приводов (в т.ч. прокачка ТМ ВМР, прокачка привода, укладка фала в переходной камере, предварительная настройка ВМР) и параметры управляющей программы, контролирующей работу блока приводов.

2. Установлены максимальная скорость движения ВМР и критические параметры потока, при которых происходит срыв ВМР, зафиксированного на всех опорных элементах или находящегося в движении.

В результате проведения испытаний на страгивание были получены следующие результаты:

1. Подтверждена способность транспортного модуля оставаться в состоянии покоя при значительных нагрузках со стороны потока жидкости.

2. Были определены предельные величины силы трения и давления в опорных элементах при которых происходило повреждение опор транспортного модуля.

После проведения предварительных испытаний на стенде с беспульсовым потоком и испытаний на машине INSTRON3365, подтвердивших работоспособность принципа передвижения транспортного модуля ВМР начались испытания на специально созданном стенде с пульсовым кровенаполнением модели сосудистой системы и испытания на животных.

НОВЫЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ

Н.И. Сеницын, В.А. Ёлкин, О.В. Бецкий, В.А. Молочков,
А.П. Суворов**, С.А. Суворов**, Г.И. Гуревич***.*

*Саратовский филиал Института радиотехники и электроники им. В.А. Котельникова РАН,
МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского,*

***Саратовский областной кожно-венерологический диспансер,*

****Саратовский онкологический диспансер.*

info@soire.renet.ru zet2004@mail.ru

В последние годы в мире отмечается отчётливый рост заболеваемости злокачественными новообразованиями кожи. в структуре онкологической патологии среди мужского населения России они занимают третье место, уступая только раку легкого и желудка. У женщин злокачественные новообразования кожи регистрируются в 1,4 раза чаще, чем у мужчин, занимая в структуре онкопатологий второе место, уступая раку молочной железы (Давыдов М.И., Аксель Е.М., 2003). В целом по России с 1991 года, как у мужчин, так и у женщин отмечается тенденция к увеличению заболеваемости раком кожи с темпом прироста в среднем 3,5% (Хатырев С.А. и соавт., 2004).

По нашим данным злокачественные заболевания кожи в Саратовской области занимают первое место среди всех онкопатологий. Был проведен анализ историй болезни за 2002 год пациентов, наблюдавшихся в Саратовском городском онкодиспансере (Суворов А.П., Гуревич Г.И. и соавт., 2003). При этом установлено, что из 1935 больных онкозаболеваниями злокачественными образованиями кожи страдало 522 пациента, из них у 478 диагностирован базально-клеточный рак (91%), у 44 констатирована меланома (8,4%).

В настоящее время широкое применение в различных областях клинической медицины, включая онкологию нашли миллиметровые волны (Пославский М.В. и соавт., 1989; Десятков Н.Д. и соавт., 1989).

Роль электромагнитного излучения низкой интенсивности миллиметрового диапазона (ЭМИ) в последние годы рассматривается как воздействие антиканцерогенного фактора (Кабисов Р.К., 1992). Так, констатировано, что электромагнитное излучение миллиметрового диапазона участвует в формировании сигнала «смерти»

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

для опухолевой клетки в апоптозе и реализации основного механизма апоптоза (Родштат И.В., 2005).

По данным С.В.Плетнева и Н.Д.Девяткова (2001), при меланоме кожи миллиметровые волны способствуют мобилизации резервных возможностей организма, стимулируя иммунную систему и, тем самым, предупреждая метастазы и рецидивы.

В настоящее время получены убедительные данные о положительном воздействии ЭМИ миллиметрового диапазона на организм при злокачественных опухолях в экспериментах на животных (Дубинина Е.Е. и соавт., 1988; Девятков Н.Д., Плетнев С.Д. и соавт., 1977, 2000; Сеницын Н.И., Ёлкин В.А., 2003, 2007, 2009).

Использование КВЧ-терапии в клинической онкологии способствовало повышению у больных в послеоперационном периоде резистентности кроветворной системы к химиопрепаратам и активации клеточного иммунитета (Севостьянова Л.А., 1979; Запорожан В.Н. и соавт., 1997).

Электромагнитное излучение миллиметрового диапазона с положительными результатами назначалось с целью профилактики послеоперационных осложнений, а также лучевого и комбинированного лечения онкологических больных (Запорожан В.Н. и соавт., 1995; Корицова Л.И. и соавт., 1995; Лян Н.В., 1995).

По имеющимся данным (М.Кузманова и соавт., 1995), миллиметровые волны вызывают в организме изменения, приводящие к стабилизации мембранной структуры по отношению к последующему воздействию ионизирующей радиации.

В силу малой энергии электромагнитное излучение миллиметрового диапазона не оказывает разрушающего действия на структуры клеток, не обладает побочным действием и хорошо переносится больными (Воторопин С.Д. и соавт., 1994; Попов Б.М. и соавт., 1995).

В этой связи качество ранней диагностики онкологических заболеваний кожи несомненно приобретает важное практическое значение.

В работе сообщается о ряде принципиально новых результатов, позволяющих развивать высокотехнологичные перспективные подходы к разработке радиоэлектронной аппаратуры и методов ранней и сверхранней неинвазивной диагностики онкологических заболеваний кожи. В основе развиваемых подходов лежат результаты пионерских исследований авторов [1-8], впервые обнаруживших особую роль структуризации водосодержащей среды в живых тканях при их взаимодействии с низкоинтенсивными электромагнитными излучениями миллиметрового, терагерцового, ИК и видимого диапазонов.

Авторами впервые установлено, что именно структуризация водосодержащей среды в живых тканях при их взаимодействии с ЭМИ приводит к появлению биологических эффектов. Причём эти эффекты наблюдаются лишь на вполне определённых резонансных частотах, которые зависят от вида клеток живых тканей и наноструктуры контактирующего с клеткой внешнего нерастворимого в воде материала. Именно по анализу спектрального состава отклика от взаимодействия живых тканей с ЭМИ можно судить о состоянии живой ткани. То есть, можно проводить диагностическое обследование живых объектов.

В данной работе речь идёт об обнаружении и дифференциальной диагностике новообразований кожи, в том числе и злокачественных новообразований, методах такой диагностики и важнейших принципах разработки соответствующей диагностической аппаратуры, включая стационарные электронные комплексы и портативные диагностические устройства.

Развивается ряд новых методов диагностики, основанных на анализе рассеянного оптического и квазиоптического (КВЧ, ТГЧ) излучения, с помощью которых можно обнаруживать и характеризовать патологические изменения в живых тканях на клеточном и субклеточном уровнях. Разработанный авторами ИК спектрометр обратно рассеянных излучений, образующихся при просвечивании тканей тела ши-

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

рокопосным ИК излучением (в полосе длин волн 1-25 мкм) от источника излучения аппликаторной конструкции, позволяет решать задачи по раннему обнаружению рака эпителия человека. Высокая способность ИК спектрометра обратного рассеяния (ИК СОР) к обнаружению слабо выраженных патологий связана с тем, что характерные черты всех типов предрака и раннего рака выражаются в увеличении размеров, скопления и гиперхроматичности ядер эпителиальных клеток. А это сильно влияет на величину коэффициента обратного рассеяния, на разных частотах зондирующего ИК излучения. Причём на разных частотах интенсивность обратного рассеяния проявляется в этом случае в разной степени. Сказанное касается диагностики новообразований поверхностной локализации с глубины до 5 мм. В сочетании с оптоволоконным зондом ИК СОР может быть использован для обнаружения ранних предраковых изменений стенок полых органов. Для глубоко расположенных опухолей диагностику можно проводить инвазивно, вводя в мягкие ткани на необходимую глубину зонд до контакта с новообразованием.

Ткани активно рассеивают ближнее и среднее ИК излучение (1-20 мкм) потому, что размеры клеточных ядер достигают 7-10 мкм, а типичные размеры клеток колеблются от 20 до 60 мкм и превышают длины волн указанного диапазона. Это приводит к сложным волновым процессам рэлеевского рассеяния такими частицами. Оно характеризуется широким угловым распределением и зависимостью коэффициента рассеяния от линейных размеров частиц в 6 степени, а от длины волны кратно λ^{-4} . Данный факт обеспечивает сверхвысокую чувствительность развиваемого авторами метода ранней диагностики. Особенно это относится к диагностике кожных заболеваний.

Фотоны, которые после однократного рассеяния уходят в обратном направлении или близком к нему, формируют компоненту отражённого излучения. Фотоны, возвращаемые обратно после множественных актов рассеяния, формируют диффузное отражение. Спектры обоих сигналов содержат насыщенную и ценную информацию о свойствах тканей. Но характер информации различен. Спектроскопические особенности отражённого излучения связаны с микроархитектурой эпителиальных клеток, размерами, формой и показателем преломления их органелл, клеточных включений и суборганельных структур. Очевидно, анализ этой компоненты полезен для диагностики заболеваний органических эпидерм (преинвазивные стадии эпителиального рака, дисплазии, карциномы).

Диффузно рассеянная компонента наиболее важна для получения информации о глубоко лежащих тканях. Кроме того эта компонента позволяет проводить исследования динамики клеток тканей на коротких временных интервалах сравнимых с периодом электромагнитных колебаний зондирующего излучения. Такая возможность позволяет создавать высокоточные приборы для мониторинга микроциркуляции крови в тканях организма, в том числе и опухолевых. Получаемая при этом индивидуальная диагностическая информация отражает стадии развития онкологического процесса конкретного пациента.

Использование специально подобранных природных кристаллов, натуральных минералов или синтезированных искусственных материалов, полученных по Know-how технологиям, для внесения в живую ткань дополнительной степени структуризации водосодержащей компоненты тканей в сочетании с КВЧ или ТГЧ излучением позволяет принципиально расширить возможности развиваемых диагностических подходов. Внешние материалы, вызывающие дополнительную структуризацию, могут доставляться в живые ткани и в виде наночастиц или управляемыми наноконтейнерами. Важно отметить, что развиваемые методы и технические решения впервые открывают путь также и к построению принципиально новых высокоэффективных терапевтических нанотехнологий.

Таким образом, развиваемые методы и разрабатываемая аппаратура, опирающиеся на обнаруженное авторами явление структуризации водосодержащей среды

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

в живых тканях и особенности взаимодействия живых тканей с ЭМИ, открывают возможности построения сверхвысокочувствительной неинвазивной диагностики кожных заболеваний, включая онкологические.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Синицын Н.И., Ёлкин В.А. Диплом №329 на открытие. Выдан 29 мая 2007 г. Международной академией авторов научных открытий и изобретений на основании результатов научной экспертизы заявки на открытие.
2. Синицын Н.И., Ёлкин В.А. Явление генерации электрической энергии тонким водосодержащим слоем. Ч.II. Экспериментальное исследование структуризации тонких водосодержащих слоев при их контакте с различными материалами. // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2006. № 5-6. С. 34-56.
3. Синицын Н.И., Ёлкин В.А. Особая роль структуризации водосодержащей среды в современных радиоэлектронных биомедицинских технологиях и нанотехнологиях. // Биомедицинские технологии и радиоэлектроника. 2007. №2-4. С.31-44.
4. Синицын Н.И., Ёлкин В.А., Бецкий О.В. Миллиметровая наноструктурная медицина – нанотехнология будущего в биомедицинских радиоэлектронных технологиях. // Альманах клинической медицины. Том XVII, часть II, III Троицкая конференция «Медицинская физика и инновации в медицине». Москва, 2008. С.354-357.
5. Синицын Н.И., Ёлкин В.А., Бецкий О.В., Кислов В.В. Миллиметровые волны и наноструктуры – будущее медицины и биоэлектроники // Биомедицинская радиоэлектроника. 2009. №3. С.21-35
6. Линг Г. Физическая теория живой клетки. Незамеченная революция. – СПб.: Наука, 2008. -492с.
7. Суворов А.П., Синицын Н.И., Ёлкин В.А., Суворов С.А. Способ лечения больных очаговым облысением. – Патент на изобретение № 2364427. Зарегистрирован в Гос. реестре изобретений РФ 20 августа 2009 г.
8. Н.И. Синицын, В.А. Ёлкин, О.В. Бецкий Скорость структуризации тонких водосодержащих слоёв – важный фактор биомедицинских радиоэлектронных нанотехнологий будущего // III Евразийский конгресс по медицинской физике и инженерии «Медицинская физика – 2010» 21-25 июня 2010 г. Сборник материалов. Том 4. Москва, 2010. Типография МГУ. С. 319-322. Т 400 экз.

NEW PRINCIPLES OF PRELIMINARY TREATMENT OF ONCOLOGIC DISEASES OF A SKIN

N.I. Sinityn, V.A. Elkin, O.V. Betskii, V.A. Molochkov *,
A.P. Suvorov **, S.A. Suvorov **, G.I. Gurevich ***

The Saratov branch of Institute of a radio-engineering and electronics of V.A.Kotelnikova of the Russian Academy of Sciences,

** MSECI of M.F.Vladimirskogo,*

*** Saratov regional dermatovenerologic dispensary,*

**** Saratov oncologic dispensary.*

info@soire.renet.ru zet2004@mail.ru

New principles of build-up of the high-efficiency methods and instruments of early preliminary treatment of oncologic diseases of a skin educe.

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ
В ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**

В.И. Чиссов, И.В. Решетов, Н.Н. Волченко, Е.Н. Славнова, С.С. Сухарев

ФГУ «МНИОИ им.П.А.Герцена Росмедтехнологий»,
ФГОУ ИПК ФМБА России
E-mail: mniioict@mail.ru

Цель нашего исследования – определить роль Атомно-силовой микроскопии (АСМ) в цитологической диагностике опухолей и опухолеподобных процессов в щитовидной железе (ЩЖ).

Материалы и методы.

В работе использовался исследовательский комплекс Интегра производства «ЗАО НТ НДТ» г. Зеленоград, Россия. Исследовали 31 цитологический препарат опухолей щитовидной железы. Методы получения материала: тонкоигольная аспирационная биопсия под контролем УЗИ и соскобы с операционного материала.

Результаты исследования.

Морфологические параметры клеток ЩЖ, а также соотношения между ними, которые могут иметь дифференциально-диагностическое значение, представлены в Таблице 1.

ПАРАМЕТРЫ КЛЕТОК ПАПИЛЛЯРНОГО РАКА ЩЖ И НОРМАЛЬНЫХ КЛЕТОК, ПОЛУЧЕННЫЕ МЕТОДОМ АСМ					Таблица 1
КЛЕТКИ	Высота цитоплазмы нм	Высота ядра нм	Соотношение высот ядра и цитоплазмы	Высота ядрышка нм	Отношение высоты ядрышка над ядром к высоте ядра
ПР ЩЖ	266±74	605±103	2.5±1.2	943±224	0.63±0.43
Фолликулярная аденома ЩЖ	277±64	547±151	2.0±0.5	653±195	0.34±0.21
Коллоидный зоб ЩЖ	169±42	315±82	1.9±0.6	0	измерения не проводились

При исследовании папиллярного рака (ПР) ЩЖ методом АСМ обнаруживаются ядрышки в виде локальных возвышений. Одним из важных диагностических признаков является обнаружение внутриядерных включений цитоплазмы (инвагинаций цитоплазмы), глубина которых 290 ± 82 нм. Измерения морфометрических параметров с помощью АСМ при фолликулярной аденоме (ФА) ЩЖ показали, что значения отношения высоты ядрышка к высоте ядра отличаются при ПР ЩЖ и ФА и могут служить объективными критериями дифференциальной диагностики между этими патологическими процессами (для рака 0.63 ± 0.43 , для ФА 0.34 ± 0.21 , $p < 0.05$). Наши измерения показали, что клетки коллоидного зоба ЩЖ и ПР ЩЖ различаются статистически значимо ($p < 0.05$) по следующим параметрам: высота цитоплазмы, высота ядра, соотношение высот ядра и цитоплазмы (для коллоидного зоба 1.9 ± 0.6 , ПР ЩЖ 2.5 ± 1.2).

Заключение

Для ПР ЩЖ установлено достоверное увеличение указанного параметра по сравнению с клетками коллоидного зоба. Обнаружена тенденция к увеличению указанного параметра у клеток ПР ЩЖ по сравнению с фолликулярной аденомой ЩЖ. Установлено, что объективным критерием дифференциальной диагностики между ПР ЩЖ и фолликулярной аденомой может служить отношение высоты ядрышка к высоте ядра.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ В ЗАДАЧАХ ИССЛЕДОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

В.И. Чиссов, С.С. Сухарев, И.В. Решетов, Е.Н. Славнова

*ФГОУ ИПК ФМБА России»,
ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росздрава*

Задачи исследования. Представляемые опыты явились частью научно-исследовательской работы, посвященной изучению свойств разрабатываемой терапевтической наноконструкции (ТНК). В состав её входят антитела к эпидермальному фактору второго типа (HER2/Neu), белковая комплексирующая часть и ионы — прообразы будущей эффекторной части. Была поставлена задача изучения сохранности функций ТНК после воздействия на них плазмы крови, физраствора и крове-заменителей. Такие опыты — необходимая часть характеризации устойчивости ТНК к воздействию внутренней среды организма.

Материалы и методы. Ожидаемая концентрация ионов — прообразов эффекторной части ТНК существенно меньше распознаваемой современными методами качественного элементного анализа. Поэтому было решено оценивать сохранность тропности ТНК к HER2-положительным клеткам рака молочной железы (РМЖ) по степени ингибирования иммуноцитохимической реакции (ИЦХ) после инкубации с растворами, содержащим ТНК, а сохранность функции доставки эффекторной части — косвенно, сравнением шероховатости поверхности ядер клеток с шероховатостью ядер клеток, инкубированных с раствором ТНК, не претерпевших воздействия физиологических жидкостей или их заменителей. Использовался клеточный материал от пациенток, страдающих РМЖ с интенсивной продукцией HER2/Neu. Цитологические препараты после проведения обработки растворами, содержащими ТНК, подвергали ИЦХ и получали сканы их поверхностей средствами атомно-силовой микроскопии.

Результаты и выводы. И в результате ИЦХ, и в результате обработки растворами ТНК по периферии клеток средствами АСМ визуализировались «бортики». Ингибирование ИЦХ выражалось в легко документируемом уменьшении высоты и ширины этих «бортиков» на отдельных участках вплоть до исчезновения.

Те клетки, на которых рецепторы HER2 должны были быть заняты ТНК, характеризуются высокими значениями шероховатостей поверхностей (от 64 до 83 нм) в отличие от тех, на которых не должно было быть ТНК (например, после обычной ИЦХ шероховатость поверхностей клеток составляет от 20 до 30 нм).

Таким образом, хотя АСМ не позволяет визуализировать ТНК или иммунокомплексы, метод дает возможность по косвенным признакам мониторировать свойства тропности ТНК к опухоль-ассоциированным антигенам и их способность к доставке эффекторных частей в опухолевый очаг.

ATOMIC-FORCE MICROSCOPY AS A TOOL FOR TUMOR THERAPY NANOPARTICLES INVESTIGATION

V.I.Chissov, S.S.Sukharev, I.V.Reshetov, E.N.Slavnova

ЯДЕРНАЯ МЕДИЦИНА И НАНОТЕХНОЛОГИИ

ВЛИЯНИЕ МЕХАНОМАГНЕТОХИМИЧЕСКИ СИНТЕЗИРОВАННОГО МАГНИТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО НАНОКОМПЛЕКСА И НЕОДНОРОДНОГО ЛЕКТРОМАГНИТНОГО ОБЛУЧЕНИЯ НА КИНЕТИКУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА

*В. Э. Орел¹, А. Д. Шевченко², А. В. Романов¹, И.И. Дзятковская¹, Н. А. Николов¹,
Н. Н. Дзятковская¹, В. Н. Уваров², И. Б. Щепотин¹*

*¹Национальный институт рака, Киев, МЗ Украины
v-orel@i.com.ua*

*²Институт металлофизики им. Г.В. Курдюмова НАН Украины, Киев
admit@imp.kiev.ua*

Введение. Экспериментальные исследования, проведенные за последнее десятилетие свидетельствуют, о перспективе использования в качестве противоопухолевых препаратов магниточувствительного наноконплекса (МНК) на основе наночастиц оксида железа (Fe_3O_4) и противоопухолевого антибиотика антрациклинового ряда доксорубинина (ДР). Одной из проблем, которая тормозит внедрение в клиническую практику комплексного лечения онкологических больных с использованием МНК при радиочастотной гипертермии (ГТ) злокачественных опухолей, является наличие высоких температурных градиентов, сопровождающихся формированием термотолерантности и терморезистентности на клеточном уровне синтеза белков теплового шока [1].

Исходя из вышеупомянутого, целью данной работы было экспериментальное исследование возможности увеличения эффективности противоопухолевого действия МНК на основе наночастиц Fe_3O_4 , KCl и ДР после сухого механо- и/или магнетохимического синтеза и электромагнитного облучения (ЭО) животных-опухоленосителей при умеренной ГТ.

Материалы и методы. В работе исследовали МНК на основе наночастиц Fe_3O_4 со средним диаметром 20-40 нм, KCl , полученные с применением технологии электронно-лучевого испарения и конденсации в вакууме неорганических материалов производства Института электросварки им. Е. О. Патона и ДР производства Пфайзер, Италия.

Магнитные характеристики препарата исследовали методом магнитометрии на вибрационном магнитометре «Vibrating Magnetometer 7404 VSM» (фирма «Lake Shore Cryotronics, Inc.», США) в магнитных полях с напряженностью до 13000 эрстед. Чувствительность магнитометра составляет $\approx 10^{-7}$ эме, что позволяет выполнять измерения магнитного момента на образцах весом единицы миллиграмм.

Исследование влияния механо- и/или магнетохимически синтезированного МНК и последующего ЭО животных на противоопухолевую активность комплекса было проведено на 56 неинбредных крысах – самках весом (100 ± 15) г разводки вивария Национального института рака с подкожно перевитой карциномой Герена.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Трансплантацию опухолевых клеток карциномы Герена осуществляли введением крысам в правое бедро 30 % суспензии клеток в объеме 0,4 мл в среде 199.

Животные были распределены на 7 групп, каждая из которых состояла из 8 животных: 1 группа – контроль (без введения ДР, МНК и ЭО); 2 группа – введение ДР; 3 группа – введение ДР + ЭО; 4 группа – введение механохимически синтезированного (МХМС) МНК; 5 группа – введение механо- и магнетохимически синтезированного (ММГХС) МНК; 6 группа – введение МХМС МНК + ЭО; 7 группа – введение ММГХС МНК + ЭО.

Синтез МНК проводили следующим образом: противоопухолевый препарат ДР и магнеточувствительный наноноситель Fe_3O_4 с КСl механо- и/или магнетохимически синтезировали с интенсивностью подвода механической энергии 20 Вт/г и ЭО с частотой 40 МГц и выходной мощностью 50Вт в течение 5 мин в механомагнитном реакторе. Наноконкомплекс синтезировали за 20–40 мин перед введением его животным.

Введение ДР животным проводили в массовой концентрации 1,5 мг/кг, МНК: ДР – 1,5 мг/кг, Fe_3O_4 + КСl – 3 мг/кг. Введения осуществляли в объеме 0,3 мл в растворе NaCl в хвостовую вену животного. Введения препаратов и ЭО начинали на 3 день после перевивки опухоли и проводили 1 раз в 2 суток. Весь курс состоял из 3 инъекций и/или 3 сеансов ЭО.

В зоне опухоли располагали постоянный магнит с магнитной напряженностью 1990 А/м для локализации МНК в опухолевых клетках. Последующее неоднородное локальное ЭО опухолей проводили в течение 15 минс помощью аппарата «Магнитерм» при выходной мощности 100 Вт. При этом внутриопухолевая температура не превышала 37,9°C.

Все исследования на животных осуществляли в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите позвоночных животных.

Для оценки нелинейной динамики роста опухолей животных использовали фактор роста φ и коэффициент торможения опухоли, согласно [2].

Статистический анализ достоверности полученных данных проводили с помощью t критерия Стьюдента, используя компьютерную программу Statistica 6.0 с предыдущей проверкой гипотезы о нормальном законе распределения случайной величины по критерию Колмогорова–Смирнова.

Результаты и их обсуждение. Анализ результатов магнитных характеристик, приведенных в табл.1 и рис.1, свидетельствует, что механо- и магнетохимическая активация увеличивают удельный магнитный момент насыщения m_s во всех исследуемых образцах. При этом следует отметить усиливающий эффект ЭО в процессе механохимической активации как для ДР, так и для всего МНК, которые приобретают свойства, характерные для ферромагнетиков.

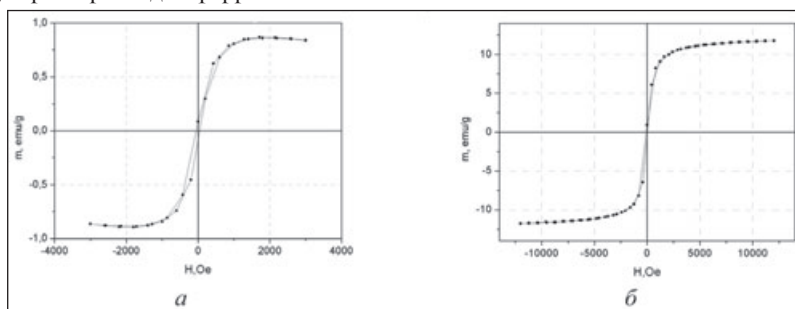


Рис.1. Зависимость удельного магнитного момента m от напряженности магнитного поля H при 20°C: а – образцы ДР (механо- и магнетохимически активированный) – магнитомягкий ферромагнетик ($H_c = 47,7$ Э); б – образцы Fe_3O_4 +КСl+ДР (ММГХС) – магнитомягкий ферромагнетик ($H_c = 45,7$ Э)

Таблица 1

МАГНИТНЫЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ ИССЛЕДОВАННЫХ ОБРАЗЦОВ ПРИ 20°C			
Образцы	Магнитный момент насыщения m_s , эме/г	Напряжённость магнитного поля для m_s H_{ms} , Э	Козрцитивная сила H_c , Э
ДР официальный*	0,200		
ДР (механохимически активированный)	0,4489	2142,9	34,126
ДР (механо-и магнетохимически активированный)	0,8804	1714,3	47,737
Fe ₃ O ₄ +KCl (механохимически активированный)	48,940	9000,0	52,952
Fe ₃ O ₄ +KCl+ДР (МХС)	6,7767	7714,3	78,951
Fe ₃ O ₄ +KCl+ДР (ММГХС)	11,781	12000	45,659

* диамагнетик: $m = -0,200$ эме/г

В таблице 2 приведены результаты изучения влияния механо- и/или магнетохимически синтезированного МНК и последующего ЭО животных на рост карциномы Герена. Анализ полученных результатов свидетельствует, что коэффициент торможения $k = 2,43$ был наибольший для 7-й группы животных, которым вводили ММГХС МНК и проводили одновременное ЭО. В этой группе животных также была зарегистрирована наибольшая выживаемость.

Таблица 2

ПАРАМЕТРЫ РОСТА КАРЦИНОМЫ ГЕРЕНА С 7 ПО 24-Е СУТКИ ПОСЛЕ ПЕРЕВИВКИ		
Группа животных	Фактор роста ϕ , сутки-1	Козэффициент торможения k , отн.ед.
1 группа – контроль (без введения ДР, МНК и ЭО)	0,31±0,04	1
4 группа – введение МХС МНК	0,28±0,04	1,08
2 группа – введения ДР	0,18±0,01*	1,66
6 группа – введение МХС МНК + ЭО	0,16±0,01*	1,94
3 группа – введение ДР + ЭО	0,16±0,02*	1,89
5 группа – введения ММГХС МНК	0,16±0,01*	1,88
7 группа – введения ММГХС МНК + ЭО	0,13±0,03*	2,43

* Статистически значимые отличия по сравнению с контролем с уровнем значимости $p < 0,05$.

Проанализируем возможные эффекты, инициировавшие противоопухолевое действие МНК. При сухом синтезе препарата в результате механохимической активации частиц Fe₃O₄, KCl и ДР происходили разрывы межмолекулярных связей, что вызывало возникновение свободных радикалов механохимической природы. При одновременном радиочастотном облучении возникала спиновая конверсия электронов МНК, увеличивая его магнитную восприимчивость.

Известно, что цитотоксическое действие ДР обусловлено реакцией свободнорадикального окисления. В частности, при взаимодействии с ДНК посредством интеркалирования агликона ДР ингибирует прогрессию фермента топоизомеразы II регулирующего пространственную (топологическую) структуру ДНК и тем самым нарушает процесс репликации, тормозя клеточный цикл и задерживая пролиферацию опухолевых клеток.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

Согласно математической модели [3] в условиях повышения тепловой энтропии, инициированной пространственно неоднородным электромагнитным полем, запишем:



где TOP – топоизомераза; DNA^* – поврежденное ДНК, не способное к репликации.

В определенных пределах, когда уровень свободных радикалов выше метаболического (нормального) z_0 , но насыщение предельной скорости реакции не происходит, зависимость константы скорости реакции (1) от количества свободных радикалов можно считать линейной. Тогда, можно записать:

$$k' = \frac{z}{z_0} k, \quad (2)$$

где k' – константа скорости реакции при повышенном уровне свободных радикалов z , k – константа скорости реакции для того же количества вещества реагентов при метаболическом уровне свободных радикалов z_0 .

Пусть количество свободных радикалов сразу после окончания процесса ММГХС увеличилось в b раз. Количество свободных радикалов z в комплексе уменьшается по экспоненциальному закону до своего метастабильного уровня z_0

$$z = z_0 + (bz_0 - z_0)e^{-pt} \quad (3)$$

где p – константа скорости релаксации свободных радикалов, bz_0 – количество свободных радикалов сразу после окончания процесса синтеза. Наличие внешнего электромагнитного облучение приводит к увеличению среднего времени жизни свободных радикалов и уменьшению константы скорости рекомбинации p . С учетом (3) константа скорости реакции (2) будет определяться:

$$k' = \left(1 + (b-1)e^{-pt}\right) k. \quad (4)$$

Уравнение (4) позволяет оценить усиление противоопухолевого эффекта МНК при локальном неоднородном электромагнитном облучении опухоли.

Выводы

1. Механо- и/или магнетохимический синтез увеличивают удельный магнитный момент доксорубина и магниточувствительного наноконплекса на основе Fe_3O_4 , КС1 и доксорубина.

2. Использование механомагнетохимически синтезированного магниточувствительного наноконплекса и последующее локальное неоднородное электромагнитное облучение перевивной опухоли карциномы Герена при умеренной гипертермии позволяют повысить противоопухолевый эффект доксорубина.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Peng X. H., Qian X., Mao H. et al. Targeted magnetic iron oxide nanoparticles for tumor imaging and therapy // Int J Nanomedicine. – 2008. – 3(3). – P. 311–321.
2. Эмануэль Н. М. Кинетика экспериментальных опухолевых процессов. – Москва: Наука, 1977. – 419 с.
3. Orel V. E., Romanov A. V. The Effect of Spatially Inhomogeneous Electromagnetic Field and Local Inductive Hyperthermia on Nonlinear Dynamics of the Growth for Transplanted Animal Tumors // Nonlinear Dynamics / edited by Todd Evans. – Croatia: INTECH, 2010. – P. 285–308.

INFLUENCE MECHANOMAGNETOCHEMICALLY SYNTHESIZED
MAGNETOSENSITIVE NANOCOMPLEX AND SPATIALLY INHOMOGENEOUS
ELECTROMAGNETIC IRRADIATION ON KINETICS OF TUMOR GROWTH

V.E. Orel¹, A.D. Shevchenko, A.V. Romanov, I.I. Dzyatkovska,
N.A. Nikolov, N.N. Dzyatkovskaya, V.N. Uvarov, I.B. Shepotin,

*National Cancer Institute, Kiev, Ukraine,
v-orel@i.com.ua*

*G.V. Kurdyumov Institute for Metal Physics of National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev, Ukraine,
admit@imp.kiev.ua*

Mechano- and/or magnetochemical synthesis increases the specific magnetic moment of doxorubicin (DR) and magnetosensitive nanocomplex (MNC) based on Fe₃O₄, KCl and DR. Using mechanomagnetochemical synthesized MNCs and subsequent local irradiation of inhomogeneous electromagnetic field of transplantable tumors Guerin at moderate hyperthermia improved the antitumor effect of DR.

ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ

**В.И. Чиссов¹, В.Я. Панченко², И.В. Решетов¹, С.М. Деев³, В.А. Головаченко⁴,
Д.Ю. Чувилин², Е.Н. Славнова¹, В.А. Загрядский², А.В. Шатров²,
Е.А. Иванова⁵, С.С. Сухарев⁵**

¹ ФГУ «МНИОИ им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»

² РНЦ «Курчатовский институт»

³ Институт биоорганической химии им.М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН

⁴ ООО «ТМП»

⁵ ФГОУ ИПК ФМБА России

Цель исследования – Изучение устойчивости в физиологических жидкостях и биораспределения в организме лабораторного животного терапевтических наночастиц - олигомерных наноконструкций (ОГНК), предназначенных для лечения опухолей, характеризующихся гиперэкспрессией антигена HER-2/neu.

Материалы и методы

Строение ОГНК

Изучаемые ОГНК [1] имеют три части:

- адресная часть – гуманизированные [2] противоопухолевые анти-HER2/neu-мини-антитела 4D5;
- эффекторная часть – радиоизотопы, продуцирующие α - и γ -излучение.
- хелатор, способный связывать радиоизотопы.

Биологическая модель

Используется оригинальная двухбарьерная методика противодействия тканевому иммунитету: иммунодепрессивным лабораторным животным (мыши – «нуды») имплантируется образец человеческой опухоли с гиперэкспрессией HER2/neu. Поскольку регион под твердой мозговой оболочкой представляет собой иммунопривлекательную зону, получается, что создан второй (наряду с общей скломпрометированностью иммунитета) барьер, препятствующий возникновению иммунного ответа у лабораторного животного в отношении подсаженных опухолевых клеток человека.

Алгоритм определения устойчивости ОГНК в биологических жидкостях

1. Подтверждение высокого уровня экспрессии посредством ИЦХ и FISH-реакции (fluorescent *in situ* hybridization).

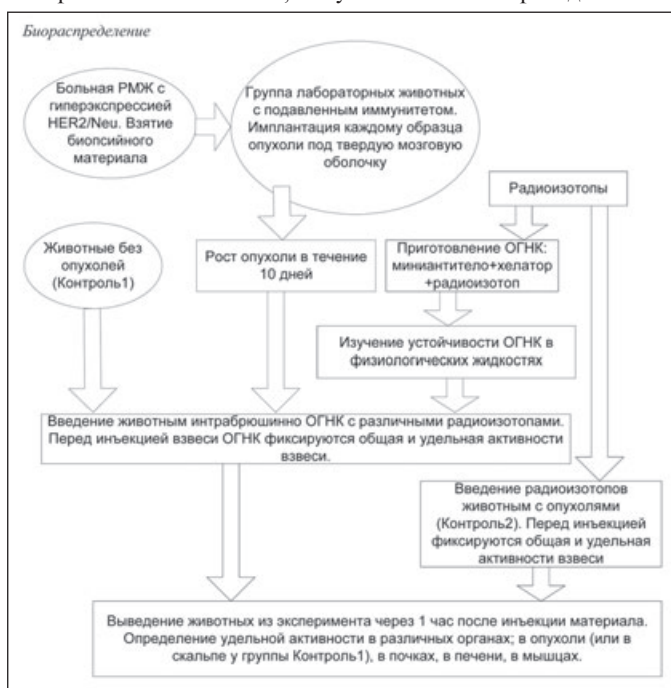
НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

2. Инкубация биологического материала на предметном стекле с каплей взвеси нативных ОГНК, затем снова проведение ИЦХ. Если интенсивность ИЦХ уменьшается по сравнению с п.2 (световой микроскоп), это означает ингибирование связывания ИЦХ-реагентов с рецепторами HER2 - рецепторы оказываются занятыми ОГНК.

3. Далее п.2 выполняется еще 4 раза с дополнением: биологический материал инкубируется со взвесью ОГНК, разбавленной 1:1 исследуемой физиологической жидкостью: воловен, реополиглоктин, физиологический раствор и плазма крови.

4. Степень уменьшения интенсивности ИЦХ при проведении исследований в п.3 коррелирует с интенсивностью связывания ОГНК с рецепторами и косвенно – с их устойчивостью.

5. В результате конкурентного ингибирования в препаратах появляются клетки с очень слабой окраской – HER2-рецепторы этих клеток заняты ОГНК. Измерив средствами АСМ шероховатости поверхностей слабо окрашенных клеток, косвенно оценим сохранность всех частей конструкции по степени близости указанных шероховатостей к шероховатостям клеток, полученным после проведения п.2.



Результаты исследования

После вывода животных из эксперимента готовились препараты: опухоли (или, для контрольных животных, комбинированный костно-кожный препарат из той же области, где у опытных животных прививались опухоли), почек, печени, костно-мышечный препарат бедра в качестве примера той области, где заведомо невозможно присутствие рецепторов HER2.

Все биологические препараты исследовались с применением γ -детектора. Точно фиксировались следующие параметры препаратов: общая и удельная активности взвеси ОГНК перед инъекцией, время, прошедшее с момента инъекции до измерения активности в биологическом препарате, вес биологического препарата.

Отслеживание указанных параметров позволило нормировать все результаты на вес и на время, прошедшее с момента точного измерения активности вводимой взвеси ОГНК для учета естественного распада радиоизотопа.

В результате вычислений получены приведенные удельные активности в органах опытных и контрольных животных, представленные в таблице.

СРЕДНИЕ ПРИВЕДЕННЫЕ УДЕЛЬНЫЕ АКТИВНОСТИ В ОРГАНАХ ЖИВОТНЫХ			<i>Таблица</i>
	Инъекции ОГНК		Инъекции неконъюгированных изотопов
Анатомическая область	Опытные животные	Контроль1	
Препарат опухоли или костно-кожный лоскут (Контроль1)	5,13	0,47	Ниже предела чувствительности детектора
Почки	8,14	9,08	7,67
Печень	0,53	0,44	0,44
Костно-мышечный препарат	0,25	0,39	0,44
Взвесь ОГНК перед инъекцией	2,46	2,46	5,62

При подготовке препаратов все опухоли удалялись обязательно так, чтобы не было опухолевого роста в крае препарата. Поэтому представленная в таблице удельная приведенная активность относится ко всему препарату. Для оценки этого параметра непосредственно в опухоли рассмотрим препарат, где опухоль располагалась экстракраниально, подрастала к коже и окружающие ткани не были воспалены. Препарат имел вид округлого кожного лоскута диаметром 8-9 мм, в центральной части которого визуализировались опухолевые массы, диаметр опухоли составлял 7-8 мм.

Обозначим: СТА – общая приведенная активность опухолевого препарата; НА – удельная приведенная активность здоровой ткани; СWT – вес опухолевого препарата; WT – вес опухоли в опухолевом препарате; WH – вес здоровой ткани в опухолевом препарате;

x – искомая удельная активность опухолевой ткани. Очевидно, $СТА = НА * WH + x * WT$ (I). Общий вес опухолевого препарата известен из непосредственных измерений – 0,021 г.

Общая приведенная активность опухолевого препарата равна $0,021 * 5,13 = 0,10773$ (удельная активность взята из таблицы). Учитывая, что линейные размеры опухолевой массы в препарате составляют примерно 0,8 от линейных размеров всего препарата, и то, что отношение масс равно кубу отношения линейных размеров, можем считать, что вес опухоли и вес здоровой ткани в составляют примерно по половине веса опухолевого препарата, то есть по 0,0105 г. Приведенную удельную активность здоровой ткани возьмем из таблицы, то есть положим 0,47. Подставляя эти значения в уравнение (I) и решая относительно x , получим $x = 9,79$.

Заключение

- ОГНК находятся под влиянием физиологических процессов, в частности почки их активно концентрируют. Это видно из того, что почки являются (кроме опухоли) единственным органом, где приведенная удельная активность превосходит таковую для инъецируемой суспензии.

- Считая, что после эвтаназии все физиологические процессы в организме животного прекращаются, можем отметить тенденцию к накоплению ОГНК в ткани, несущей рецепторы HER2 - через час после инъекции в опухоли наблюдается примерно двадцатикратное превышение удельной активности над здоровыми тканями той же локализации. Это можно объяснить тропностью ОГНК к рецепторам HER2 и сохранностью в их составе эффекторных ионов радиоизотопа.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ОНКОЛОГИИ

1. I.V. Reshetov, S.M. Deev, D.Y. Chuvilin, V.Y. Panchenko, S.S. Sukharev, E.A. Streltsova. Hybrid Nanoparticles Targeted by Antitumor Antibodies and Emitting Alpha-particles. Technical Proceedings of the 2009 Nanotechnology Conference and Trade Show, Vol. 2, pp:162 – 163.
2. С.М.Деев, О.Л.Полянский. Моноклональные антитела для диагностики и терапии. Биотехнология, 2008, № 2, с. 1-11.

APPROACHES NO INVESTIGATION OF NANOPARTICLES FOR THERAPY OF TUMORS

V.I. Chissov, V.Ya. Panchenco, I.V. Reshetov, S.M. Deev, V.A. Golovachenco,
D.Yu. Chuvilin, E.N.Slavnova, V.A. Zagryadsky, A.V. Shatrov, E.A. Ivanova, S.S. Sukharev

СОДЕРЖАНИЕ

БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

ЦЕМЕНТЫ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ

*Баринов С.М., Комлев В.С., Гурин А.Н.,
Фадеева И.В., Бакунова Н.В., Фомин А.С.*

3

ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ УСЛОВИЙ СИНТЕЗА НА СВОЙСТВА МАТЕРИАЛОВ В СИСТЕМЕ ГИДРОКСИАПАТИТ – КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ

*Гольдберг М.А.¹, Смирнов В.В.¹, Куцев С.В.¹,
Меледин А.А.¹, Баринов С.М.¹, Сергеева Н.С.²,
Свиридова И.К.², Кирсанова В.А.², Ахмедова С.А.²*

13

ПОЛУЧЕНИЕ И СВОЙСТВА КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА, СОДЕРЖАЩИХ ТИТАН

*А.А. Егоров, В.В. Смирнов, А.С. Лысенков, Н.В. Бакунова,
С.В. Куцев, С.М. Баринов*

17

ЗАВИСИМОСТЬ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ НАНОРАЗМЕРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ ОТ ИХ ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИХ СВОЙСТВ

Каплун А.П., Безруков Д.А., Швец В.И.

19

МАТЕРИАЛЫ ДЛЯ КОСТНЫХ ИМПЛАНТОВ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ И СТЕКОЛ В СИСТЕМЕ $CaO-P_2O_5$

Кузнецов А.В.¹, Сафронова Т.В.², Путляев В.И.³

23

БИФАЗНАЯ РЕЗОРБИРУЕМАЯ КЕРАМИКА ТКФ/ПФК, ПОЛУЧЕННАЯ ИЗ ПРОДУКТОВ РАЗЛОЖЕНИЯ ОКТАКАЛЬЦИЕВОГО ФОСФАТА

Кукуева Е.В., Путляев В.И., Сафронова Т.В.

25

ОЦЕНКА СВОЙСТВ РАЗЛИЧНЫХ БИОМАТЕРИАЛОВ С ЦЕЛЬЮ СОЗДАНИЯ БИОИНЖЕНЕРНЫХ ТРАНСПЛАНТАТОВ

Решетов И.В., Васильев А.В., Батухтина Е.В., Киселева Е.С.

27

ИЗУЧЕНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ БИОСОВМЕСТИМОСТИ И БИОРЕЗОРБЦИИ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ БИОЛАКТИДОВ ПРИ ПОДКОЖНОЙ ИМПЛАНТАЦИИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ ЖИВОТНЫМ

*Решетов И.В., Филошин М.М., Ратушный М.В., Васильев В.А.,
Сухарев С.С., Попов В.К., Кротова Л.И.*

28

**РАЗРАБОТКА И ИССЛЕДОВАНИЕ СПЕКТРА
НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ МАТЕРИАЛОВ
И ТКАНЕИНЖЕНЕРНЫХ КОНСТРУКЦИЙ
С АУТОЛОГИЧНЫМИ МУЛЬТИПОТЕНТНЫМИ
МЕЗЕНХИМАЛЬНЫМИ СТРОМАЛЬНЫМИ
КЛЕТКАМИ НА ИХ ОСНОВЕ ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ
КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ**

*Свиридова И.К.¹, Сергеева Н.С.¹, Баринов С.М.²,
Кирсанова В.А.¹, Ахмедова С.А.¹, Комлев В.С.², Фадеева И.В.²,
Смирнов В.В.², Шанский Я.Д.², Мыслевцев И.В.¹*

30

**ЛЕКАРСТВЕННЫЕ ПРЕПАРАТЫ
НА ОСНОВЕ НАНОМАТЕРИАЛОВ**

**ВОЗМОЖНОСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОЧАСТИЦ
СЛОЖНОГО ОКСИДА ЖЕЛЕЗА (МАГНЕТИТА)
ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ И ЛЕЧЕНИЯ
ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ**

*Акопджанов А.Г., Науменко В.Ю.,
Сергеев А.И., Шимановский Н.Л.*

34

**ПРОТИВООПУХОЛЕВЫЕ ЛИПОСОМЫ
С ЛИПОФИЛЬНЫМИ ПРОЛЕКАРСТВАМИ
И УГЛЕВОДНЫМ ЛИГАНДОМ СЕЛЕКТИНОВ**

*Водовозова Е.Л.¹, Кузнецова Н.Р.¹, Моисеева Е.В.¹,
Бовин Н.В.¹, Сингин А.С.², Гранфис К.³*

37

**ХИМИОТЕРАПИЯ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
ГЛИОБЛАСТОМЫ С ПОМОЩЬЮ НАНОСОМАЛЬНОЙ
ФОРМЫ ДОКСОРУБИЦИНА**

Гельперина С.Э.¹, Халанский А.С.², Швец В.И.³

41

**ВЛИЯНИЕ НАНОКРИСТАЛЛИЧЕСКОГО ДИОКСИДА ЦЕРИЯ
НА АКТИВНОСТЬ ПРЕПАРАТА ЛАФЕРОН-ФАРМБИОТЕК™**

*Жолобак Н.М., Кривоухатская Л.Д., Щербаков А.Б.,
Олевинская З.М., Богорад-Кобельская Е.С., Спивак Н.Я., Иванов В.К.,
Полежаева О.С., Баранчиков А.Е., Шаповров А.С., Третьяков Ю.Д.*

44

**ПРОИЗВОДНЫЕ Фуллеренов
КАК БИОЛОГИЧЕСКИ
АКТИВНЫЕ СОЕДИНЕНИЯ
И СРЕДСТВА ДИАГНОСТИКИ**

*Котельников А.И., Котельникова Р.А., Богданов Г.Н.,
Мищенко Д.В., Горячев Н.С., Баринов А.В., Рыбкин А.Ю.,
Смолина А.В., Полетаева Д.А., *Романова В.С.*

48

**ПЕРСПЕКТИВЫ ПОЛУЧЕНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ
ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ЛИПОСОМАЛЬНЫХ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ**

Краснопольский Ю.М., Степанов А.Е., Швец В.И.

49

- PERSPECTIVES IN R&D OF NANOSIZED ANTITUMOR LIPOSOMAL PREPARATIONS**
Krasnopol'sky Y.M., Stepanov A.E., Shvets V.I. 53
- МАГНИТОУПРАВЛЯЕМЫЕ МНОГОФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ КОНСТРУКЦИИ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВОГО МОДУЛЯ БАРНАЗА-БАРСТАР**
Никитин М.П.^{1,2}, Здобнова Т.А.², Лукаш С.В.², Стрёмовский О.А.², Деев С.М.² 54
- НАНОСТРУКТУРНЫЕ КОМПОЗИТЫ ДЛЯ ЛАЗЕРНОЙ ГИПЕРТЕРМИИ: РАЗЛИЧНЫЕ АСПЕКТЫ БЕЗОПАСНОСТИ**
Панкратов А.А., Андреева Т.Н., Якубовская Р.И., Козан Б.Я., Бутенин А.В., Фейзулова Р.А., Рудой В.М. 55
- ЭФФЕКТИВНОСТЬ КОНЬЮГАТА ДНК-ДОКСОРУБИЦИН У КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ КАР-ЦИНОМОЙ**
Пятаев Н.А., Плотицкова Н.А., Минаева О.В., Скопин П.И., Шукин С.А., Коровина Е.Ю. 59
- КЛАССИФИКАЦИЯ ЛИПОСОМ ПО СПОСОБАМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**
Сейфулла Р.Д. 63
- КОЛЛОИДНЫЕ ЧАСТИЦЫ ЗОЛОТА КАК СРЕДСТВО НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЦИТОСТАТИКОВ: ПРОСПИДИНА И ЦИСПЛАТИНА**
Соломевич С.О.¹, Бычковский П.М.¹, Кладиев А.А.², Щеголев С.Ю.³, Богатырев В.А.³, Юрkitович Т.Л.¹, Капуцкий Ф.Н.¹, Беляев С.А.¹, Красный С.А.⁴, Истомин Ю.П.⁴, Александрова Е.Н.⁴ 66
- БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ГИБРИДНЫХ НАНОСТРУКТУР НА ОСНОВЕ ФУЛЛЕРЕНА C60 И ИХ ПРИМЕНЕНИЕ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ**
Файнгольд И.И., Котельникова Р.А., Котельников А.И., Коновалова Н.П., Мищенко Д.В., Полетаева Д.А., Богданов Г.Н., Романова В.С. 68
- ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПЛАЗМИДНОГО ВЕКТОРА, СОДЕРЖАЩЕГО КДНК Т-КАДГЕРИНА, ДЛЯ ИЗМЕНЕНИЯ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ КЛЕТОК МЫШИНОЙ МЕЛАНОМЫ В16F10**
Юрлова Е.И., Рубина К.А., Сысоева В.Ю., Ткачук В.А. 71
- ЭФФЕКТИВНОСТЬ И БЕЗОПАСНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВОГО ПРЕПАРАТА НА ОСНОВЕ ЦИКЛОДЕКСТРИНОВОГО КОМПЛЕКСА ФТАЛОЦИАНИНА КОБАЛЬТА**
Р.И.Якубовская, А.А.Панкратов, Ю.Б.Венедиктова, О.А.Безбородова, Е.Р.Немцова, А.Н.Калиниченко, В.И.Чиссов, Г.Н.Ворожцов 73

**CELLULAR UPTAKE AND TRANSCELLULAR TRANSPORT
OF BENEFICIAL FOOD COMPOUNDS
FROM SUBMICRO/NANOMETER SCALE FORMULATIONS**
K. Briviba, S. Unser, CE Rüefer, P. Butz 76

**THE INFLUENCE OF HUMAN INTRON INSERTION
ON EUKARYOTIC VECTOR EXPRESSION**
*M.A Karimi¹, N. Pirooznia¹, M. Eskandani¹,
F. Rahbarizadeh² and S. Hasannia^{*1}* 79

**OVERCOMING BIOLOGICAL BARRIERS OF TARGETED TUMOR
THERAPY USING ULTRASOUND-RESPONSIVE
DRUG LOADED NANOPARTICLES**
Natalya Rapoport 80

НАНОТЕХНОЛОГИИ В ДИАГНОСТИКЕ ХИРУРГИИ РОБОТОТЕХНИКЕ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ
МОЛЕКУЛ АЛЬБУМИНА С НАНОЧАСТИЦАМИ
ЗОЛОТА И КРЕМНИЯ В ВОДНЫХ РАСТВОРАХ
С ПОМОЩЬЮ МЕТОДА
ФОТОННО-КОРРЕЛЯЦИОННОЙ СПЕКТРОСКОПИИ**
Аненкова К.А., Гибизова В.В., Федорова К.В. 83

**ИССЛЕДОВАНИЕ СТРУКТУРЫ И ПРОЦЕССА
РАЗЛОЖЕНИЯ ПЛЕНОК ИЗ ПОЛИ-3-ГИДРОКСИБУТИРАТА
И ЕГО КОМПОЗИТОВ С ЛЕКАРСТВЕННЫМИ ВЕЩЕСТВАМИ**
*Багров Д.В.¹, Бонарцев А.П. ¹, Босхомджиев А.П.²,
Махина Т.К.², Мышкина В.Л.², Филатова Е.В.², Яковлев С.Г.²,
Воинова В.В.¹, Бонарцева Г.А.², Шайтан К.В.¹* 84

**ВОЗМОЖНОСТИ КОГЕРЕНТНОЙ
ФАЗОВО-ИНТЕРФЕРЕНЦИОННОЙ МИКРОСКОПИИ
В ДИАГНОСТИКЕ НАРУШЕНИЙ
ТРОМБОЦИТАРНОГО ЗВЕНА ГЕМОСТАЗА
У ОНКОЛОГИЧЕСКИХ БОЛЬНЫХ**
*Василенко И.А., Матвеева А.В., Кастрикина И.С.,
Быченков О.А., Бабакова С.В., Метелин В.Б.* 87

**НАНОСТРУКТУРНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ ТКАНЕЙ
ПРИ ОНКОЛОГИЧЕСКОЙ ПАТОЛОГИИ НА ОСНОВЕ ИСПОЛЬЗОВА-
НИЯ СИНХРОТРОННОГО ИЗЛУЧЕНИЯ**
*А.А. Вазина^{1,3}, А.А. Васильева¹, А.В. Забелин³, Н.Ф. Ланина¹,
Е.И. Маевский¹, В.Н. Корнеев², Г.Н. Кулипанов⁴, Т.А. Куприянова⁵,
В.П. Летягин⁶, В.Г. Станкевич³, А.Л. Черняев⁷* 91

**НОВЫЙ КОНЦЕПТУАЛЬНЫЙ ПОДХОД
К ХИРУРГИЧЕСКОМУ ЛЕЧЕНИЮ ГЛИОМ
БОЛЬШИХ ПОЛУШАРИЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ НАНОБИОТЕХНОЛОГИЙ**
Грачёв Ю.Н. 95

ПРОИЗВОДНЫЕ ФУЛЛЕРЕНОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ХИМИОТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ <i>Коновалова Н.П., Котельникова Р.А., Гончарова С.А., Файнгольд И.И., Мищенко Д.В., Раевская Т.А., Берсенева Е.Н., Сашенкова Т.Е., Блохина С.В., Богданов Г.Н., Трошин П.А., Хакина Е.А., Романова В.С., Котельников А.И.</i>	97
КРЕМНИЕВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ КАК ЭФФЕКТИВНЫЕ СОНОСЕНСИБИЛИЗАТОРЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ С ПОМОЩЬЮ УЛЬТРАЗВУКА <i>Осминкина Л.А., Гонгальский М.Б., Тимошенко В.Ю., Кудрявцев А.А.</i>	98
БИОЛОГИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ТРАНСПОРТНОГО МОДУЛЯ ВНУТРИСОСУДИСТОГО МИКРОРОБОТА. <i>Решетов И.В., Саврасов Г.В., Васильев В.Н., Башлай А.П., Сухарев С.С., Копылов А.В.</i>	101
РЕЗУЛЬТАТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО И КЛИНИЧЕСКОГО ЭТАПА АПРОБАЦИИ МИНИТИТАНОВЫХ ПЛАСТИН С НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫМИ ПОКРЫТИЯМИ ДЛЯ РЕКОНСТРУКЦИИ ЛИЦЕВОГО СКЕЛЕТА <i>И.В. Решетов, Д.В.Штанский, М.В.Ратушный, М.М.Филюшин, С.С.Сухарев</i>	103
ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ РЗЭ-СОДЕРЖАЩИХ НЕОРГАНИЧЕСКИХ МАТЕРИАЛОВ В МРТ И ИК-ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ ДИАГНОСТИК И НЗТ ОПУХОЛЕЙ <i>К.В. Родионов¹, А.В. Рябова¹, А.В. Попов¹, В.А. Крутько², О.Б. Петрова³, Ю.К. Воронько¹, В.Б. Лощенов¹</i>	105
ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ВНУТРЕННЕЙ СТРУКТУРЫ КЛЕТОК МЕТОДАМИ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ <i>Роскошная А.С., Багров Д.В., Онищенко Г.Е., Шайтан К.В.</i>	106
СПЕКТРОСКОПИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ МОНИТОРИНГА НАНОЧАСТИЦ В БИОЛОГИЧЕСКИХ ТКАНЯХ <i>IN VIVO</i> <i>Т.А. Савельева, С.Ю. Васильченко, А.В. Рябова, В.Б. Лощенов</i>	108
ТЕХНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ТРАНСПОРТНОГО МОДУЛЯ ВНУТРИСОСУДИСТОГО МИКРОРОБОТА <i>Саврасов Г.В., Копылов А.В., Башлай А.П.</i>	111
НОВЫЕ ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ КОЖИ <i>Н.И. Ситицын, В.А. Ёлкин, О.В. Бецкий, В.А. Молочков, А.П. Суворов, С.А. Суворов, Г.И. Гуревич</i>	110

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ
В ЦИТОЛОГИЧЕСКОЙ ДИАГНОСТИКЕ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЩИТОВИДНОЙ ЖЕЛЕЗЫ**
*В.И. Чиссов, И.В. Решетов, Н.Н. Волченко,
Е.Н. Славнова, С.С. Сухарев* 115

**АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ
В ЗАДАЧАХ ИССЛЕДОВАНИЯ НАНОЧАСТИЦ
ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ**
В.И. Чиссов, С.С. Сухарев, И.В. Решетов, Е.Н. Славнова 116

ЯДЕРНАЯ МЕДИЦИНА И НАНОТЕХНОЛОГИИ

**ВЛИЯНИЕ МЕХАНОМАГНЕТОХИМИЧЕСКИ
СИНТЕЗИРОВАННОГО МАГНИТОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО
НАНОКОМПЛЕКСА И НЕОДНОРОДНОГО
ЛЕКТРОМАГНИТНОГО ОБЛУЧЕНИЯ
НА КИНЕТИКУ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО
ОПУХОЛЕВОГО ПРОЦЕССА**
*В. Э. Орел¹, А. Д. Шевченко², А. В. Романов¹,
И.И. Дзятковская¹, Н. А. Николов¹,
Н. Н. Дзятковская¹, В. Н. Уваров², И. Б. Щепотин¹* 117

**ПОДХОДЫ К ИССЛЕДОВАНИЮ
НАНОЧАСТИЦ ДЛЯ ТЕРАПИИ ОПУХОЛЕЙ**
*В.И. Чиссов¹, В.Я. Панченко², И.В. Решетов¹, С.М. Деев³,
В.А. Головаченко⁴, Д.Ю. Чувилин², Е.Н. Славнова¹,
В.А. Загрядский², А.В. Шатров²,
Е.А. Иванова⁵, С.С. Сухарев⁵* 121