

Открывая эпоху нанотехнологий в а

Наномедицина – молодое и активно развивающееся научно-прикладное направление по совершенствованию диагностики и лечения различных заболеваний на основе нанотехнологий. Нанотехнология (приставка «нано» означает размеры объектов порядка 10^{-9} м, то есть в миллионные доли миллиметра) подразумевает работу с материей на атомарном и молекулярном уровнях, разработку наночастиц и наноматериалов с определенными физико-химическими свойствами, а также сложных инженерных наносистем вплоть до наноразмерных роботов. Пока что наномедицина существует лишь как концепция, поскольку в настоящее время и сами нанотехнологии, и исследования по изучению поведения неорганических наноматериалов в живых системах (клетках и тканях) находятся в основном на стадии лабораторных экспериментов. Однако уже сегодня результаты некоторых исследований дают представление о том, как будет выглядеть наномедицина, и какие фантастические возможности она предоставит врачам и пациентам. Наиболее перспективными (и реальными в ближайшем будущем) сферами применения нанотехнологий в клинической практике являются разработка новых диагностических, визуализирующих методов, совершенствование форм доставки лекарственных средств, микроинвазивные вмешательства на клеточном уровне (нанохирургия), использование наноматериалов в изготовлении различных изделий медицинского назначения.

Простейший пример наноматериала – это мембрана с отверстиями (порами) наноразмерного диаметра. Одним из первых таких материалов является изобретенный в 1995 г. Desai и Fergaи кристаллический силикон с порами диаметром около 20 нм, в которые могут помещаться клетки. Эти поры способствуют поступлению в клетки таких небольших молекул, как глюкоза, кислород и инсулин, но в то же время препятствуют контакту клеток с антителами.

Формальными признаками наночастиц являются сферическая форма и размер от 1 до 250–300 нм. К наночастицам относятся весьма разнородные по химическому строению и физическим свойствам частицы: углеродные, металлические, полимерные и др. Физико-химические свойства наночастиц определяют их значение в наномедицине. Приведем некоторые примеры наночастиц, наноматериалов и возможностей их медицинского использования.

Фуллерены – полые сферические образования различной формы, стенки которых образованы тончайшими, толщиной в несколько атомов листками графита (кристаллический углерод). Фуллерены сочетают такие свойства, как стабильность формы, жесткость, теплопроводность. Самой перспективной формой углеродного наноматериала считаются нанотрубки, которые могут быть однослойными и многослойными. Многослойные нанотрубки обычно имеют больший наружный диаметр (2,5–100 нм), чем однослойные (0,6–2,4 нм). Однослойные карбоновые нанотрубки характеризуются высокой жесткостью и упругостью и вместе с тем способны к обратимому сгибанию. Нанотрубки могут «прокалывать» мембрану клетки наподобие микроиглы. Регулируя длину нанотрубок, можно достичь и ядра клетки. Таким образом, нанотрубки можно использовать для избирательной внутриклеточной доставки лекарственных веществ и диагностических контрастов для прижизненной визуализации. Однако существуют и сомнения относительно биосовместимости углеродистых наноматериалов. Они могут вызывать токсический эффект, схожий с эффектом вдыхаемых асбестовых микрочастиц. Для оценки этой опасности необходимы дальнейшие исследования.

Дендримеры – трехмерные разветвленные макромолекулы с повторяющимся паттерном ветвления вокруг центрального ядра, что обеспечивает геометрическую правильность материала. После достижения пяти порядков ветвления дендримеры начинают содержать многочисленные полости, которые могут использоваться как наноконтейнеры для лекарственных препаратов. Установлено, что дендримеры могут служить носителями как гидрофильных, так и гидрофобных лекарственных молекул, причем высвобождение лекарственных средств является контролируемым. Наноразмерность дендримеров (1–100 нм) снижает вероятность их захвата и инактивации элементами ретикуло-эндотелиальной системы. Определенные опасения в плане безопасности дендримеров вызывают данные о разрушении клеточных мембран положительно заряженными дендримерами (Mescke et al., 2004).

Липосомы – шаровидные наночастицы с билипидной мембраной, похожей на мембрану клетки (рис. 1). Являются перспективными носителями лекарственных препаратов. Активное вещество может располагаться в ядре липосомы (водорастворимые вещества) либо в ее липидной оболочке (жирорастворимые вещества).

Мицеллы представляют собой наноразмерные коллоидные частицы, имеющие гидрофобную внутреннюю часть (ядро) и гидрофильную поверхность (оболочку). Лекарственные препараты и контрастные агенты могут либо помещаться в липидное ядро мицеллы, либо ковалентно связываться с ее поверхностью. Мицеллы имеют

несколько меньшие размеры (около 50 нм), чем липосомы. Для обеспечения продолжительной циркуляции мицеллы в кровотоке были предложены различные модификации их оболочки, делающие их термодинамически стабильными и биосовместимыми (Gaucher et al., 2005).

Среди металлических наночастиц наиболее известны наночастицы таких благородных металлов, как золото и серебро. Наночастицы золота, обладающие целым рядом уникальных характеристик (оптические свойства, прочность, высокая площадь поверхности), в основном используются в диагностических целях. Наночастицы золота могут служить для усиления сигнала при проведении иммуноферментного анализа за счет их связывания с антителами. Наночастицы серебра в последние годы с успехом применялись для усиления флуоресценции в иммунодиагностике.

Отдельного внимания заслуживают наночастицы из биодegradуемых материалов, например альбумина, коллагена, жиров и синтетических полимеров, которые призваны решить проблему биосовместимости и безопасности.

Наночастицы могут вводиться в организм подобно обычным лекарствам: ингаляционно, парентерально или перорально, а также через кожу. В некоторых клинических исследованиях был обнаружен захват нейронами обонятельной луковицы человека вводимых интраназально наночастиц золота диаметром 50 нм (Lorenzo, 1970). Исследовательская группа Desai M. (1996) изучала всасываемость наночастиц в кишечнике. Было установлено, что частицы размерами до 100 нм попадают внутрь клеток кишечного эпителия легче, чем частицы микрометровых размеров, посредством энергетически малозатратного эндоцитоза. Известно также, что нейтральные гидрофобные наночастицы всасываются лучше, чем гидрофильные (Hussain et al., 2001). Попадая внутрь клетки, наночастицы способны оказывать самые разнообразные (в зависимости от поставленной задачи) влияния: блокировать или стимулировать внутриклеточные, в том числе ядерные, рецепторы, регулировать экспрессию генов и клеточный цикл. Благодаря сочетанию уникальных характеристик наночастицы открывают перспективы разработки методов терапии, селективных не только в отношении органов и тканей, но и отдельных клеток и даже молекул. Так, Chen X. et al. (2007) открыли свойство наночастиц гидроксипата вызвать апоптоз клеток карциномы желудка SGC-7901 путем нарушения митохондриального аппарата и каспазных путей транскрипции.

Ценными для медицины свойствами являются электро- и теплопроводность некоторых наноматериалов. Помещение суперпарамагнитных наночастиц в циклическое магнитное поле приводит к их выраженному разогреву за счет электрического сопротивления металлического компонента. В экспериментах Wang L. et al. (2012) ферромагнитные наночастицы, управляемые внешним магнитным полем, успешно применены для термической абляции опухоли поджелудочной железы без системного вреда для организма хозяина. Группа под

руководством Kim D. разработала и испытала в экспериментах металлические наноразмерные микродиски, которые при определенной модуляции управляющего магнитного поля вызывают механическое повреждение раковых клеток. В настоящее время изучается безопасность данного воздействия на окружающие опухоль ткани.

Наноматериалы могут быть использованы не только для разработки новых лечебных подходов, но и для усовершенствования существующих. Seitz U. et al. (2007) разработали гидрофобное золь-гелевое покрытие для тefлоновых билиарных стентов, которое призвано решить проблему стужкообразования и закупорки стента.

Рассмотрим некоторые перспективные направления наномедицины, которые имеют прямое отношение к гастроэнтерологии и, возможно, в будущем радикально изменят существующие подходы к диагностике и лечению различных заболеваний желудочно-кишечного тракта.

Нанотехнологии для целевой доставки лекарств

Традиционная модель доставки лекарственной субстанции к месту действия заключается в том, чтобы насытить большой объем ткани большим объемом препарата. При этом лекарство попадает в кровь и другие биологические жидкости организма, распределяется в тканях, которые не имеют отношения к патологии. Это ведет к быстрому развитию лекарственной резистентности из-за высоких концентраций препарата, а также к нежелательным местным и системным побочным эффектам. Наноматериалы с их уникальными избирательными свойствами претендуют на роль идеальной доставочной формы для различных лекарственных средств. На сегодняшний день создано пять типов доставочных форм на основе нанотехнологий: водорастворимые полимеры (натуральные антитела или синтетические полимеры), наноэмульсии (наноклапты масла, стабилизированные амфифильным покрытием поверхности), наносферы (твердые сферические наночастицы из натуральных или синтетических полимеров), липосомы и полимерные мицеллы. Основной проблемой на пути широкого использования наночастиц как доставочной формы в гастроэнтерологии является их уязвимость для факторов агрессии, таких как кислая среда желудка и пищеварительные ферменты поджелудочной железы. В настоящее время многие исследователи пытаются решить задачу защиты наночастиц при пероральном введении.

Разработаны и проходят испытания наночастицы для таргетной (целевой) доставки антибиотиков, иммуномодуляторов и средств химиотерапии. Umamaheshwari R. et al. (2004) построили молекулы амоксицилина в глиадиновые наночастицы, обладающие высокой адгезией к слизистой оболочке желудка. В экспериментах на крысах авторы показали, что мукоадгезивные наночастицы пролонгируют антибактериальный эффект амоксицилина в отношении *H. pylori* и что для успешной эрадикации хеликобактерной инфекции требуется меньшая доза антибиотика.

Хитозановые наночастицы размером 65 нм, несущие на своей поверхности электрический заряд, существенно подавляют пролиферацию клеток карциномы желудка линии MGC803 (Qi L. et al., 2005). Это открытие послужило стимулом к разработке хитозановых наноконтейнеров для доставки к раковым клеткам 5-фторурацила. Это средство широко применяется для химиотерапии при опухолях желудочно-кишечного тракта, однако вызывает целый ряд побочных эффектов со стороны печени, почек и костного мозга. Zhang D. et al. (2008) в опытах на грызунах показали, что хитозановые наночастицы с 5-фторурацилом обеспечивают более стабильную концентрацию химиопрепарата и более эффективное подавление роста опухоли по сравнению с контрольной группой, где фторурацил вводился традиционным способом. При этом у мышей, которым вводился нанопрепарат, отмечалось меньше побочных эффектов.

Колоректальный рак – один из наиболее частых видов рака во всем мире. Нанотехнологии дают надежду на более эффективное лечение этой патологии. Schluer T. et al. (2005) изучали фармакокинетику и эффекты камфотерин-полимерного конъюгата IT-101 у грызунов с колоректальным раком. Камфотерин является натуральным алкалоидом с широким спектром противоопухолевой активности, опосредованной взаимодействием с ядерным ферментом топоизомеразой. Полимерный носитель продлевал период полувыведения камфотерина, что приводило к усилению противоопухолевого

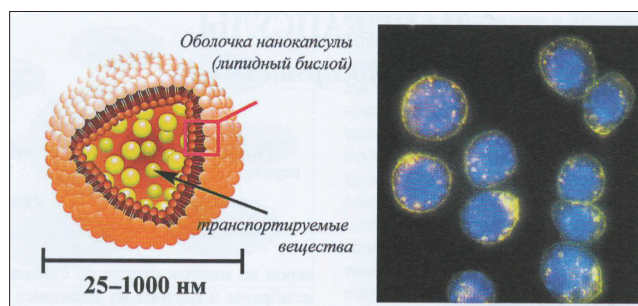


Рис. 1. Структура липосомы и микрофотография липосом, содержащих люминесцентные частицы

Діагностика в гастроентерології

эффекта по сравнению с контрольной группой (обычная лекарственная форма камфотерицина). Кроме того, лечебный эффект достигался при применении меньшей дозы камфотерицина, благодаря тому что полимерный носитель предотвращал выход препарата из сосудистого русла в ткани и снижение его концентрации в плазме крови.

Перспективный способ подавления роста опухоли — это нарушение неоваскуляризации. Gosk et al. (2008) разработали иммунолипосомы на основе модифицированного полиэтиленгликоля, способные нейтрализовать эндотелиальный фактор адгезии VCAM-1, гиперэкспрессия которого наблюдается в эндотелиоцитах опухоли. На модели колоректального рака у грызунов было показано, что иммунолипосомы избирательно накапливаются в эндотелии сосудов опухоли, но не обнаруживаются в нормальных сосудах. Годом позже Chang D. с соавт. объяснили эту селективность соотношением размеров наночастиц и пор в сосудистой стенке. Наночастицы свободно проходят поры новообразованных сосудов, которые больше по размеру, но не задерживаются в общем кровотоке, так как не проходят в поры нормальных сосудов. Исследовательская группа под руководством D. Chang также экспериментировала с иммунолипосомами, содержащими доксорубин. Было показано, что этот подход позволяет эффективно подавлять неопластический рост, индуцировать апоптоз раковых клеток и вызывать значительный регресс опухоли.

Неспецифические воспалительные заболевания кишечника остаются актуальной проблемой современной гастроэнтерологии, несмотря на совершенствование средств фармакотерапии. В их основе лежит хроническое аутоиммунное воспаление. Известно, что макрофаги продуцируют факторы адгезии (cell adhesion molecules, CAM), которые вовлекают в воспалительную реакцию все новые клетки. Некоторые из молекул адгезии после связывания с мембраной захватываются внутрь клеток для дальнейшей рециркуляции. Перспективным направлением является разработка наночастиц, которые могли бы связываться с CAM и таким образом легко распространяться в очаге воспаления и проникать в макрофаги (Dunehoo A., 2006; Zhang N., 2008). Еще одна задача, которую могут решить нанотехнологии в лечении воспалительных заболеваний кишечника, — минимизация побочных эффектов иммуномодуляторов, таких как азатиоприн, меркаптопурин, а также стероидных гормонов, которые широко применяются у данной категории пациентов. Некоторые ученые уже испытывают наночастицы, несущие к месту воспаления месалазин, такролимус, стероиды. Наночастицы легко адгезируются к кишечной слизи, которая продуцируется воспаленной слизистой оболочкой кишки в повышенных количествах, и благодаря своим размерам беспрепятственно проникают в воспаленную ткань. Липофильная оболочка пролонгирует высвобождение действующего вещества. За счет таргетной доставки и замедленного высвобождения существенно улучшаются результаты лечения и повышается безопасность. Pertuit D. с соавт. (2007) успешно испытали на модели колита у грызунов полимерные наночастицы с месалазином. Коллективом под руководством Meissner Y. (2006) разработаны pH-чувствительные наноносители для такролимуса — мощного иммуносупрессанта с выраженными побочными эффектами. На модели колита у мышей было достигнуто не только значимое снижение активности воспаления, но и уменьшение нефротоксичности — основного побочного эффекта такролимуса.

Применение наноматериалов в визуализирующих исследованиях

Наночастицы представляют интерес не только как средства повышения эффективности терапии, но и как перспективный материал для разработки новых и совершенствования существующих методов диагностики *in vitro* и *in vivo*.

Новообразования верхних отделов желудочно-кишечного тракта часто диагностируются на поздних стадиях, когда радикальное лечение уже невозможно. Нанотехнологии открывают перспективы ранней диагностики рака пищевода. Инвазивной аденокарциномой пищевода предшествуют быстро протекающие стадии метаплазии (пищевод Барретта) и дисплазии. Многие солидные опухоли, включая аденокарциному пищевода, продуцируют поверхностный гликопротеин мезотелин. Alvarez H. с соавт. (2008) конъюгировали моноклональные антитела к мезотелину с полупроводниковыми

нанокристаллами — квантовыми точками. Спектральная микроскопия культуры эпителиальных клеток пищевода, обработанных наноматериалом, показала, что экспрессия мезотелина строго ограничена участками инвазивной аденокарциномы и ее метастазами, но не наблюдается в интактных участках эпителия. Это дает возможность использовать наночастицы с мезотелином в качестве высокочувствительного инструмента диагностики аденокарциномы пищевода на ранних стадиях.

Kim G. et al. (2007) разработали наночастицы органически модифицированного силиката (ORMOSIL), содержащие индоциановый краситель. Если на поверхность частиц поместить специфические антитела (например, антигены опухоли), то такой материал становится высокочувствительным контрастом для фотоакустической спектроскопии и может применяться в ранней диагностике рака. Kumar R. et al. (2010) в экспериментах *in vivo* успешно испытали еще один вариант применения наноматериала ORMOSIL — с флуорофорами инфракрасного диапазона и радиоизотопом ¹²⁴I. Показана не только перспективность данного вида наночастиц в визуализирующих исследованиях, но и отсутствие их тканевой токсичности.

Квантовые точки — это полупроводниковые нанокристаллы с длительным периодом полужизни и широким спектром флуоресценции. Они могут применяться в качестве чувствительных биосенсоров и контрастных веществ (рис. 2). Zhang Y. et al. (2007) разработали pH-чувствительные квантовые точки теллурида кадмия, которые реагируют изменением длины волн флуоресценции в ответ на изменение плотности потока протонов через клеточные мембраны, и успешно применили их для детекции *in vitro* вируса птичьего гриппа H9. Исследовательская группа M. Hahn (2005) использовала металлические квантовые точки с полимерным покрытием для детекции антигенов *Escherichia coli*. Чувствительность данного метода в экспериментах достоверно превысила чувствительность других применяемых на практике иммуноферментных тестов.

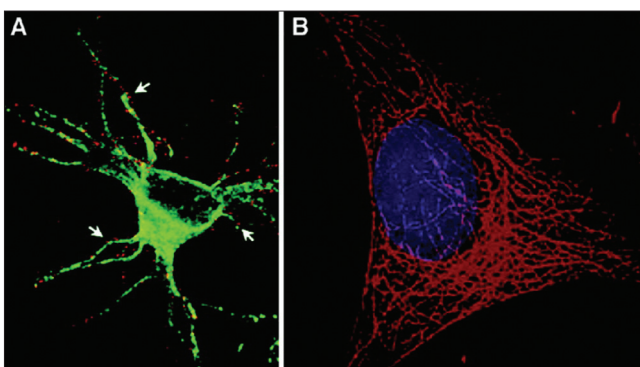


Рис. 2. Визуализация внутриклеточных структур с помощью квантовых точек (Dahan M. et al., 2003)

Уникальные оптические свойства квантовых точек могут быть использованы и в фотодинамической терапии. Это относительно новый и весьма перспективный вид лечения онкологических заболеваний. Из специальных порфириносодержащих препаратов под воздействием красного лазерного облучения (только красный свет хорошо проникает в ткани организма) высвобождаются высокореактивные радикалы кислорода, которые селективно повреждают клетки опухоли. Использование квантовых точек вместо органических носителей кислородных радикалов обеспечивает важные преимущества: они метаболически устойчивы в организме и универсальны, так как один и тот же наноматериал относительно легко приспособить для разных терапевтических мишеней, присоединяя к нему специфические антитела или антигены.

Нанотехнологии и регенеративная медицина

Использование наноматериалов в качестве матрицы или «строительного материала» для замещения тканевых дефектов и стимуляции органогенеза может открыть новую эру в регенеративной медицине и трансплантационной хирургии. В качестве стимуляторов регенерации испытываются различные наноматериалы. Например, в гидрогели, которые по структуре схожи с белками экстрацеллюлярного матрикса, можно поместить стволовые клетки. При контакте с поврежденными тканями организма гидрогель изменяет свое агрегатное состояние с жидкости на гель и создает благоприятные условия для роста и дифференциации включенных в него клеток.

Коллектив исследователей под руководством Eloumi Hannachi I. в 2010 г. представил новый метод регенерации, названный авторами «технология клеточного листа». В ней используется полимерная термочувствительная мембрана толщиной менее 100 нм. Мембрану импрегнируют клетками той ткани реципиента, которую необходимо регенерировать, после чего в инкубаторе на мембране выращивается монослой живых клеток. При понижении температуры до 20°C этот слой становится отделен от мембраны, и его можно использовать непосредственно для замещения тканевого дефекта *in vivo*. В экспериментах на животных метод успешно применялся для замещения язвенных дефектов пищевода, выращивания трансплантатов эндокринных клеточных островков поджелудочной железы при сахарном диабете 1 типа.

Другой инновационный метод регенерации поврежденных тканей связан с использованием амфифильных пептидных наночастиц. Их пептидный состав обеспечивает хорошую биосовместимость. Амфифильные носители легко функционализировать разными биоактивными молекулами — ростовыми факторами, участками ДНК, гликозаминогликанами и др. Пептидные амфифиллы в водной среде способны к самосборке в наноплазматы или наносферы, из которых формируется гелевая субстанция, схожая по структуре и свойствам с естественным экстрацеллюлярным матриксом. Эта субстанция создает идеальные условия для межклеточных взаимодействий и регенерации поврежденных тканей (Webber M., 2010).

Сразу несколько научных коллективов работают над выращиванием участков тонкой кишки. Создание кишечных трансплантатов может кардинально изменить подходы к лечению заболеваний кишечника, приводящих к необратимому его повреждению, когда единственным выходом остаются инвалидизирующие резекционные операции. Кишечный эпителий характеризуется высокой скоростью обновления клеток и обладает хорошим регенеративным потенциалом. Gupta A. et al. (2009) успешно использовали наноконструктивный материал POSS-PCL (поликапролактон) в качестве подложки для выращивания слоя эпителиальных клеток тонкой кишки. Ueda T. et al. (2010) вырастили таким образом целый участок кишки из плюрипотентных стволовых клеток мышей. Искусственная кишка состоит из дифференцированных клеточных элементов и полностью функциональна: способна к спонтанному сокращению и даже к высококоординированной перистальтике.

Совсем недавно наномедицина сделала «первые шаги» из лабораторий в клиническую практику: под руководством профессора А.М. Seifalian в Королевском госпитале Лондона (Великобритания) впервые была создана и успешно имплантирована человеку искусственная трахея, выращенная на основе наноконструктивного материала и аутологических стволовых клеток (Brakmane G., Winslet M., Seifalian A.M., 2012). Появились публикации об успешной имплантации слезных каналов и кровеносных сосудов малого диаметра, выращенных на матрице из наноконструктивных материалов (Ahmed M. et al).

Заключение

Большинство из приведенных в этом обзоре данных получено в исследованиях *in vitro* и экспериментах на животных. Они дают некоторое представление о видах и свойствах наноматериалов, их поведении в живых тканях и тех возможностях, которые открывают нанотехнологии в диагностике и лечении различных заболеваний. Но эти первые обнадеживающие результаты должны стать трамплином для дальнейших исследований прикладного характера, чтобы в ближайшем будущем нанотехнологии нашли применение в клинической медицине. Уникальные свойства наночастиц вполне очевидно указывают на перспективные направления разработки лекарственных средств и диагностических тестов. Нанотехнологии как никогда раньше приближают нас к аутооттрансплантации участков высокоспециализированных тканей и даже органов, раскрывая потенциал использования стволовых клеток. В процессе изучения диагностических и лечебных свойств наноматериалов исследователи все глубже проникают в тайны устройства человеческого организма, этиологии и патогенеза давно известных клиницистам заболеваний, и этот «вторичный» продукт, возможно, окажет большее влияние на медицину XXI века, чем сами нанотехнологии.

Подготовил Дмитрий Молчанов

3y