

НАНОТЕХНОЛОГИИ

С.Ю. Васильченко¹, А.В. Рябова¹, А.А. Стратонников¹,
П.В. Грачев¹, В.А. Трофимов¹, А.Е. Ермаков²,
В.Н. Калинин³, В.И. Конов¹, В.Б. Лоценов¹

Использование потенцирующих световое воздействие биосовместимых магнитных наночастиц для диагностики и терапии опухолей в эксперименте

¹ЦЕНИ ИОФ РАН, Москва

²ИФМ УрО РАН, Екатеринбург

³ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва

На сегодняшний день смертность от рака составляет 25 %, и поиск методов его ранней своевременной диагностики и эффективной терапии является одним из приоритетных направлений современной науки. Общеизвестно, что одним из наиболее перспективных подходов для решения этой задачи является использование нанотехнологий. Работой в этой области занимается большое число групп в государственных исследовательских лабораториях, университетах и частных компаниях в России и за рубежом.

В ходе нашей работы были разработаны методы функционализации наночастиц различными биополимерами с целью повышения селективности накопления наночастиц в опухолях. Также разработаны волоконно-оптические методы неинвазивного оптического детектирования наночастиц в биотканях в режиме реального времени на основе методов спектроскопии диффузного отражения. Проведены исследования противоопухолевой активности коллоидных субстанций на основе магнитных наночастиц при оптическом воздействии *in vivo* на животных с модельными опухолями с целью выявления наиболее перспективных композиций и наиболее эффективных режимов воздействия.

Н.В. Класен, В.В. Кедров, В.Н. Курлов, Ю.А. Осипьян,
И.М. Шмытко, С.З. Шмурак, С.И. Божко, О.А. Кривко,
Е.А. Кудренко, Г.К. Струкова, Н.П. Кобелев

Применение нанотехнологий для повышения скорости и информативности медицинской диагностики

Институт физики твердого тела РАН, Черноголовка

Применение нанотехнологий для создания биочипов существенно ускоряет диагностические процедуры медицинских анализов по выявлению вирусов, злокачественных клеток и других патогенных объектов. Данное сообщение посвящено исследованиям ИФТТ РАН в области наносцинтилляторов и наноступенированных поверхностей, способным многократно ускорить разработки новых диагностических биочипов и повысить быстродействие и информативность биомедицинской диагностики *in vitro*. Но наибольшие новизна и важность наших результатов состоят в том, что с помощью наносцинтилляторов создается принципиально новый вид диагностики *in vivo*, позволяющий экспрессно обнаруживать непосредственно в обследуемом организме на ранних стадиях их зарождения вирусы, злокачественные образования и другие безвредные биообъекты, определять их тип и места локализации. Существенным достоинством применения наносцинтилляторов для диагностики *in vivo* является возможность сразу же в процессе диагностирования разрушать выявленные патогенные образования.

Указанные разработки основаны на ряде особых свойств наносцинтилляторов и наноступенек. В наносцинтилляторах обнаружены особенности атомарной структуры, оптических и рентгенодифракционных характеристик, а также способности избирательно взаимодействовать с теми или иными органическими объектами на молекулярном уровне, сигнализируя об этом изменениями своих оптических спектров и рентгенограмм. Все эти особенности определяются значительно повышенным вкладом приповерхностных областей в общую энергию наночастиц. Наноступеньки, у которых высота, атомарный состав, периодичность расположения и адсорбционная активность легко регулируются подбором типа мо-

нокристаллической подложки и углами отклонения поверхности монокристалла от рациональных кристаллографических направлений, способны обеспечить локализованную адсорбцию наночастиц и биомолекулярных объектов заданных типов. Это значительно облегчает и ускоряет подбор адекватных пар «наносцинтиллятор – биообъект», избирательное связывание которых необходимо отработать для создаваемых методик диагностики различных патологий с помощью атомно-силовой микроскопии и локальной оптической спектроскопии. Кроме того, использование наноступенированных поверхностей открывает широкие возможности создания новых типов более эффективных и экономичных биочипов для медицинской диагностики.

Разрабатываемый нами процесс диагностирования биомолекулярных образований *in vitro* начинается с размещения наносцинтилляторов (подобранных для биообъектов данного типа) на специально образованных для них наноступеньках (т.е. создания биочипа). Далее осуществляется взаимодействие анализируемой пробы (жидкой или газообразной) с данным биочипом. В случае наличия в пробе тех или иных искомым биообразований произойдет их адсорбция предназначенными для них наносцинтилляторами, что вызовет изменение оптических характеристик последних (спектров излучения, поглощения или рассеяния), которое будет зафиксировано соответствующими оптико-микроскопическими методиками.

Диагностирование наличия патогенных образований *in vivo* начинается с введения в обследуемый организм наночастиц, подобранных описанными выше методами для распознавания определенных типов биообъектов путем избирательной адсорбции. В результате адсорбции имеющихся безвредных объектов произойдет изменение атомарной структуры наночастиц, модифицирующее угловую картину их рентгеновской дифракции. Поэтому определение факта и места наличия патогенных биообъектов того или иного вида будет производиться сканирующей дифракционной рентгенографией обследуемого организма. Для разрушения обнаруженных патологий достаточно будет кратковременно облучить соответствующий участок организма усиленным рентгеновским потоком. Необходимые для этого дозы облучения будут существенно снижены по сравнению с обычной лучевой терапией двумя факторами: резонансным поглощением рентгеновских квантов наночастицами, включающими в себя те же металлы, что и в излучающем аноде, и прямой передачей поглощенной энергии адсорбированным на них биообъектом.

Я.В. Лавровский

Технологическая платформа компании ChemDiv по разработке противоопухолевых лекарств

ChemDiv, Inc., San Diego, California, USA

Ситуация в мировой фармацевтической индустрии в области разработки противоопухолевых лекарственных субстанций в настоящее время характеризуется интенсивной эксплуатацией новейших технологий исследований, включая дисциплины геномики, протеомики, комбинаторного синтеза, биологического и компьютерного скрининга. В настоящем докладе представлены результаты масштабных исследований по нескольким направлениям создания новых противоопухолевых агентов на основе «постгеномных» технологий, проведенных компанией ChemDiv совместно со своими партнерами в 2005–2007 гг. Базовой стратегией исследований явилось создание таргетных низкомолекулярных препаратов, воздействующих на определенные биомишени в организме человека, функционирование которых связано с возникновением и развитием опухолей. В частности, речь идет о нескольких типах соединений: ингибиторы активности хемокинового рецептора CXCR4, антиангиогенные агенты – ингибиторы сигнального каскада VEGF/VEGFR, ингибиторы внутриклеточных каскадов эмбрионального развития HedgeHog и Wnt. В ходе работ по этим направлениям было создано несколько перспективных низкомолекулярных агентов для лечения широкого круга ра-

ковых патологий, например, рака простаты, поджелудочной железы, прямой кишки и др. Также была разработана новая технология с использованием специальных биodeградируемых полимеров, позволяющая улучшать фармакологические свойства противоопухолевых препаратов. Так, на основе известного лекарства ТаксолTM был создан инновационный препарат нанотаксол, обладающий пониженной токсичностью и улучшенными фармакокинетическими свойствами. В экспериментах на мышах с привитыми опухолями человека было показано, что нанотаксол существенно эффективнее исходного препарата в способности к продлению периода выживаемости. По каждому из указанных направлений исследований в настоящее время проводятся завершающие предклинические исследования, которые, в случае успешности, уже в 2008 г. позволят начать клинические испытания.

В.Б. Лоценов, П.В. Грачев, В.А. Трофимов

Устройство для активации магнитных наночастиц в биологических средах для управляемой гипертермии с послонной коагуляцией ткани

ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Для реализации метода доставки магнитных наночастиц в ткань опухоли необходимо высокоградиентное магнитное поле. Были рассмотрены различные типы схем магнитов, которые могли бы использоваться в установке. Распределение магнитных полей при различных типах магнитов рассчитано теоретически для экспериментальных животных.

Была разработана и сконструирована установка для исследования фармакодинамики магнитных наночастиц в экспериментальных животных. Отличительной особенностью установки является то, что конструкция позволяет нагревать не всю область между обкладок конденсатора, а только вертикальную плоскость, которую можно перемещать в пределах зазора плоского конденсатора. Такого эффекта добились путем наложения на вектор постоянного магнитного поля переменной составляющей магнитного поля. Предусмотрено использование установки для снятия спектров светорассеяния и флюоресценции, с помощью которых можно дать дополнительную информацию о состоянии биологической ткани.

В.Б. Лоценов

Нанопотосенсибилизаторы – фотосенсибилизаторы 3 поколения

ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

Нанопотосенсибилизаторы (НФС) – это наноразмерные частицы, обладающие фотодинамическим эффектом, под которым понимается эффект появления некой силы (дина) под действием света (фото). В зависимости от составляющих НФС атомов и молекул, их числа, типа межатомных и межмолекулярных связей, определяющих строение, размер и заряд частицы, природа силы будет различна. Также характер силы будет отличен и в зависимости от параметров светового облучения. В первую очередь, эта зависимость будет определяться длиной волны, временем воздействия и мощностью излучения.

Фотодинамическое действие с НФС можно разделить на несколько групп:

Световое воздействие активирует наночастицу, находящуюся в клетке, путем разрушения защитной оболочки с последующим отделением отдельных молекул, обладающих фотодинамическим эффектом (пример: наночастицы фталоцианина алюминия, покрытые поверхностно активными веществами).

Короткий, но мощный световой импульс разрушает наночастицу. В результате образуется звуковая волна и вторичное электромагнитное излучение, которые деструктивно воздействуют на ближайшее окружение.

Непрерывное интенсивное излучение в полосу поглощения наночастицы вызывает гипертермический эффект.

Световое воздействие вызывает каталитическую реакцию на поверхности и в ближайшем окружении наночастицы, с последующим образованием активных форм кислорода и перекиси водорода.

Магнитное или звуковое воздействие на наночастицу приводит к излучению фотонов, которое, в свою очередь, разрушает окружающую биоткань.

Приведенные эффекты могут перекрываться.

В докладе приводятся конкретные примеры нанопотосенсибилизаторов и возможные области их применения в клинической онкологии.

И.Л. Максимова, Г.Г. Акчурин, Е.М. Ревзина, В.П. Рябухо, А.А. Скапцов, Г.С. Терентьев, В.В. Тучин, Б.Н. Хлебцов, Н.Г. Хлебцов

Использование наночастиц для контрастирования злокачественных новообразований при оптических методах диагностики (низкокогерентная томография, спектроскопия диффузного отражения)

Саратовский Государственный университет, Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН

Эффект контрастирования новообразования в биоткани с помощью селективного накопления в нем золотых наночастиц состоит в увеличении различий оптических характеристик данного участка по сравнению с окружающими здоровыми тканями. Целью данной работы является теоретическое и экспериментальное исследование возможностей оптимизации параметров наночастиц для контрастирования новообразований при использовании оптических методов.

Теоретическая часть нашего исследования состоит в моделировании пространственного распределения поглощения и обратного рассеяния при распространении электромагнитной волны через систему дискретных рассеивающих частиц с учетом эффектов различной кратности рассеяния. Результатом моделирования является спектральная зависимость обратного рассеянного излучения в заданном угловом диапазоне, а также распределение обратно рассеянных фотонов данной длины волны по длинам свободного пробега. Такое распределение после соответствующей математической обработки может рассматриваться в качестве результата численного моделирования сигнала низкокогерентного томографа. На основе численных экспериментов показано, что наличие золотых наночастиц может приводить к появлению провала на достаточно гладкой кривой спектральной зависимости диффузно рассеянного биотканью в обратном направлении излучения. Ширина и положение максимума этого провала соответствуют максимуму кривой поглощения используемых наночастиц.

Одним из методов верификации разработанного алгоритма численного моделирования является сравнение расчетных и экспериментальных спектральных характеристик, а также использование цветовых характеристик реальных биотканей и фантомов при различной глубине локализации наночастиц. С помощью волоконнооптического спектрометра ЛЕСА сняты спектры обратного диффузного отражения кожи крысы *in vitro* в видимой и ближней ИК области спектра. Экспериментальные спектры подтверждают предположения, что золотые наночастицы можно диагностировать на небольшой глубине в биоткани по спектрам обратного рассеяния.

Г.А. Меерович¹, И.Г. Меерович², В.Г. Певзов³, З.С. Смирнова², Н.А. Оборотова², Д.Г. Гуревич², А.А. Зорин², В.М. Печенников⁴, Е.А. Лукьянец⁵, А.Ю. Барышников²

Влияние размеров липосом на накопление липосомального фотосенсибилизатора тиосенс и эффективность ФДТ с его использованием

¹ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

²ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

³МФТИ, Москва

⁴ММА им. И.М. Сеченова, Москва

⁵ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва

Введение. Одним из основных факторов, определяющих эффективность нанопрепаратов в онкологии, является размер наноструктур. В работе исследовалось влияние размеров липосом на уровень и селективность накопления тиосенса в опухоли и эффективность ФДТ с его использованием.

Материалы и методы. Липосомы с субстанцией $[(\text{PhS})_4\text{PcAlOH}]$, введенной в липидный бислой, были получены методом Бенгема. Уменьшение размеров липосом обеспечивалось экстразией, а их определение – методом лазерной корреляционной спектроскопии. Исследования уровня и селективности накопления тиосенса в опухоли проводились *in vivo* флуоресцентным методом. Для исследований использовались мыши F_1 с опухолью Эрлиха (ELD), перевитой внутримышечно за 4–5 дней до опыта. Фотосенсибилизатор вводился в хвостовую вену в дозе 4–6 мг/кг веса животных.

Результаты. Показано, что уменьшение размеров липосом от относительно больших (>230 нм) до малых (<50 нм) значений приводит к увеличению накопления тиосенса в опухоли, что связано с одновременным действием двух факторов: уменьшением захвата липосом РЭС, с одной стороны, и повышением эффективности взаимодействия липосом с дефектами неоваскуляризации, с другой. При этом повышается и накопление в нормальной ткани, особенно в диапазоне малых значений размеров липосом. Индекс селективности накопления тиосенса оказывается наибольшим, когда размер липосом лежит в диапазоне оптимальных значений (75–130 нм). Время выведения тиосенса из нормальной ткани в диапазоне малых размеров липосом заметно возрастает. Эффективность ФДТ в области оптимальных значений наибольшая (ТРО около 80 %), а при больших размерах липосом снижается до умеренных значений. В диапазоне малых размеров липосом эффективность разрушения опухоли также оказывается высокой, но при этом заметно поражается и окружающая нормальная ткань из-за высокого накопления в ней тиосенса.

Выводы. Размер липосом тиосенса оказывает влияние на все основные параметры (характеристики) ФДТ (уровень и селективность накопления, эффективность ФДТ опухоли, повреждение окружающих здоровых тканей, длительность удержания фотосенсибилизатора в коже, определяющем остаточную фототоксичность). На наш взгляд, для выбранной модели оптимальным является размер липосом в диапазоне 70–130 нм.

В.Г. Певгов¹, А.В. Иванов², А.Ю. Барышников²
Опыт применения и перспективы развития методов измерения распределения размеров наночастиц

¹ГОУВПО Московский физико-технический институт

²ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Большой раздел нанотехнологии связан с мелкодисперсными материалами. К ним можно отнести как классические эмульсии, коллоиды, взвеси и растворы, так и современные нанопорошки, диспергированные в жидких средах. Паспортизация этих материалов связана, в первую очередь, с измерениями размеров частиц и их распределением (гистограммой). Существуют 3 метода исследования распределения размеров нанообъектов названного типа:

- растровая электронная спектроскопия;
- сканирующая зондовая микроскопия;
- спектроскопия квазиупруго рассеянного света.

Растровая электронная спектроскопия является классическим методом исследования нанообъектов. Характерная особенность этого метода – необходимость подготовки образца, в котором исследуемые объекты помещаются на подложку. Образец исследуется в вакууме. Несомненным достоинством метода является прямое построение изображения объектов на экране монитора. К недостаткам нужно отнести необходимость борьбы с пространственным зарядом, искажающим картину в случае непроводящих объектов, и невозможность работать с жидкими средами. В этом методе возникают определенные сложности при анализе распределения размеров наночастиц. Особенно это касается объектов с большими размерами.

Методы сканирующей зондовой микроскопии сравнительно новые, и они во многом способствовали возникновению нанотехнологий как нового самостоятельного направления. В этих методах тоже требуется подготовить образец на твердой подложке. При исследовании формы образца используется твердый зонд, который исследует (ощупывает) силовое поле образца. Хотя силы деформации образца при такой процедуре в последние годы силь-

но минимизированы, необходимо думать о закреплении образца на подложке во избежание увлечения его зондом, что сильно усложняет процесс пробоподготовки. Все другие недостатки, присутствующие при использовании электронной микроскопии, присущи и этому методу.

Метод спектроскопии квазиупругого рассеяния света сравнительно новый, в нем распределение размеров наночастиц определяется из анализа характеристик рассеяния лазерного излучения на ансамбле наночастиц, взвешенных в жидкости. В применении методов лазерной корреляционной спектроскопии достигнуты наиболее серьезные успехи. Получен динамический диапазон измеряемых размеров от 1 до 10 000 нанометров по концентрациям, достигающим многих порядков. Для измерения достаточен объем пробы в несколько десятков микролитра, а время отдельного измерения составляет несколько минут.

В современной медицине и биологии все большее количество вопросов решается на субклеточном уровне, имеющем дело с объектами нанометрового диапазона. К ним относятся все разновидности белков, липидов, ДНК и прочих биологических структур. Многие успехи современной фармакологии, генной инженерии, биотехнологий связаны с проведением технологических операций, сопровождающихся изменениями нанометровых объектов. В настоящее время разработано большое количество эффективных лекарственных препаратов, не нашедших однако широкого применения вследствие отсутствия средств их адресной доставки к нужным органам. Не вдаваясь в подробности, укажем, что в настоящее время наиболее перспективными способами создания средств доставки лекарственных препаратов является капсулирование их в липосомные и мицеллярные объекты, имеющие характерные размеры не более 100 нм, поскольку более крупные объекты не могут проходить через биологические мембраны. В вопросах разработки липосомных и мицеллярных лекарственных препаратов наиболее сложна проблема контроля размеров и, в первую очередь, размеров этих объектов в нативных жидкостях. Только методы спектроскопии квазиупругого светорассеяния позволяют надежно и оперативно проводить эти измерения.

А.В. Рябова¹, С.Ю. Васильченко¹,
 О.Л. Калия², В.Б. Лоценов¹

Динамика превращений наночастиц фталоцианина кобальта в биологических средах под воздействием лазерного излучения и слабых электрических полей *in vitro* и *in vivo*

¹ЦЕНИ ИОФ им. А.М. Прохорова РАН, Москва

²ФГУП «ГНЦ «НИОПИК», Москва

Задачи исследования. Исследование динамики превращения фталоцианина кобальта в биологических средах под воздействием лазерного излучения и слабых электрических полей *in vitro* и *in vivo*. Разработка электрохимического и оптического метода воздействия на ткань опухоли, содержащей препараты фталоцианина кобальта при одновременном спектроскопическом и тепловом контроле.

Материалы и методы. В работе использовались сульфированный фталоцианин кобальта (ФГУП «ГНЦ «НИОПИК») и препараты наночастиц водонерастворимого фталоцианина кобальта. Действие слабых электрических полей постоянного и переменного напряжения и лазерного излучения на водные растворы препаратов фталоцианина кобальта были исследованы с помощью оптической спектроскопии. Методы электрохимического и оптического воздействия на ткани опухоли, содержащей препараты фталоцианина кобальта, разрабатывались на экспериментальной модели опухоли – карциноме Эрлиха, привитой внутримышечно лабораторным мышам. После внутривенного введения препаратов фталоцианина кобальта снимали спектры поглощения тканей мыши *in vivo* с помощью спектроанализатора ЛЭСА (Биоспек) и контролировали температуру тканей с помощью инфракрасной видеокамеры Cedip (Франция). Электрическое поле постоянного и переменного напряжения от источников питания прикладывали к опухоли через иглы-электроды. В качестве источника лазерного излучения использовали лазер Lotis TH (Белоруссия) в импульсном и непрерывном режимах.

Результаты. Разработаны методы воздействия электрическими полями постоянного и переменного напряжения на ткань опухоли, содержащей препараты фталоцианина кобальта. Используя электрическое поле переменного напряжения, можно локально увеличивать накопление сульфированного фталоцианина кобальта в форме нано- и микрочастиц и повышать его каталитическую активность. Разработаны методы воздействия импульсным и непрерывным лазерным излучением на ткань опухоли, содержащей препараты фталоцианина кобальта. С помощью импульсного и непрерывного лазерного излучения также можно увеличить накопление в опухоли сульфированного фталоцианина кобальта, повысить его каталитическую активность.

Е.В. Степанова, Э.Ш. Соломко, И.Н. Григорьева, А.Ю. Барышников

Механизмы опухолевой васкуляризации *in vivo*
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Ангиогенез – формирование новых микрососудов из уже существующих в ткани капилляров. Экспериментальные исследования *in vivo*, иммуногистохимические и биохимические исследования различных опухолей человека, проведенные в том числе и нами, неоднократно демонстрировали зависимость роста опухоли и метастазирования от ангиогенной активности первичного очага. В настоящее время в клинической и экспериментальной онкологии патологическое кровоснабжение опухоли широко изучается в качестве мишени для новых противоопухолевых препаратов.

Опухолевая сеть кровеносных сосудов имеет уникальные характеристики, значительно отличающие ее от системы нормального кровоснабжения. Опухолевые кровеносные сосуды обычно извилистые, дедифференцированы, имеют непостоянный диаметр, дилатированы и способны к регрессии. В стенке сосудов эндотелиальные клетки часто интегрированы с опухолевыми (мозаицизм), иногда опухолевые клетки полностью выстилают кровеносные сосуды (васкулогенная мимикрия). Опухолевая васкулярная сеть из-за гиперпродукции VEGF – часто высокопроницаемая, с признаками геморрагий. Ток крови в таких дисфункциональных сосудах становится нерегулярным, более медленным.

Молекулярный контроль всех этих аномальностей полностью не изучен, предполагается, что они являются результатом несбалансированной экспрессии и функциональной активности ангиогенных факторов. Генетический анализ показал, что в опухолевых эндотелиальных клетках по сравнению с нормальными повышен синтез более 46 различных генов. Роль их и перспективы использования для противоопухолевой терапии полностью не изучены.

Понимание механизмов ангиогенеза и роли ключевых белков, участвующих в этом процессе, позволит эффективно блокировать формирование новых микрососудов в терапевтических целях, осуществлять адресную доставку лекарств в опухоль, а также оптимизировать современные противоопухолевые препараты и повысить эффективность методов лечения.

Е.В. Тазина, А.П. Полозкова, О.Г. Рогова, Е.В. Игнатьева, О.Л. Орлова, Г.А. Гордина, О.И. Тарасова, Н.А. Оборотова
Режим замораживания термочувствительных липосом с доксорубицином
ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. Оработка режимов замораживания термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубидина.

Материалы и методы. Липосомы получали с использованием термоллипидов, пегилированного липида, холестерина и α -токоферола ацетата методом обращения фаз. Доксорубидин загружали в липосомы против градиента сульфата аммония. Липосомальную дисперсию с доксорубицином дозировали по 2 мл во флаконы, замораживание и сублимационную сушку проводили в сублимационной установке «Minifast D 0.2» фирмы «Edwards». В случае I режима замораживания (постадийного) препарат загружали на полки сублимационной камеры при температуре $+20 \pm 2$ °C, охлаждали до -24 °C и выдерживали 1,5 ч (стадия 1). Далее полки охлаждали от -24 °C до -34 °C и выдерживали еще 1,5 ч (стадия 2), затем понижали температуру полок от -34 °C до -50 °C и после достижения препаратом температуры -40 – -45 °C выдерживали 3 ч (стадия 3). В случае II режима замораживания препарат загружали на

полки сублимационной камеры, охлажденные до -50 °C, и после достижения препаратом температуры -40 – -45 °C выдерживали 3 ч. Влияние режима замораживания на термоллипосомы оценивали по их размеру и включению в них доксорубидина. Средний диаметр везикул измеряли на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp-380. Очистку термоллипосом от невключившегося доксорубидина осуществляли методом гелефильтрации на хроматографической колонке С 10/20, заполненной сефадексом G 50 (Amersham Biosciences). Содержание доксорубидина в термоллипосомах определяли методом спектрофотометрии при длине волны 252 ± 2 нм.

Результаты. Размер термоллипосом до и после замораживания не изменился и составил 160–170 нм. Включение доксорубидина в свежеприготовленные термоллипосомы составило 94 %, после 1-й, 2-й и 3-й стадий I режима замораживания включение составило 94 ± 2 %. В случае II режима замораживания включение составило 94 ± 2 %.

Выводы. Таким образом, замораживание не влияет на размер термоллипосом и включение в них доксорубидина. Для получения лиофилизированной термочувствительной липосомальной лекарственной формы доксорубидина подходит как I, так и II режим замораживания.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства г. Москвы.

Е.В. Тазина, А.П. Полозкова, О.Г. Рогова, Е.В. Игнатьева, М.М. Бабкина, О.Л. Орлова, Г.А. Гордина, О.И. Тарасова, Н.А. Оборотова

Влияние растворителей на регидратацию лиофилизированных термоллипосом с доксорубицином

ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

Цель исследования. Изучение влияния растворителей на регидратацию лиофилизированных термоллипосом с доксорубицином.

Материалы и методы. Липосомы получали из термоллипидов, пегилированного липида, холестерина и α -токоферола ацетата методом обращения фаз. Доксорубидин загружали в липосомы против градиента сульфата аммония. Липосомальную дисперсию с доксорубицином дозировали по 2 мл во флаконы и сушили, используя сублимационную установку «Minifast D 0.2» фирмы «Edwards». Полученные лиофилизированные термоллипосомы регидратировали 2 мл растворителя. В качестве растворителей использовали деионизированную воду, физиологический раствор хлорида натрия 0,9% и 10% раствор глюкозы для инфузий. Средний диаметр везикул измеряли на приборе Submicron Particle Sizer Nicomp-380. Термоллипосомы отделяли от невключившегося доксорубидина с помощью метода гелефильтрации на хроматографической колонке С 10/20, заполненной сефадексом G 50 (Amersham Biosciences). Содержание доксорубидина в термоллипосомах определяли методом спектрофотометрии при длине волны 252 ± 2 нм.

Результаты. По внешнему виду лиофилизированные термоллипосомы с доксорубицином представляли собой сухую пористую массу однородного розового цвета. В свежеприготовленные термоллипосомы включилось 88 % доксорубидина, после сушки и регидратации лиофилизированных термоллипосом деионизированной водой включение доксорубидина снизилось до 73 %, поэтому для увеличения осмолярности использовали физиологический раствор хлорида натрия 0,9 % и 10 % раствор глюкозы. При использовании для регидратации физиологического раствора хлорида натрия 0,9% и 10% раствора глюкозы включение доксорубидина составило 80 % и 86,5 % соответственно. Размер термоллипосом – 155–170 нм. После сушки и регидратации лиофилизированных термоллипосом деионизированной водой, физиологическим раствором хлорида натрия 0,9% и 10% раствором глюкозы размер везикул составил соответственно 170–185 нм, 175–190 нм и 170–185 нм.

Выводы. Таким образом, растворитель оказывает влияние на сохранность доксорубидина в термоллипосомах после регидратации, размер термоллипосом при этом не меняется. Для получения эффективного препарата, сохраняющего стабильное включение доксорубидина в термоллипосомы, необходимо подобрать оптимальный растворитель.

Работа выполнена при финансовой поддержке Правительства г. Москвы.

Г.С. Терентюк, Г.Г. Акчурун, М.В. Долганова,
А.Н. Иванов, В.Ф. Киричук, И.Л. Максимова,
Г.Н. Маслякова, Л.П. Трояновская,
Б.Н. Хлебцов, Н.Г. Хлебцов, А.В. Шантроха

Особенности воздействия золотых наночастиц и их конъюгатов на физиологические показатели организма при онкозаболеваниях

Саратовский государственный университет,
Саратовский государственный медицинский университет,
ООО Первая ветеринарная клиника,
Институт биохимии физиологии растений и микроорганизмов РАН
Воронежский аграрный университет

В настоящее время активно исследуются возможности применения золотых наночастиц для селективной фототермической терапии и диагностики в онкологии. При этом недостаточно изучена динамика циркуляции частиц в кровотоке, накопления их в различных органах и токсичность. Цель данной работы – развитие методов сравнительной онкологии для оценки влияния золотых наночастиц на физиологические показатели организма и морфологию биотканей.

Методом атомно-абсорбционной спектроскопии экспериментально исследована динамика циркуляции золотых наночастиц в крови лабораторных животных при их внутривенном введении и накопления в печени, почках и других органах. Представлены результаты микроскопических и ультрамикроскопических исследований различных тканей при местном введении наночастиц. Экспериментально исследована *in vivo* зависимость лазерного нагрева биоткани при различной глубине введения наночастиц. Для бесконтактного измерения температуры использовался тепловизор IRISYS 4010. Нагрев исследуемых образцов осуществлялся полупроводниковым лазером с длиной волны 808 нм. Сопоставлены возникающие в биоткани изменения, определяемые методами гистологического анализа, с термограммами, измеренными на поверхности локальных участков биоткани *in vivo* непосредственно после лазерного воздействия. Особое внимание уделено режимам воздействия, не приводящим к выраженному некрозу тканей, но вызывающим повышение температуры и другие изменения биоткани, которые могут стимулировать процессы апоптоза.

Исследовано влияние наночастиц различного размера на функциональную активность тромбоцитов на лазерно-агрегационной установке «ВИОЛА» (Россия). Обнаружено изменение АДФ индуцированной агрегации тромбоцитов при добавлении наночастиц в образцы обогащенной тромбоцитами плазмы.

Проведено экспериментальное исследование воздействия конъюгатов золотых наночастиц с интерлейкином-2 на показатели иммунитета у лабораторных животных с искусственно вызванным иммунодефицитом. Разработана схема получения конъюгатов золотых наночастиц для векторной доставки наночастиц к меланоме.

В.Ю. Тимошенко¹, Т.Ю. Базыленко¹,
Р.А. Абидулина¹, С.В. Маевский²

Первый опыт использования нанокристаллов кремния в комплексном лечении трофических венозных язв

¹МГУ им. М.В. Ломоносова, Москва

²ГБОУ ВПО ЯГМА Росздрава, Ярославль

Задачи исследования. Определить перспективы клинического использования нанокристаллов кремния (НKK) в комплексной терапии трофических венозных язв (ТВЯ).

Материалы и методы. Кремниевые наночастицы представляют собой порошок коричневого цвета, состоящий из кремниевых микрогранул размерами порядка 5 нм, пронизанных нанопорами диаметром 1–10 нм. Предварительные экспериментальные исследования выявили абсорбирующие, бактерицидные, ранозаживляющие и противоопухолевые свойства НKK на фоне отсутствия токсичности при местном применении. Кроме этого, НKK оказались способными вступать в фо-

тохимические реакции и выступать в качестве фотосенсибилизатора, возбуждаясь широкой полосой света видимого диапазона. Для оценки лечебного эффекта при ТВЯ использовалась методика ежедневных аппликаций порошка НKK на открытую раневую поверхность с последующим естественным освещением. Курс лечения составлял 5–7 процедур на фоне традиционной терапии (антибиотики, антиагреганты, флебопротекторы, антикоагулянты, физиотерапия). Препарат был апробирован при лечении 4 больных с ТВЯ посттромбофлебитической этиологии. Возраст пациентов варьировал от 47 до 65 лет, средняя площадь трофических язв составила 143,4±14,9 см². Контрольную группу составили больные со стандартной схемой лечения.

Результаты. При оценке клинического эффекта было отмечено, что применение НKK ведет к снижению гидратации раневой поверхности, уменьшению периода образований грануляционной ткани (на 10–17 %) и возрастанию скорости эпителизации язв в среднем на 15–25 %. Осложнений при использовании НKK не отмечено. Из нежелательных явлений после применения НKK выявлено умеренное раздражающее действие на здоровые участки кожи при длительном освещении.

Выводы. Первый опыт использования НKK свидетельствует о перспективности использования данных частиц при местном лечении ТВЯ. Более тщательный подбор адъювантов по-видимому позволит нивелировать нежелательное раздражающее действие НKK на кожу. Данное обстоятельство требует дальнейших углубленных исследований.

Н.П. Яворская¹, И.С. Голубева¹, З.С. Смирнова¹,
С.И. Воробьев², А.П. Смирнова¹, Л.П. Сушинина¹,
С.В. Устинкина¹, З.С. Шпрах¹, А.П. Будько, Л.И. Смирнова¹

¹ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН, Москва

²МГА тонкой химической технологии им. М.В. Ломоносова, Москва

Введение. В лаборатории химического синтеза ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН синтезирован большой ряд аналогов гипоталамического гормона соматостатина. Механизм их противоопухолевого действия отличается от эффекта существующих препаратов и основан на ингибировании секреции ряда белковых и стероидных гормонов, участвующих в пролиферации раковых клеток. На основании изучения гормональной и противоопухолевой активности этих соединений был отобран для дальнейшего доклинического изучения пентапептид цифретрелин.

Цель исследования. Создание лекарственной формы цифретрелина на основе высокодисперсной эмульсии, что позволяет водонерастворимый цифретрелин вводить внутривенно.

Материалы и методы. Синтез проводили классическими методами пептидной химии. Раствор цифретрелина (400 мг в 10 мл ДМСО) добавляли в водную среду, содержащую в качестве эмульгатора проксанол-268 с м.м. 13000 (2,5 %) и помещали в экструзионный диспергатор «Донор-2», обеспечивающий высокую степень гомогенизации химических веществ под действием высоких давлений. Полученную высокодисперсную эмульсию анализировали на содержание основного вещества и вводили животным внутривенно. Исследование выполнено на перевиваемой аденокарциноме молочной железы Ca 755 мышей по стандартной методике. Лечение начинали через 48 ч после перевивки опухоли. Препарат вводили внутривенно ежедневно в течение 5 дней. Критерием эффективности служило торможение роста опухоли (ТРО).

Результаты. Высокодисперсная эмульсия цифретрелина в дозе 50 мг/кг непосредственно после окончания лечения не проявила статистически значимого противоопухолевого эффекта (ТРО=17 %). В то же время в течение наблюдения терапевтический эффект постепенно увеличивался и на 13-й день после окончания лечения составил 50 % ТРО. Субстанция цифретрелина в дозе 70 мг/кг в 1 % крахмальном клейстере при внутрибрюшинном введении на 13-й день наблюдения оказывала такой же противоопухолевой эффект – 55 % ТРО.

Выводы. Предварительные результаты исследования позволяют продолжить работу по созданию лекарственной формы цифретрелина.