



*М.В. Самсонова*

## Наномедицина: современные подходы к диагностике и лечению заболеваний, вопросы безопасности

ФГУ НИИ пульмонологии ФМБА России, Москва

*M.V. Samsonova*

## Nanomedicine: current approach to diagnosis and treatment of diseases and safety issues

В последнее 10-летие произошли значительные технологические достижения в различных областях науки. На развитие медицины и медицинских технологий оказывают большое влияние разработки в области нанотехнологий. Следует различать понятия "нанонаука" и "нанотехнологии". Понятие "нанонаука" относится к фундаментальным исследованиям феномена и свойств веществ на атомарном, молекулярном и сверхмолекулярном уровнях, когда свойства веществ существенно отличаются от таковых при больших размерах частиц. Понятие "нанотехнологии" подразумевает разработку, производство и применение структур, устройств и систем, обладающих новыми физическими, химическими и биологическими свойствами, выполненных на основе частиц в нанометрическом диапазоне.

В исследованиях в области нанотехнологий в последние несколько лет отмечается быстрый прогресс. Нанотехнология становится междисциплинарной наукой, тесно связанной с физикой, химией, молекулярной биологией, медициной в сотрудничестве с инженерными разработками. Применение нанотехнологий в медицине — в области исследований, объединенных термином "наномедицина", направлено на улучшение диагностики и лечения различных заболеваний.

В большей степени использование нанотехнологий в медицине связано с созданием различных наночастиц, обладающих уникальными свойствами, такими как высокая механическая прочность, устойчивость к химическим воздействиям, поверхностная активность, обусловленными особенностями их структуры, позволяющими создавать на их основе новые материалы и устройства.

Существуют два основных направления работ по созданию наночастиц — синтез из индивидуальных атомов и размельчение материалов обычных размеров до нанопорошков. Независимо от способа получения, наночастицы проявляют уникальные физические и химические свойства, которые определяются в большей степени свойствами индивидуальных молекул, чем массивного вещества того же состава. Таким образом, многие принципы классической химии и физики твердого тела заменяются

квантовыми вероятностными подходами, в соответствии с которыми каждая молекула или атом могут играть важнейшую роль, и взаимодействие между ними определяет поведение целой структуры. Механические параметры твердых тел в отношении наночастиц перестают быть определяющими, и на первый план выходят межатомные и межмолекулярные взаимодействия, определяющие упорядочивание, стабильность, реактивную способность и другие свойства наночастиц. Иными словами, свойства наночастиц ближе к свойствам отдельных атомов или молекул, нежели частиц твердого тела.

Изменение физических свойств вещества с изменением размерности при переходе в форму наночастиц могут повлечь трансформацию биологических свойств. Например, высок уровень задержки наночастиц легкими, т. к. частицы достаточно малы, чтобы проникнуть в терминальные отделы респираторной системы, и настолько малы, что механизмы выведения оказываются неэффективными. Наночастицы способны проникать через легкие в другие системы, проходить кожные барьеры, обладают высоким провоспалительным потенциалом на единицу массы, т. е. могут представлять опасность для здоровья человека и благополучия окружающей среды.

В настоящее время основные направления наномедицины связаны с наноразмерной хирургией, технологией выращивания тканей, диагностикой заболеваний, а также различными методами направленной доставки лекарственных средств [1–3].

### Нанохirurgия с использованием атомной микроскопии с применением наноигл

Исследовательская группа из Японии [4, 5] разработала метод хирургии на живых клетках в наноразрешающем диапазоне с использованием атомной микроскопии (АМ) и АМ-пробы. АМ — тип микроскопии, при которой образец сканируют АМ-пробой, в результате чего получают данные о его поверхности. Информация, получаемая с помощью АМ-пробы с поверхности образца, может быть столь же проста, как и физическая топография, и столь же разнообразна, как разнообразны физические,

химические и магнитные свойства материалов. Обычная АМ-проба представляет собой пирамидку длиной 3 мкм и радиусом консоли 30 нм. Изгиб определяется с помощью лазерного луча, информация передается на компьютер, где восстанавливается топографическая карта или другие интересующие свойства образца.

Для исследования клеток используют наноиглы длиной 6–8 мкм и диаметром 200–300 нм. Эти иглы способны проникать через клеточную или ядерную мембрану и могут быть аккуратно введены непосредственно в ядро клетки. Такая новая технология имеет несколько преимуществ по сравнению с обычным методом микроинъекции белков, пептидов и других веществ в живую клетку с помощью микрокапилляров. Повреждения клеток при использовании микрокапилляров не позволяют использовать их при работе с некоторыми типами клеток. Ультратонкая игла на основе АМ-системы практически не вызывает фатального повреждения живой клетки. Такая технология была предложена для изучения клеточной активности, контроля над дифференцировкой клеток или для проведения терапии на живой клетке. Хотя данная технология может быть названа нанохирургией или клеточной хирургией, при этом не имеют в виду непосредственное воздействие на индивидуальную клетку. Речь идет о "клеточной терапии", которая подразумевает введение пациенту интактных и функционально активных клеток. Например, техника клеточной хирургии может быть использована для индукции дифференцировки стволовых клеток для получения здорового клона определенных клеток при помощи манипуляции с использованием наноигл.

### Фемтосекундная\* лазерная хирургия

Фемтосекундные околоинфракрасные (ОИК) лазерные вибраторы могут быть использованы для микрохирургии в нанодиапазоне на живых клетках и тканях, не приводя к их повреждению. Внутритканевый нанопроцессинг достигается путем генерации высокой интенсивности света ( $10^{12}$  В/см<sup>2</sup>) путем дифракционно-ограниченного фокусирования излучения ОИК ( $\lambda = 740$  и  $800$  нм) фемтосекундного лазера [6, 7]. Энергия, высвобождаемая лазерным излучением, приводит к разрушению химических связей локально, в месте воздействия. Происходит выпаривание ткани без некроза и повреждения окружающих тканей. Термин "фемтосекундный лазер" относится к продолжительности лазерного облучения, которое находится в диапазоне фемтосекунд. С помощью такого лазера возможно выключение отдельных органелл живой клетки без повреждения окружающих органелл и жизнеспособности клетки. Перспективными направлениями применения этого метода являются хирургия в офтальмологии, технология выращивания тканей, нейрохирургия, экстракорпоральное оплодотворение, а также генная терапия.

\* Фемтосекунда – миллиардная доля микросекунды.

### Создание тканей (тканевая инженерия)

Современные синтетические материалы, используемые в современной трансплантологии, не обладают необходимыми свойствами. Так, одним из основных недостатков является изнашиваемость материалов, используемых, в частности, в ортопедии. Материалы, созданные на основе нанотехнологии, могут явиться альтернативой, поскольку обладают способностью воспроизводить поверхностные свойства белков организма. Наноматериалы – это материалы, размеры которых составляют  $< 100$  нм (по крайней мере, в одном направлении). В настоящее время такие материалы производят из керамики, металлов, полимеров, а также композитных составляющих. Эти материалы обладают реактивностью по отношению к белкам, что позволяет контролировать клеточную адгезию и, следовательно, способность ткани к регенерации.

В настоящее время существуют две стратегии: *in vivo* – инженеринг при помощи инъекции клеток, а также *ex vivo* – путем наложения клеток на несущий материал. Метод *in vivo* предполагают использовать для восстановления хорошо регенерирующих органов (печень, селезенка). В методике *ex vivo* наноматериал используют как подложку для роста клеток [8]. Для создания тканей желательно использовать аутологичные клетки для предотвращения иммунологических реакций отторжения. Основные проблемы связаны с ограничением приживаемости трансплантата и выживаемости клеток. Кроме того, многие пациенты находятся в терминальной стадии заболевания, в связи с этим достаточно проблематично получение необходимого количества клеток [8]. Альтернативой является применение полипотентных стволовых клеток, при этом, однако, использование аллогенных клеток может быть ограничено в связи с возможным их отторжением иммунной системой пациента.

Необходимыми свойствам используемых в качестве подложки для роста тканей материалов является их прочность, контролируемая проницаемость. В этом смысле использование наноматериалов является перспективным. Кроме того, возможно создание биodeградируемых полимеров. Проведенные в настоящее время экспериментальные исследования доказали возможность использования наноматериалов, однако приживаемость трансплантата и продолжительность жизни клеток пока являются существенным ограничением этого метода.

### Диагностика и целевая доставка лекарственных препаратов

Перспективным направлением является использование наносистем и наноматериалов при диагностике ранних форм заболевания, а также терапии с помощью целевой доставки лекарственных средств.

Визуализация патологических изменений с использованием, в частности, магнитно-резонансной

томографии в последнее время получило широкое распространение. Повышение диагностической эффективности в значительной степени связано с разработкой новых контрастных веществ. Использование нанотехнологий позволит повысить качество диагностики. Так, дифференциация различных тканей с использованием контрастных веществ на основе наночастиц (в т. ч. нанолипосом, дендримеров, нанотрубок) позволит выявить патологические изменения ранее, чем они станут очевидными на макроскопическом уровне. Поверхность наночастиц, покрытая парамагнетическими, суперпарамагнетическими металлами или радионуклидами, способна усилить контрастные свойства веществ [9]. Кроме того, улучшение визуализации опухолей возможно в связи с использованием специфических противоопухолевых антител, связанных с наночастицами [10]. Разрабатываются возможности применения полупроводниковых нанокристаллов как альтернативных флюорофоров для биологической визуализации опухолевых процессов *in vivo* [11]. Ангиогенез может быть одним из ранних маркеров опухолевого процесса. Использование наночастиц, меченных  $\alpha, \beta_3$ -интегрином, который активно экспрессируется на эндотелиальных клетках вновь образованных сосудов, позволяет визуализировать опухоли на ранних этапах их развития [12].

Перспективным в плане визуализации различных клеток, а также опухолевых тканей, является использование полупроводников *quantum dots* (QDs) — нанокристаллов размером от 1 до 10 нм, обладающих уникальными фотохимическими и фотофизическими свойствами, в отличие от обычных красителей и флюоресцентных белков [13]. В зависимости от размеров частиц, QDs, возбуждаемые различными длинами волн, способны испускать свет в различном цветовом диапазоне. Стабильность этих частиц, повышенная способность к флюоресценции, многоцветная эмиссия обуславливают широкое использование их в диагностике патологических процессов *in vivo*, а также в возможной визуализации отдельных клеток. Использование этих частиц имеет ряд преимуществ по сравнению с другими флюоресцирующими молекулами. В частности, повышаются интенсивность сигнала, отношение сигнала к шуму, а также фотостабильность. Кроме того, QDs возможно применять для пролонгированного мечения живых клеток. QDs могут связываться с поверхностными клеточными антигенами посредством конъюгированных на них антител, а также быть включенными в клетку путем эндоцитоза. Стабильность этих частиц позволяет отслеживать живые клетки на протяжении длительного времени [14–16]. Интересной представляется реализация "оптического кодирования" живых клеток при использовании частиц различного размера с разным эмиссионным спектром. При этом возможно создание до 100 различных "кодов" для осуществления скрининга действия лекарственных веществ, создания комплексных тестовых систем, а также изучения смешанных клеточных популяций [17].

Важным аспектом диагностики и прогноза течения опухолевого заболевания является определение степени вовлечения в процесс лимфатических узлов. Регионарные лимфоузлы часто являются объектом хирургического вмешательства при операционном лечении новообразований. Для диагностики поражения лимфоузлов были созданы наночастицы — QDs, флюоресцирующие в ОИК-диапазоне, спектр их эмиссии находится вне инфракрасного излучения человека. С помощью этих наночастиц возможна визуализация пораженных лимфоузлов интраоперационно в режиме реального времени.

Использование QDs позволяет визуализировать опухолевые новообразования *in vivo*. Так, в экспериментальных исследованиях на мышах была продемонстрирована визуализация рака простаты. Использование с этой целью ОИК-полимеросом или магнитных наночастиц для визуализации более глубоко расположенных опухолей исключает необходимость применения инвазивных методов исследования [18, 19].

Важным в плане прогноза течения опухолевых заболеваний является определение наличия метастазов. РНК- или ДНК-маркеры слущенных опухолевых клеток могут быть определены в циркуляторном русле с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) или других методов амплификации, однако выявление опухолевых маркеров является более перспективным. Основная проблема при этом связана с невысокой их концентрацией в сыворотке, тогда как методы амплификации для белков невозможны. Решить эту проблему позволяют разработанные в настоящее время наночастицы, к которым относят магнетики размером 1 мкм, связанные с моноклональными антителами против опухолевого маркера, и золотосодержащие наночастицы 10–30 нм, соединенные с олигонуклеотидным "штрих-кодом" и поликлональными антителами к интересующему антигену. С помощью таких наночастиц возможно определение столь малого количества белков, как 30 молекул. Таким образом, эффективность раннего выявления циркулирующих метастатических клеток становится реальностью [20, 21]. Аналогична ситуация с низкомолекулярными белками, имеющими важное прогностическое значение при опухолевых заболеваниях. Их концентрация столь мала, что определение затруднительно даже с помощью масс-спектрометрии, однако привлечение нанотехнологий позволяет преодолеть эти трудности [22].

Доставка препаратов непосредственно в очаг поражения позволит уменьшить побочные системные эффекты использования лекарств, в частности химиотерапевтических препаратов. С этой целью могут быть использованы полимерные мицеллы (растворы эфирных масел), дендримеры, полимеры и керамические наноматериалы, полимерные белковые структуры, полиплексы и липосомы. Во-первых, диагностические и терапевтические агенты могут быть инкапсулированы, ковалентно связаны или абсорбированы на наноматериалах. Это позволяет преодолеть препятствия, связанные с растворимостью

лекарственных средств, поскольку многие из них являются водонерастворимыми. Во-вторых, использование малых размеров и поверхностных свойств наноматериалов позволит доставлять лекарства к определенным клеткам при парентеральном или подкожном их введении. Такой подход позволяет повысить терапевтическую эффективность и снизить побочные эффекты. Некоторые из таких носителей могут быть активированы при изменении окружающих условий (в частности, pH среды, различные химические стимулы или применение внешнего источника нагревания) [23].

В настоящее время активно разрабатываются методы целевой доставки лекарств в очаг поражения. Так, в экспериментальном исследовании на мышцах с наличием опухоли было продемонстрировано, что липидные катионные наночастицы, связанные с интегрин-лигандом, позволяют доставлять гены селективно в новообразованные сосуды опухоли. Терапевтический компонент такого нанокомплекса — Raf-ген — приводит к блокированию ангиогенеза в опухолевой ткани и вызывает длительную регрессию первичного и метастатических опухолевых очагов [24]. Новые подходы к лекарственной терапии связаны с созданием "искусственных" антител — аптамеров, представляющих собой лиганды нуклеиновых кислот, которые могут связываться практически с любым антигеном. Такая стратегия была использована для лечения рака простаты с помощью аптамерных наночастиц, связывающихся с простат-специфическим антигеном. При этом средство наночастиц было в 77 раз выше по сравнению с препаратами, использовавшимися ранее [25].

Некоторые лекарственные препараты, возможно, найдут новое применение в связи с внедрением нанотехнологических подходов. Так, создание нанокристаллических суспензий, органических или липидных наночастиц позволяет связывать водонерастворимые вещества, что приводит к их длительной циркуляции в кровотоке [26]. Кроме того, применение наночастиц в качестве носителей лекарственных средств позволяет оптимизировать лечение заболеваний центральной нервной системы, поскольку решает проблемы прохождения через гематоэнцефалический барьер.

Разрабатываются подходы нелекарственного воздействия, позволяющего разрушать опухолевую ткань. В этой связи хорошо известен метод термальной абляции опухолей, имеющий, однако, ряд недостатков: при таком воздействии, как правило, повреждаются и окружающие опухоль здоровые ткани. С помощью специально разработанных наночастиц возможно преодоление этих недостатков. Так, золотосодержащие наночастицы, поглощающие свет в ОИК-диапазоне, накапливаются в ткани опухоли, не попадая в непораженную ткань. Селективное нагревание в определенном волновом диапазоне позволяет локально "выжигать" пораженные опухолью зоны, не приводя к повреждению здоровых тканей [27].

Применение наночастиц возможно также при оценке эффективности проводимой противоопу-

холевой терапии. Так, использование наночастиц с конъюгированным аннексином-V, который связывается с фосфатидилсеринем, обнажающимся на поверхности мембраны в процессе апоптоза клетки, позволяет контролировать рост и метастазирование опухоли, а также реакцию на проводимое лечение [28].

Однако использование наноматериалов в качестве средства доставки поднимает вопрос об их токсичности, поскольку свойства материалов могут существенно меняться, если размер частиц находится в нанодиапазоне. Таким образом, необходимо оценивать соотношение риск—эффект при использовании наноматериалов [29, 30].

Кроме того, при применении наноматериалов необходимо решать вопрос "обратной связи", поскольку в отдельных исследованиях было показано, что при доставке лекарств процесс может "выходить из-под контроля" [31]. Принимая во внимание этот факт, при разработке наноматериалов следует учитывать их способность к биодеградации или элиминации из организма путем естественного метаболизма и экскреции. Другой альтернативой может быть использование "устройств самонаведения", которые позволяют собирать и удалять из организма наноматериалы после достижения необходимого эффекта.

## Нанотехнологии и вирусная биология

Одна из областей, в которых могут быть использованы нанотехнологии, — это взаимодействие между клетками и вирусами. Вирусы представляют собой, по сути, биологические наночастицы, оказывающие значимый эффект на организм человека. Однако до настоящего времени механизм взаимодействия между вирусами и клетками организма остается неизученным, в частности процесс распознавания и прикрепления к клетке хозяина. Это связано с действием белков, входящих в состав вирусных капсидов, которые обладают множеством функций, включая защиту вирусного генома, высвобождение нуклеиновых кислот и т. д. [32]. Реализация каждой из этих функций происходит в результате структурных изменений капсидных белков. Для изучения этих механизмов используют такие методы, как рентгеновская дифракция, криоэлектронная и оптическая микроскопия, имеющие, однако, существенные ограничения, в частности, наличие синхронной популяции вирусов, получение усредненной информации о пуле вирусов. Использование нанотехнологий дает новые возможности в изучении вирусов. Так, использование наночастиц, содержащих золото, инкапсулированных в вирусы, позволяет усилить спектроскопический сигнал. Изучение биологии вирусов получило также дальнейшее развитие в связи с использованием нанометрических биомолекулярных матриц [33].

Одно из применений вирусов в медицине — создание векторов для генной терапии различных наследственных заболеваний. Вирусы являются естественными нановекторами. В связи с этим нанотехнологические процессы могут быть использова-

ны также для создания искусственных вирусов, таких как гликовирусы, для генной трансфекции. Эти вирусы представляют собой наночастицы с плазмидной ДНК, причем размер, число и форма наночастиц могут быть контролируемы [34].

В настоящее время применение нанотехнологий также направлено на улучшение выявляемости различных вирусов в организме с целью повышения качества диагностики заболеваний вирусной природы. Современные методы выявления вирусов основаны или на иммунологической реакции антиген–антитело, или на определении геномной последовательности (ПЦР). Однако чувствительность иммунологического метода недостаточно высока, тогда как ПЦР зачастую может выявлять контаминацию вирусами при отсутствии воспалительной реакции. Использование наночастиц, как ожидается, может позволить преодолеть эти недостатки. Так, был разработан ELISA-метод для прямой детекции аденовирусов с использованием моноклональных антигексоновых антител, связанных с флуоресцентными наночастицами (диаметр – 107 нм), содержащими Eu. Поскольку одна наночастица может аккумулировать на себе множество антител (вплоть до 159), avidность их к гексоновым белкам возрастает в 10–1 000 раз по сравнению с обычным методом ELISA [35]. В другом исследовании были использованы наночастицы размером 8–15 нм с содержанием Au, связанные с олигонуклеотидным зондом для прямого определения вирусов гепатита В и С в сыворотке [36]. Впоследствии был также использован метод сэндвич-гибридизации с применением золотосодержащих наночастиц. Этот метод визуального выявления вирусов с помощью генных чипов является менее дорогостоящим, т. к. не требует использования специальной аппаратуры.

Визуализация вирусов возможна также при помощи ядерного магнитного резонанса с применением магнитных наночастиц. С этой целью были разработаны вирусные наносенсоры, состоящие из супермагнетика – оксида железа, покрытого декстраном, к которому присоединяются антитела против вируса простого герпеса или аденовируса. Наличие вирусов приводит к аккумуляции магнитных наносенсоров, которые, в свою очередь, вызывают спин-спин время релаксации окружающих молекул воды. Этот метод более чувствительный, чем ПЦР. Кроме того, при этом нет необходимости в проведении процедуры амплификации и удаления белка. Поскольку вирусы герпеса и аденовирусы используют в качестве векторов для генной терапии, применение этого метода позволит оценивать биораспределение вирусов в организме [37].

### Вирусная нанотерапия

В настоящее время нанотехнологии находят свое применение в лечении вирусных заболеваний. В частности, использование новых методов позволяет повысить эффективность вакцинотерапии – одного из наиболее развитых направлений в профи-

лактике и лечении вирусных заболеваний. Большое внимание в последнее время уделяется разработке эффективной стратегии вакцинации, в частности против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ). Однако существующие ранее методы ДНК-вакцинации были недостаточно эффективны в связи с низкой иммуногенностью и необходимостью применения иммуностимуляторов. *C.P.Locher et al.* [38] разработали вакцину, содержащую плазмид с геном HIV-2 gp140 *env* и поликатионный альювант. Исследование этой вакцины на мышах выявило лучший системный ответ с формированием антител, по сравнению с использованием несвязанной ДНК. Аналогичные результаты продемонстрированы с использованием нановакцины против вируса парагриппа III типа [39].

Актуальной проблемой является ограничение распространения вирусной инфекции. Использование в рутинной клинической практике различных производных плазмы сопряжено с риском контаминации вирусами. Эта проблема в настоящее время решается различными способами: химической инактивацией, пастеризацией, сухим нагреванием. Однако при этом неизбежно происходит повреждение плазменных белков. Создание наночастиц позволяет преодолеть эту проблему [40]. Показано, что использование наночастиц размером 20–50 нм позволяет фильтровать частицы вируса гепатита А или парвовируса. Аналогичным образом возможна фильтрация питьевой воды от вирусов, пестицидов и других органических примесей.

Помимо прочего, наночастицы могут быть использованы в комбинации с вирусами при проведении вирусной терапии опухолей или генной терапии различных наследственных заболеваний с применением РНК-вирусов. Так, было показано, что наночастицы Au с прикрепленными на них капсидными протеинами могут быть использованы для векторной терапии, позволяющей контролировать целевую доставку к опухолевой ткани, которая экспрессирует рецепторы, распознаваемые вирусом. Эта стратегия позволяет комбинировать вирусную терапию опухолей с гипертермией наночастиц Au, таким образом достигается синергизм этих воздействий [41, 42].

### Влияние наночастиц на здоровье человека

Легкие являются основным органом-мишенью действия поллютантов окружающей среды. Влияние частиц различных размеров на развитие воспалительных процессов в легких неоднозначно. Ультрамелкие частицы (УМЧ) и наночастицы, как антропогенного, так и промышленного происхождения, сходны в размерах. Их диаметр составляет < 100 нм [43]. Термин "ультрамелкие частицы" используют для описания частиц, которые циркулируют в атмосфере, но не являются наночастицами, производимыми специально. Такие частицы являются случайным побочным продуктом индустриального происхождения, продуктами сгорания автомобильного, дизельного топлива, вулканической активности и т. п. Было показано, что УМЧ по сравнению с частицами

$> 0,1$  мкм имеют большую продолжительность циркуляции в атмосфере, могут переноситься на расстояние более тысячи километров, циркулировать в воздухе в течение нескольких дней. Кроме того, УМЧ способны абсорбировать на своей поверхности поллютанты, оксидантные газы, органические соединения, а также металлы [44].

Циркулирующие в атмосфере УМЧ могут играть роль в провокации воспалительного процесса у пациентов, страдающих бронхиальной астмой (БА) и хронической обструктивной болезнью легких (ХОБЛ). Было показано, что обострение хронических воспалительных заболеваний коррелирует с уровнем загрязненности окружающей среды [45, 46]. Длительная ингаляция пылевых частиц может приводить к развитию пневмокониозов и рака легкого, однако диагностика таких заболеваний сложна в связи с длительным латентным периодом. Ингаляция УМЧ и наночастиц способна приводить к развитию воспалительного ответа в легких, кроме того, было показано, что такие частицы могут попадать в кровь и быть обнаружены в других органах. Внепочечная миграция УМЧ зависит не только от размера частиц, но и от их химического состава и поверхностных свойств. Так, в недавнем исследовании было продемонстрировано, что УМЧ  $TiO_2$  способны проникать через клеточные мембраны и могут быть обнаружены в капиллярах [47]. В экспериментальных работах было показано, что УМЧ могут провоцировать развитие оксидативного ответа в легких [48, 49]. В наибольшей степени оксидативный ответ при воздействии УМЧ связан с макрофагами и эпителиальными клетками и реализуется путем индукции гемоксигеназы-1 и продукции внутриклеточного глутатиона. Имеются подтверждения того факта, что оксидативный стресс, вызванный действием УМЧ, связан с активацией митоген-активированного протеиназного каскада, что вызывает экспрессию гена и активацию различных факторов, таких как AP-1 и NF- $\kappa$ B, которые играют важную роль в экспрессии провоспалительных генов и цитокинов, включая адгезивные молекулы [50].

В литературе описаны немногочисленные исследования, посвященные изучению потенциальной токсичности наночастиц по отношению к различным клеткам *in vitro* [51–56]; что касается наблюдений *in vivo*, то такие работы единичны [57, 58]. В частности, описано воздействие аспирированных карбоновых нанотрубок на инициацию воспалительного ответа в легких у мышей [59]. Вероятнее всего, инициация воспаления происходит вследствие повреждения альвеолоцитов I типа. При этом развивается пневмония с наличием нейтрофильного экссудата в альвеолах с последующим привлечением и активацией альвеолярных макрофагов. Особенностью возникающего при воздействии наночастиц воспаления является раннее начало фиброгенных событий, приводящих к отложению в ткани легких избыточного количества коллагена и эластина. Эти изменения сопровождаются продукцией провоспалительных (фактор некроза опухоли- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), ин-

терлейкин- $1\beta$  (IL- $1\beta$ )) и противовоспалительных профиброгенных цитокинов (трансформирующий фактор роста- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), IL-10). Воспалительный и профиброгенный ответ сопровождается снижением функциональных показателей и повышенной подверженностью инфекционным возбудителям [59].

Экспериментальные исследования с УМЧ различного химического состава подтвердили, что продукция активных форм кислорода является основным механизмом развития воспаления. Оксидативный потенциал УМЧ из различных источников, таких как естественная пыль, летучий пепел, угольная пыль, был в большей степени связан с содержанием в ней металлов. Было также показано, что как растворимая, так и нерастворимая часть УМЧ способны индуцировать оксидативный стресс [50].

Изготовление наночастиц, особенно карбоновых нанотрубок (КНТ), связано с использованием в качестве катализаторов различных металлов, в т. ч. переходных. Переходные металлы способны также являться катализаторами оксидативного стресса в клетках, тканях и биологических жидкостях. Таким образом, воспалительный ответ, возникающий на присутствие в организме наночастиц в сочетании с переходными металлами, может быть выраженным. Кислородные радикалы, вырабатываемые в процессе воспаления, при взаимодействии с переходными металлами запускают каскад окислительно-восстановительного цикла, приводя к истощению эндогенного резерва антиоксидантов и оксидативному повреждению макромолекул [54].

Особенностью наночастиц, в частности КНТ, является то, что зачастую они не могут быть "узнаны" макрофагами. Так, в экспериментах было показано, что при инкубации макрофагов с КНТ не происходит их фагоцитоза, а также оксидативной активации макрофагов. Как результат, попавшие в легкие КНТ не фагоцитируются макрофагами и не элиминируются из легких. Вероятно, это приводит к попаданию ингалированных наночастиц в циркуляторное русло и развитию внепочечных осложнений [50].

Интересно, что макрофаги не могут "узнавать" нефункциональные КНТ, тогда как их химические модификации, напротив, связаны с повышенной возможностью "узнавания" фагоцитами. Как раз это свойство наночастиц используют с целью доставки их к макрофагам и другим иммунным клеткам для улучшения качества диагностики, визуализации различных патологических процессов, а также усиления терапевтической эффективности лекарственных препаратов [60, 61].

Низкая фагоцитарная активность макрофагов по отношению к нефункциональным КНТ, возможно, связана с потерей сигнала узнавания на поверхности клетки. Было установлено, что фосфатидилсерин, в норме расположенный в цитозольном слое плазматической мембраны, оказывается "обнаженным" при апоптозе клетки и является универсальным сигналом макрофагам к фагоцитозу, способствующим эффективному клиренсу апоптотических клеток.

Предварительные исследования показали, что КНТ с адсорбированным на них фосфатидилсерином, действительно, эффективно фагоцитируются макрофагами. Использование других фосфатидилов, в частности фосфатидилхолина, не давало подобного эффекта [62, 63]. Важно отметить, что роль фосфатидилсерина не ограничивается процессом "узнавания" клеток, он также принимает участие в репрограммировании цитокинового профиля макрофагов в процессе развития воспалительного ответа [64]. В связи с этим предполагается, что использование КНТ с адсорбированным на них фосфатидилсерином позволит контролировать воспалительный ответ. Однако в настоящее время эти исследования находятся в стадии разработки.

Поскольку макрофаги играют важную роль в регуляции воспалительного ответа, возможно, что их взаимодействие с функциональными наночастицами может быть использовано с целью токсикологической оценки наноматериалов. Однако следует учитывать тот факт, что наноматериалы токсичны по отношению к различным клеткам *in vitro*, но прогнозировать выраженность воспалительного ответа в организме крайне сложно. Необходимо проведение дальнейших детальных исследований по оценке токсического действия наноматериалов *in vitro*, при этом макрофаги кажутся наиболее подходящим объектом таких исследований.

### Поражение легких при действии ультрамелких и наночастиц

В экспериментальных исследованиях *in vivo* было показано, что УМЧ вызывают выраженные воспалительные и токсические реакции в легких у животных, причем сила ответа зависит от размера частиц и их химического состава. У мышей и крыс наблюдали более выраженный воспалительный ответ при действии УМЧ  $\text{TiO}_2$  по сравнению с мелкими частицами  $\text{TiO}_2$ , при этом происходит приток нейтрофилов в легкие [65]. Химические свойства частиц играют едва ли не большую роль в развитии воспалительного ответа, чем их размер. Так, в эксперименте на крысах было показано, что политетрафлуэтиленовый дым, содержащий УМЧ < 26 нм, вызывает геморрагический ответ в легких и смерть животных при экспозиции 10–30 мг пыли. Причем воспалительный ответ был более выражен при использовании только что произведенных частиц: со временем их поверхностно активные свойства и токсичность снижались [66].

Ряд исследований посвящен влиянию на легкие животных таких наноматериалов, как одностенные КНТ, при этом было показано, что патологические изменения можно наблюдать как при действии малых, так и больших доз. При экспозиции малыми дозами (3,3–16,6 мг/кг веса) развивалось гранулематозное воспаление, тогда как высокие дозы (10–40 мг) приводили к развитию острого воспалительного ответа с формированием в последующем фиброза легких [59, 67].

## Безопасность и наномедицина

В настоящее время однозначно охарактеризовать различные наночастицы с точки зрения их потенциальной опасности для здоровья человека затруднительно. Зачастую противоречивые данные немногочисленных исследований касаются биологических эффектов лишь нескольких разновидностей наночастиц.

Следует отметить, что большинство экспериментов выполнено в условиях, когда контакт наноматериалов с живым организмом достигается искусственным путем (имплантация, инстиляция, капельное введение и т. д.). Получаемые в таких экспериментах на животных данные необязательно отражают реальную картину возможного воздействия на человека [68].

В решении задач, связанных с безопасностью применения нанотехнологий, нас могут ожидать две проблемы. Первая – обеспечение безопасности труда на производстве. Предполагается, что во вредных условиях будут работать около 400 тыс. человек, а правила безопасности пока отсутствуют. Вторая проблема – охрана наносубстанций. Как и в случае с любыми экологически опасными веществами, мы можем столкнуться с проблемой их утилизации, в т. ч. просроченных лекарств и гигиенических средств, созданных при помощи нанотехнологий. Кроме того, возникает необходимость контроля качества продукции, которая не должна оказывать вред здоровью потребителя. Особенно это касается лекарств и биологически активных добавок.

В настоящее время можно наметить следующие направления работы в области безопасного применения нанотехнологий и наноматериалов:

- продолжить исследования воздействия на человека наночастиц и наноматериалов с целью предотвращения потенциального вреда для здоровья;
- изучить возможности использования достижений нанотехнологий в целях предотвращения вреда для здоровья и профилактики профессиональных заболеваний;
- разработать правила безопасного обращения с наночастицами и наноматериалами;
- использовать зарубежные разработки, обеспечить международное сотрудничество в области нанотехнологий.

Развитие и использование нанотехнологий представляет собой феномен глобального масштаба. Национальное и международное партнерство позволит своевременно определять потребность в проведении исследований, разрабатывать методику и обмениваться результатами [68].

### Заключение

Успехи в развитии наномедицины обещают новые перспективные возможности в ранней диагностике и лечении различных заболеваний. Тем не менее применение нанотехнологий в медицине может расширить спектр наших представлений о риске

использования наноматериалов, который не следует недооценивать. Опубликованные в настоящее время обзоры литературы об отрицательном влиянии наночастиц на здоровье человека содержат лишь первые данные, касающиеся их возможной токсичности. Имеется относительно большое число наблюдений, описывающих связь между экспозицией УМЧ и заболеваемостью, особенно у пожилых и иммуноскомпроментированных лиц. Учитывая сходные свойства УМЧ и наночастиц, можно предположить, что последние также способны вызывать различные заболевания, зачастую с длительным латентным периодом. В связи с этим разработка новых наномедицинских технологий возможна лишь при тщательной оценке риска использования наноматериалов.

## Литература

- Gwinn M.R., Vallyathan V. Nanoparticles: Health effects – pros and cons. *Environm. Hlth Perspect.* 2006.; 114 (12): 1818–1825.
- Emerich D.F., Thanos C.G. Nanotechnology and medicine. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 2003; 3 (4): 655–663.
- Freitas R.A. Nanotechnology, Nanomedicine and Nanosurgery. 2006. <http://www.kurzweilai.net>.
- Obataya I., Nakamura C., Han S. et al. Nanoscale operation of a living cell using an atomic force microscope with a nanoneedle. *Nano Letters* 2005; 5 (1): 27–30.
- Obataya I., Nakamura C., Han S. et al. Mechanical sensing of the penetration of various nanoneedles into a living cell using atomic forcemicroscopy. *Biosensors and Bioelectronics* 2005; 20 (8): 1652–1655.
- Tirlapur U.K., Konig K. Femtosecond near-infrared laser pulses as a versatile non-invasive tool for intra-tissue nanoprocessing in plants without compromising viability. *Plant J.* 2002; 31 (3): 365–374.
- Konig K. Robert Feulgen Prize lecture. Laser tweezers and multiphoton microscopes in life sciences. *Histochem. Cell Biol.* 2000; 114 (2): 79–92.
- Allen J.W., Bhatia S.N. Engineering liver therapies for the future. *Tissue Enging* 2002; 8 (5): 725–737.
- Morawski A.M., Lanza G.A., Wickline S.A. Targeted contrast agents for magnetic resonance imaging and ultrasound. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005; 16 (1): 89–92.
- Lim Y.T., Kim S., Nakayama A. et al. Selection of quantum dot wavelengths for biomedical assays and imaging. *Mol. Imag.* 2003; 2: 50–64.
- Gao X., Cui Y., Levenson R.M. et al. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 969–976.
- Schmieder A.H., Winter P.M., Caruthers S.D. et al. Molecular MR imaging of melanoma angiogenesis with a (nu)p(3)-targeted paramagnetic nanoparticles. *Magn. Reson. Med.* 2005; 53 (3): 621–627.
- Smith A.M., Gao X., Nie S. Quantum dot nanocrystals for in vivo molecular and cellular imaging. *Photochem. Photobiol.* 2004; 80: 377–385.
- Wu X., Liu H., Liu J. et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 41–46.
- Smith A.M., Nie S. Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots. *Analyst.* 2004; 129: 672–677.
- Jaiswal J.K., Goldman E.R., Mattoussi H., Simon S.M. Use of quantum dots for live cell imaging. *Nat. Methods.* 2004; 1: 73–78.
- Han M., Gao X., Su J.Z., Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: 631–635.
- Ghoroghchian P.P., Frail P.R., Susumu K. et al. Near-infrared-emissive polymersomes: self-assembled soft matter for in vivo optical imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 2922–2927.
- Petri-Fink A., Chastellain M., Juillerat-Jeanneret L. et al. Development of functionalized superparamagnetic iron oxide nanoparticles for interaction with human cancer cells. *Biomaterials* 2005; 26: 2685–2694.
- Georganopoulou D.G., Chang L., Nam J.M. et al. Nanoparticle-based detection in cerebral spinal fluid of a soluble pathogenic biomarker for Alzheimer's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 2273–2276.
- Nam J.M., Thaxton C.S., Mirkin C.A. Nanoparticle-based bio-bar codes for the ultrasensitive detection of proteins. *Science* 2003; 301: 1884–1886.
- Liotta L.A., Ferrari M., Petricoin E. Clinical proteomics: written in blood. *Nature* 2003; 425: 905.
- Moghim S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Nanomedicine: current status and future prospects. *FASEB J.* 2005; 19 (3): 311–330.
- Hood J.D., Bednarski M., Frausto R. et al. Tumor regression by targeted gene delivery to the neovasculature. *Science* 2002; 296: 2404–2407.
- Farokhzad O.C., Jon S., Khademhosseini A. et al. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer. Res.* 2004; 64: 7668–7672.
- Wissing S.A., Kayser O., Muller R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1257–1272.
- O'Neal D.P., Hirsch L.R., Halas N.J. et al. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared-absorbing nanoparticles. *Cancer. Lett.* 2004; 209: 171–176.
- Gao X., Chan W.C., Nie S. Quantum dot nanocrystals for ultrasensitive biological labeling and multicolor optical encoding. *J. Biomed. Opt.* 2002; 7: 532–537.
- Warheit D.B. Nanoparticles: health impacts? *Materials Today* 2004; 7 (2): 32–35.
- Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311 (5761): 622–627.
- Haberzettl C.A. Nanomedicine: destination or journey? *Nanotechnology* 2002; 13 (4): R9–R13.
- Chiu W., Burnett R.M., Garcea R. Structural biology of viruses. New York: Oxford University Press; 1997.
- Dragnea B. et al. Gold nanoparticles as spectroscopic enhancers for in vitro studies on single viruses. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 6374–6375.
- Aoyama Y. Macrocyclic glycoclusters: from amphiphiles through nanoparticles to glycoviruses. *Chemistry* 2004; 10: 588–593.
- Valanne A. et al. A sensitive adenovirus immunoassay as a model for using nanoparticle label technology in vims diagnostics. *J. Clin. Virol.* 2005; 33: 217–223.
- Wang Y.F. et al. Visual gene diagnosis of HBV and HCV based on nanoparticle probe amplification and silver staining enhancement. *J. Med. Virol.* 2003; 70: 205–211.
- Perez J.M., Josephson L., Weissleder R. Use of magnetic nanoparticles as nanosensors to probe for molecular interactions. *Chembiochem.* 2004; 5: 261–264.
- Locher C.P. et al. Enhancement of a human immunodeficiency virus env DNA vaccine using a novel polycationic nanoparticle formulation. *Immunol. Lett.* 2003; 90: 67–70.
- Shephard M.J. et al. Immunogenicity of bovine parainfluenza type 3 virus proteins encapsulated in nanoparticle vac-

- cines, following intranasal administration to mice. *Res. Vet. Sci.* 2003; 74: 187–190.
40. *Burnouf T., Radosevich M.* Nanofiltration of plasma-derived bio-pharmaceutical products. *Haemophilia* 2003; 9: 24–37.
  41. *Zharov V.P. et al.* Self-assembling nanoclusters in living systems: application for integrated photothermal nanodiagnostics and nano-therapy. *Nanomedicine* 2005; 1: 326–345.
  42. *Hilger I. et al.* Magnetic thermotherapy of breast tumors: an experimental therapeutic approach. *Röfo* 2005; 177: 507–515.
  43. *Hinds W.C.* Aerosol technology: Properties, behavior, and measurement of airborne particles. 2nd ed. New York: Wiley-Interscience; 1999.
  44. *Oberdorster G.* Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int. Arch. Occup. Environ. Hlth* 2001; 74 (1): 1–8.
  45. *Gong H. Jr., Linn W.S., Clark K.W. et al.* Respiratory responses to exposures with fine particulates and nitrogen dioxide in the elderly with and without COPD. *Inhal. Toxicol.* 2005; 17 (3): 123–132.
  46. *Koenig J.Q., Mar T.F., Allen R.W. et al.* Pulmonary effects of indoor- and outdoor-generated particles in children with asthma. *Environ. Hlth Perspect.* 2005; 113: 499–503.
  47. *Geiser M., Rothen-Rutishauser B., Kapp N. et al.* Ultrafine particles cross cellular membranes by nonphagocytic mechanisms in lungs and in cultured cells. *Environ. Hlth Perspect.* 2005; 113: 1555–1560.
  48. *Dick C.A., Brown D.M., Donaldson K., Stone V.* The role of free radicals in the toxic and inflammatory effects of four different ultrafine particle types. *Inhal. Toxicol.* 2003; 15 (1): 39–52.
  49. *Donaldson K., Tran C.L.* Inflammation caused by particles and fibers. *Inhal. Toxicol.* 2002; 14 (1): 5–27.
  50. *Oberdorster G., Gelein R.M., Ferin J., Weiss B.* Association of particulate air pollution and acute mortality: involvement of ultrafine particles. *Inhal. Toxicol.* 1995; 7 (1): 111–124.
  51. *Sayes C.M., Gobin A.M., Ausman K.D. et al.* Nano-C(60) cytotoxicity is due to lipid peroxidation. *Biomaterials* 2005; 26: 7587–7595.
  52. *Cui D., Tian F., Ozkan C.S. et al.* Effect of single wall carbon nanotubes on human HEK293 cells. *Toxicol. Lett.* 2005; 155: 73–85.
  53. *Jia G., Wang H., Yan L. et al.* Cytotoxicity of carbon nanomaterials: single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environ. Sci. Technol.* 2005; 39: 1378–1383.
  54. *Shvedova A.A., Castranova V., Kisin E.R. et al.* Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Hlth A* 2003; 66: 1909–1926.
  55. *Brown D.M., Wilson M.R., MacNee W. et al.* Size-dependent proinflammatory effects of ultrafine polystyrene particles: a role for surface area and oxidative stress in the enhanced activity of ultrafines. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2001; 175: 191–199.
  56. *Li N., Sioutas C., Cho A. et al.* Ultrafine particulate pollutants induce oxidative stress and mitochondrial damage. *Environ. Hlth Perspect.* 2003; 111: 455–460.
  57. *Oberdorster G., Sharp Z., Atudorei V. et al.* Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.* 2004; 16: 437–445.
  58. *Muller J., Huaux F., Moreau N. et al.* Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2005; 207: 221–231.
  59. *Shvedova A.A., Kisin E.R., Mercer R. et al.* Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single walled carbon nanotubes in mice. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2005; 283: L698–L708.
  60. *De Kozak Y., Andrieux K., Villarroja H. et al.* Intraocular injection of tamoxifen-loaded nanoparticles: a new treatment of experimental autoimmune uveoretinitis. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 3702–3712.
  61. *Ho C., Hitchens T.K.* A non-invasive approach to detecting organ rejection by MRI: monitoring the accumulation of immune cells at the transplanted organ. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2004; 5: 551–566.
  62. *Kagan V.E., Gleiss B., Tsvirina Y.Y. et al.* A role for oxidative stress in apoptosis: oxidation and externalization of phosphatidylserine is required for macrophage clearance of cells undergoing Fas-mediated apoptosis. *J. Immunol.* 2002; 169: 487–499.
  63. *Fadok V.A., Bratton D.L., Frasch S.C. et al.* The role of phosphatidylserine in recognition of apoptotic cells by phagocytes. *Cell Death Differ.* 1998; 5: 551–562.
  64. *Henson P.M.* Possible roles for apoptosis and apoptotic cell recognition in inflammation and fibrosis. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2003; 29: S70–S76.
  65. *Oberdorster G., Ferin J., Lehnert B.E.* Correlation between particle size, in vivo particle persistence, and lung injury. *Environ. Hlth Perspect.* 1994; 102 (suppl. 5): 173–179.
  66. *Ebbesen M., Jensen T.* Nanomedicine: techniques, potentials, and ethical implications. *J. Biomed. Biotechnol.* 2006; 2006 (5): 51516.
  67. *Lam C.W., James J.T., McCluskey R., Hunter R.L.* Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 2004; 77 (1): 126–134.
  68. *Колесников С.И., Ткач А.В.* Нанотехнологии и наноматериалы – значение для медицины и правовое обеспечение безопасности их производства и применения. *Жизнь без опасности* 2007; 3 (2): 22–33.

Поступила 11.07.2008  
 © Самсонова М.В., 2008  
 УДК 61:621