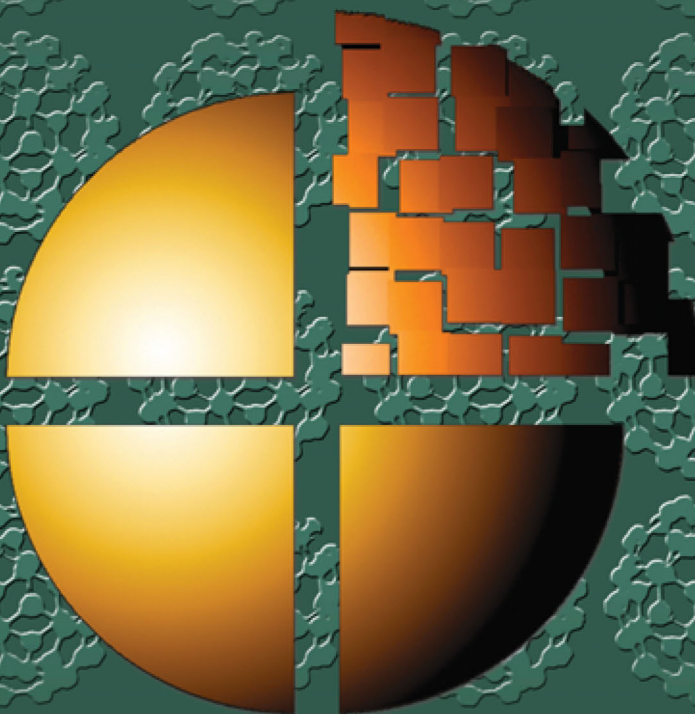


● ● ● Н А Н О Т Е Х Н О Л О Г И И ● ● ●

НАНОСТРУКТУРЫ В БИОМЕДИЦИНЕ



ИЗДАТЕЛЬСТВО

БИНОМ

BIOMEDICAL NANOSTRUCTURES

Edited by

Kenneth E. Gonsalves

Polymer Nanotechnology Laboratory

Department of Chemistry and Center for Optoelectronics and Optical Communications, University of North Carolina at Charlotte

Craig R. Halberstadt

Department of Surgery

Carolinas Medical Center

Cato T. Laurencin

Department of Orthopaedic Surgery

Department of Biomedical & Chemical Engineering

University of Virginia

Lakshmi S. Nair

Department of Orthopaedic Surgery

University of Virginia



WILEY-INTERSCIENCE

A JOHN WILEY & SONS, INC., PUBLICATION

НАНОСТРУКТУРЫ В БИОМЕДИЦИНЕ

Под редакцией
Кеннет Е. Гонсалвес
Крейг Р. Хальберштадт
Като Т. Лоренсин
Лакшми С. Наир

Перевод с английского
канд. хим. наук С. А. Бусева
канд. хим. наук Т. П. Мосоловой
канд. физ.-мат. наук А. В. Хачояна

3-е издание (электронное)



Москва
БИНОМ. Лаборатория знаний
2015

УДК 57-022.532
ББК 5+28.072+24.5
Н25

Серия основана в 2006 г.

Наноструктуры в биомедицине [Электронный ресурс] / Н25 под ред. К. Гонсалвес, К. Хальберштадт, К. Лоренсин, Л. Наир ; пер. с англ. — 3-е изд. (эл.). — Электрон. текстовые дан. (1 файл pdf : 538 с.). — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2015. — (Нанотехнологии). — Систем. требования: Adobe Reader XI ; экран 10".

ISBN 978-5-9963-2924-3

Книга представляет собой обзор исследований, посвященных вопросам применения наноструктурированных материалов в целях ранней диагностики опасных болезней, адресной доставки лекарств к пораженным тканям и органам, разработок принципиально новых методов терапии и хирургии, создания молекулярных инструментов и нанохирургии, протезирования, трансплантации и регенерации тканей и решения других биомедицинских задач. Авторский коллектив объединил ученых США, Великобритании, Индии и Кореи.

Для исследователей и клиницистов, а также преподавателей и студентов, заинтересованных в получении знаний по нанобиотехнологиям.

УДК 57-022.532
ББК 5+28.072+24.5

Деривативное электронное издание на основе печатного аналога: Наноструктуры в биомедицине / под ред. К. Гонсалвес, К. Хальберштадт, К. Лоренсин, Л. Наир ; пер. с англ. — М. : БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. — 519 с. : ил., [16] с. цв. вкл. — (Нанотехнологии). — ISBN 978-5-9963-0525-4.

В соответствии со ст. 1299 и 1301 ГК РФ при устранении ограничений, установленных техническими средствами защиты авторских прав, правообладатель вправе требовать от нарушителя возмещения убытков или выплаты компенсации

© 2008 by John Wiley & Sons, Inc.
All Rights Reserved. This EBook is published under license with the original publisher John Wiley & Sons, Ltd.

© Перевод, оформление. БИНОМ.
Лаборатория знаний, 2012

ISBN 978-5-9963-2924-3

АВТОРСКИЙ КОЛЛЕКТИВ

- Агравал Амит.** Факультет биомедицинской инженерии, Университет Эмори, Атланта, США.
- Бетагери Гуру В.** Главное отделение фармацевтических наук, Фармацевтический колледж Западного университета наук о здоровье, США.
- Блэкборн Уильям Х.** Технологический институт штата Джорджия, Школа химии и биохимии и Пети институт по биоинженерии и биологическим наукам, Атланта, США.
- Бхаттачариа Субхабрата.** Химический факультет университета штата Виргиния, США.
- Вазир Джасприт К.** Отделение фармакологии, Фармацевтический колледж, Университетский медицинский центр Небраски, Омаха, США.
- Валмикинантан Чандра М.** Отделение химии, биомедицины и материаловедения, Технологический институт Стивенса, Хобокен, США.
- Ван Дзюньпин.** Отделение химии, биомедицины и материаловедения, Технологический институт Стивенса, Хобокен, США.
- Ван И-Нин Е.** Лаборатория биоматериалов и методов тканевой инженерии, Отделение биомедицинской инженерии, Колумбийский университет, Нью-Йорк, США.
- Ван Май Дуньмэй.** Факультет биомедицинской инженерии, Технологический институт штата Джорджия, Атланта, США.
- Гасиоровски Джошуа З.** Хирургическое отделение, Школа ветеринарной медицины, Университет штата Висконсин, Мэдисон, США.
- Гонсалвес Кеннет Е.** Лаборатория полимерной нанотехнологии, Химический факультет и центр оптоэлектроники и оптической связи, Университет штата Северная Каролина, США.
- Гуань Цзиньцзяо.** NSF нанонауки и инженерный центр по наноинженерным полимерным биомедицинским устройствам, Университет штата Огайо, Колумбия, США.
- Демирси Уткан.** Гарвардская медицинская школа, Отделение наук о здоровье и технологии, Массачусетский технологический институт, Кембридж, США; Бриган и женская больница, Кембридж, США.

- Добсон Джон.** Институт наук и технологий в медицине, Кильский университет, Хартсхил, Stoke-on-Trent, Великобритания.
- Докмеси Мехмет Р.** Факультет прикладной электроники, Северо-восточный университет, Бостон, США.
- Дубе Никхил.** Факультет биологических наук и биоинженерии, Индийский технологический институт, Канпур, Индия.
- Дутта Джойдип.** Факультет биологических наук и биоинженерии, Индийский технологический институт, Канпур, Индия.
- Ингбер Дональд Е.** Сосудистая биологическая программа, Отделение патологии и хирургии детского госпиталя и Гарвардской медицинской школы, Бостон, США.
- Катти Дхирендра С.** Факультет биологических наук и биоинженерии, Индийский технологический институт, Канпур, Индия.
- Коллингвуд Джоанна Ф.** Институт наук и технологии в медицине, Кильский университет, Хартсхил, Stoke-on-Trent, Великобритания.
- Кофрон Мишель Д.** Факультет биомедицинской инженерии, Университет штата Виргиния, США.
- Кумбар Сангамеш Г.** Факультет ортопедической хирургии, Университет штата Виргиния, США.
- Лабхасетвар Винод.** Отделение биомедицинской инженерии, Институт исследований Лернера, Кливлендский клинический фонд, Кливленд, США.
- Лайон Эндрю.** Технологический институт штата Джорджия, Школа химии и биохимии и Пети Институт по биоинженерии и биологическим наукам, Атланта, США.
- Леле Танмей.** Факультет химической инженерии, Университет штата Флорида, Гейнсвилл, США.
- Ли Л. Джеймс.** NSF нанонауки и инженерный центр по наноинженерным полимерным биомедицинским устройствам, Университет штата Огайо, Колумбия, США.
- Ли Цзяньвэй Джефф.** Исследовательский центр по био/нано взаимодействиям, Химический факультет, Онкологический центр Шенса, Университет штата Флорида, Гейнсвилл, США.
- Ли Юун-Сик.** Лаборатория органического синтеза, Школа химической и биохимической инженерии, Сеульский национальный университет; Корейский институт наноустройств, Национальный исследовательский центр; Сеульский национальный университет, Сеул, Корея.

- Лилиенсик Сара Дж.** Хирургический факультет, Школа ветеринарной медицины, Университет штата Висконсин, Мэдисон, США.
- Лоренсин Като Т.** Факультет ортопедической хирургии, Отделение биомедицинской и химической инженерии, Университет штата Виргиния, США.
- Лу Хелен Х.** Биоматериалы и лаборатория методов тканевой инженерии, Факультет биомедицинской инженерии, Колумбийский университет, Нью-Йорк; Колледж стоматологической медицины, Колумбийский университет, Нью-Йорк, США.
- Мвенифумбо Стив.** Отделение материалов, Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания; Институт биомедицинской инженерии, Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания.
- Мерфи Кристофер Дж.** Хирургический факультет, Школа ветеринарной медицины, Университет штата Висконсин, Мэдисон, США.
- Моррисон Дэвид В.Г.** Гарвардская медицинская школа, Отделение наук о здоровье и технологии, Массачусетский технологический институт, Кембридж, США.
- Наир С. Лакшми.** Факультет ортопедической хирургии, Университет штата Виргиния, США.
- Не Шумин.** Факультет биомедицинской инженерии, Университет Эмори, Атланта, США.
- Нили Пол Ф.** Отделение химии и биологической инженерии, Школа ветеринарной медицины, Университет штата Висконсин, Мэдисон, США.
- Нукаварану Сиам П.** Факультет ортопедической хирургии, Университет штата Виргиния, США.
- Райт Ли Д.** Школа биомедицинской инженерии и наук, Виргинский технологический колледж, Блэксбург, США.
- Рассел Пол.** Отделение хирургии, Школа ветеринарной медицины, Университет штата Висконсин, Мэдисон, США.
- Роджерс Аманда.** Отделение химии, биомедицины и материаловедения, Технологический институт Стивена, Хобокен, США.
- Сингх Ниту.** Технологический институт штата Джорджия, Школа химии и биохимии и Пети Институт по биоинженерии и биологическим наукам, Атланта, США.
- Соппимат Кумераш С.** Колледж фармакологии, Западный университет наук о здоровье, Помона, США.

- Стивенс Молли М.** Отделение материалов, Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания; Институт биомедицинской инженерии, Имперский колледж Лондона, Лондон, Великобритания.
- Тань Вэйхун.** Исследовательский центр био- и нановзаимодействий, Отделение химии, Онкологический центр Шендса, Университет штата Флорида, Гейнсвилл, США.
- Фоли Джон Д.** Хирургическое отделение, Школа ветеринарной медицины, Университет штата Висконсин, Мэдисон, США.
- Фриман Джозеф В.** Школа биомедицинской инженерии и наук, Виргинский технологический колледж, Блэксбург, США.
- Хадемхоссейни Али.** Гарвардская медицинская школа, Отделение наук о здоровье и технологии, Массачусетский технологический институт, Кембридж, США; Центр по биомедицинской инженерии, Бриган и женская больница, Кембридж, США.
- Хальберштадт Крейг.** Tengion, Inc., Winston Salem, США.
- Хе Хунъянь.** NSF нанонауки и инженерный центр по наноинженерным полимерным биомедицинским устройствам, Отделение химической и биомолекулярной инженерии, Университет штата Огайо, Колумбия, США.
- Хэ Вэй,** Факультет биомедицинской инженерии, Технологический институт штата Джорджия, США.
- Цао Цзехуэй Чарльз.** Центр исследований био- и нановзаимодействий, химическое отделение, Онкологический центр Шендса, Университет штата Флорида, Гейнсвилл, США.
- Чэнь Янь.** Центр исследований био- и нановзаимодействий, химическое отделение, Онкологический центр Шендса, Университет штата Флорида, Гейнсвилл, США.
- Чо Мьюн-Хаинг.** Лаборатория токсикологии, Колледж ветеринарной медицины, Сеульский национальный университет, Корейский институт наносистем, Национальный центр исследований, Сеульский национальный университет, Сеул, Корея.
- Юй Бо.** NSF нанонауки и инженерный центр по наноинженерным полимерным биомедицинским устройствам, Отделение химической и биомолекулярной инженерии, Университет штата Огайо, Колумбия, США.
- Юй Сяогунь.** Отделение химии, биомедицины и материаловедения, Технологический институт Стивена, Хобокен, США.

Часть I

ПОЛУЧЕНИЕ НАНОСТРУКТУР

МЕТОДЫ СОЗДАНИЯ НАНОСТРУКТУР

Джозеф В. Фриман, Ли Д. Райт, Като Т. Лоренсин и Субхабрата Бхаттачариа

1.1. Введение

В настоящее время во всем мире вызывают интерес методы исследования и способы получения наномасштабных структур. Чрезвычайно небольшие размеры подобных устройств и функциональные особенности наноматериалов в недалеком будущем могут изменить практически все аспекты человеческой жизни.

Посредством наномасштабных устройств осуществляют направленную доставку лекарств в организме; наноструктуры задействованы в процессах регенерации костной и хрящевой тканей, изготовлении сердечных клапанов, диагностики и лечения рака, терапии болезней Паркинсона и Альцгеймера и во множестве других медицинских применений.

Покртия, толщиной всего в одну молекулу, повышают износостойкость деталей механизмов, нанесение подобных слоев с особыми оптическими свойствами устраняет световые блики на стеклах.

Микроэлектромеханические системы (МЭМС) и наноэлектромеханические системы (НЭМС) позволяют решать самые разные задачи, например исследовать человеческий организм (БиоМЭМС и БиоНЭМС) на молекулярном уровне. На практике БиоМЭМС используют уже несколько десятилетий, впервые их начали применять в нейрофизиологии. В семидесятых годах прошлого столетия группой Отто Прохаска был разработан первый планарный микросенсор для измерения активности нейронов. В своей работе [1] эти авторы сообщили о создании зондов для исследования взаимодействий нервных клеток и изучения патологической клеточной активности в коре головного мозга. Созданные компьютеры на основе НЭМС будут обладать огромным вычислительным потенциалом и быстроедействием, занимая при этом гораздо меньше места.

Многие из применяемых в настоящее время методов получения наномасштабных устройств основаны на ранее созданных технологиях. Разумеется, в некоторых специальных методах создания наноструктур применяются решения, найденные в ходе новейших разработок, другие основаны на комбинировании различных методов.

В этом разделе приведено несколько технологий, широко используемых при производстве наноразмерных изделий. Описанные методы позволяют создавать большое разнообразие структур — от волокон, стержней до слоев толщиной в одну молекулу.

Уже сейчас нанотехнологии оказывают огромное влияние на жизнь людей, однако постоянно появляются сообщения о новых успехах и разработках в создании и применении наноматериалов.

1.2. Фотолитография

Литография — способ печати, изобретенной в 1798 г., при котором печатной формой служила плоская поверхность известняка. В XIX в. получила широкое распространение в журнальной графике. Тогда же был создан процесс высокой печати, когда на форму с выступающими (печатающими) и углубленными (пробельными) элементами наносили краску, а затем изображение с поверхности переносили на бумагу [2].

В основе метода литографии заложено свойство масла не смешиваться с водой. Необходимые рисунки наносятся жирными чернилами или карандашом на специально подготовленный известняк. Потом камень смачивается водой, которую он впитывает лишь в местах, не покрытых жирным красителем. Чернила же отталкиваются мокрым камнем. Отпечаток получается путем прижатия бумаги к поверхности.

Метод оптической литографии появился в 70-х годах прошлого века вместе с математическим описанием данного процесса [3]. В 1979 г. разработали первую компьютерную программу «SAMPLE», моделирующую литографический процесс [3].

Фотолитография — метод, применяемый для переноса изображения на поверхность фоторезиста. Со временем этот процесс усовершенствовали и миниатюризировали; сейчас микролитографией получают полупроводниковые компьютерные микрочипы, а также специальные массивы из различных биосенсоров. В настоящее время фотолитография — одна из наиболее успешно применяемых технологий для производства микроизделий и интегральных микросхем [4]. Она включает несколько стадий: очистку подложки, нанесение слоя фоторезиста, сушку фоторезиста, экспонирование, проявление и сушка проявленного рельефа (вторая сушка фоторезиста) [5]. Ниже будут кратко описаны все этапы этого процесса.

1.2.1. Очистка подложки

Во время подготовки подложки материал, на котором будет проявляться рисунок, очищается от примесей. После очистки он высушивается в сушильном шкафу до полного удаления воды [3].

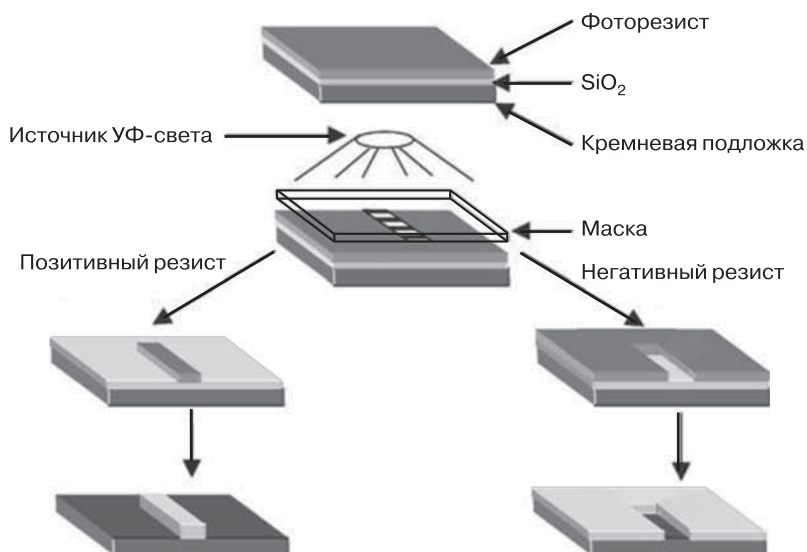


Рис. 1.1. Этапы проведения процесса фотолитографии с использованием позитивного и негативного типов фоторезистов

1.2.2. Нанесение фоторезиста

Есть два типа фоторезистного материала: позитивный и негативный. У позитивного фоторезиста под воздействием УФ-излучения растворимость повышается (рис. 1.1), поэтому после наложения на него маски его экспонированные области будут легко удаляться растворителем, оставляя лишь очертания маски и подложку (рис. 1.1) [5].

Напротив, негативные фоторезисты полимеризуются под действием УФ-света, что делает их менее растворимыми при экспонировании. После того как маска приподнята и материал промыт растворителем, с подложки смывается ранее прикрытый маской фоторезист (см. рис. 1.1). Следовательно, данный фоторезист создает негатив маски [5].

Обычно в состав фоторезистов, используемых в микроэлектронике, входят следующие компоненты: этиленгликоль, моноэтиловый эфир пропиленгликоля и метиловый эфир уксусной кислоты [6].

1.2.3. Первая сушка фоторезиста

Первое высушивание фоторезиста служит для удаления растворителя из фоторезистного покрытия. Оно же придает подложке фоточувствительность [3].

1.2.4. Экспонирование

На этой стадии маску устанавливают на подложку или над подложкой — так, чтобы картинка располагалась на ее поверхности (см. рис. 1.1). Существуют три различных способа установки маски перед экспонированием фоторезиста: контактная печать, печать с микрозазором и проекционная печать [5].

1.2.4.1. Контактная печать

Во время контактной печати поверхность подложки покрывают фоторезистом, и маска физически соприкасается с ним. Во время контакта с маской подложку подвергают УФ-излучению. Такой плотный контакт позволяет достигать микрометрового разрешения при воспроизведении рисунка. К сожалению, если какие-либо частицы застревают между маской и подложкой, они повреждают маску и становятся источником дефектов рисунка, создаваемого на подложке [5].

1.2.4.2. Контактная печать с зазором между маской и подложкой

При контактной печати с зазором перед экспонированием маска и подложка находятся на расстоянии 10–25 мкм. Данный способ предохраняет маску и создаваемую картинку от повреждения частицами, которое может произойти во время контактной печати. Однако зазор между маской и подложкой уменьшает разрешение до 2–4 мкм [5].

1.2.4.3. Проекционная печать

При проекционной печати изображение маски проецируется на подложку после покрытия ее фоторезистом. Этот метод позволяет получать картинки с высоким разрешением (1 мкм) посредством последовательного проецирования небольших участков маски. После нужного расположения маски на фоторезист через рисунок в маске подается УФ-свет высокой интенсивности [5].

1.2.5. Проявление

Проявление делает позитивный фоторезист более растворимым, а негативный фоторезист менее растворимым. При применении позитивного фоторезиста увеличение энергии излучения повышает растворимость резиста. В процессе с использованием негативного резиста при возрастании энергии излучения материал становится все менее и менее растворимым. Продолжительность и энергия облучения, необходимые для окончания проявления, зависят от следующих факторов: условий предварительной сушки, количества нанесенного фоторезиста и химических свойств проявителя. После завершения проявления образец промывают растворителем [5].

1.2.6. Повторное высушивание фоторезиста

Это последняя стадия фотолитографического процесса. Повторное высушивание фоторезиста требуется для повышения его прочности и улучшения сцепления между слоем фоторезиста и подложкой [5].

1.2.7. Ограничения фотолитографии

В современных фотолитографических установках, применяемых для производства микроэлектроники, используют проекционную систему печати. При этом изображение маски оптически уменьшается и проецируется на тонкую пленку фоторезиста через систему линз с большой цифровой апертурой. Разрешение, достигаемое с помощью данной проекционной установки, основано на пределе оптической дифракции, определяемой по уравнению Рэлея

$$R = k_1 \lambda / \text{NA}, \quad (1.1)$$

где k_1 — константа, зависящая от типа фоторезиста, λ — длина волны излучения светового источника, NA — числовая апертура системы линз.

Минимальный размер элемента изображения, который достигается с помощью этой методики, приблизительно равен значению λ , хотя теоретически пределом размера служит $\lambda/2$. Следовательно, для создания микро- и наномасштабных рисунков и структур необходимо применять коротковолновые источники излучения. Впрочем, выполнение этого условия делает микро- и нанопроизводство более сложным и дорогостоящим [4].

1.3. Специальные литографические методики

Для получения картинок и шаблонов в нанометровом масштабе, необходимых для изготовления полупроводниковых интегральных микросхем, наноэлектромеханических систем, микрохимических аналитических лабораторий на одном микрочипе, применяют специальные литографические технологии. Некоторые из них имеют стадии, аналогичные фотолитографии, отличие состоит в использовании источников энергии с меньшими длинами волн и меньших по размерам масок. Данные методики включают литографию с пучками электронов, наносферную литографию и литографию сфокусированного пучка ионов. Некоторые из них похожи на оригинальную литографию перенесением картинки (шаблона) из молекул в виде отпечатка непосредственно на подложку. Это методики «мягкой» литографии: микроконтактная печать, создание реплик, формование с микропереносом и микроформование, усиленное растворителем; литография с наностамповкой (наноимпринтная литография, или нанопечать) и метод погружного пера (тип сканирующей зондовой литографии) [4, 7].

1.3.1. Литография с применением пучков электронов

Данный метод используется при производстве полупроводников и для получения шаблонов масок, предназначенных для других типов литографии, например рентгеновской и оптической. В литографии посредством пучков электронов экспонированная подложка модифицируется за счет их энергии.

1.3.2. Наносферная литография

Наносферная литография напоминает другие типы литографии. В этом процессе маску заменяет слой наносфер. После экспонирования и проявления не покрытую наносферами смолу смывают, оставляя вертикальные стержни наномасштабных размеров.

1.3.3. «Мягкая» литография

«Мягкая» литография получила свое название из-за эластичных свойств штампа или шаблона, являющегося устройством, переносящим модель шаблона или рисунок на поверхность. В этих методах используются гибкие органические молекулы и другие материалы, проявляющие свойства эластичности, а не жесткие неорганические носители, обычно применяемые при производстве микроэлектронных систем [4]. Данный процесс не зависит от слоя резиста для переноса шаблона на подложку. «Мягкой» литографией получают микромодели в материалах штамповкой, тиснением или литьем по репликам [4].

При использовании этой технологии самоорганизующийся монослой наносится с помощью штампа на подложку [4]. Молекулярный оттиск монослоя может служить затравкой для выращивания кристаллов или связующим звеном ДНК при биоанализе. Методики «мягкой» литографии не ограничены оптической дифракцией, поскольку четкость изображения обусловлена силами Ван-дер-Ваальса и свойствами используемого материала [4]. «Мягкая» литография — более простой и дешевый способ получения наномасштабных структур, чем фотолитография.

1.3.4. Метод погружного пера

Метод погружного пера или перьевая литография — вариант литографии с применением сканирующего зонда. Наконечник атомно-силового микроскопа (АСМ) перемещает молекулы на поверхность носителя через мениск растворителя, который формируется внешними условиями. С помощью перьевой литографии можно получать структуры с размерами в интервале от нескольких сотен нанометров до 50 нм [7].

По существу перьевая литография — метод непосредственного рисования высокого разрешения. Ее применяют для создания микромасштабных и нано-

масштабных моделей и картинок, используя разные «чернила»: биомолекулы, органические молекулы, полимеры и неорганические молекулы на ряде подложек.

Впервые с помощью наконечника АСМ были получены картинки на поверхностях для координатного манипулятора, «нарисованные» растворами изооктадекантиолов в этаноле [8]. В настоящее время данная технология может быть востребована при конструировании белковых матриц, предназначенных для протеомика в фармакологических скрининговых процессах и для иммуноанализа на плашках [9].

Перьевая литография состоит из нескольких этапов. Первый — подготовка подложки, а именно ее очистка и промывка с целью удаления загрязнений и получения бездефектной поверхности. Для увеличения адгезии наносимого материала на подложку может быть добавлен самособирающийся монослой. На втором этапе наконечник АСМ покрывают «чернилами», которые наносятся на поверхность. Третий этап — создание желаемого рисунка (рис. 1.2) [7].

Формирование, структура и стабильность нанесенного материала зависят от ряда факторов. Формирование и стабильность структуры определяются силами адгезии между подложкой и нанесенным материалом, а также сцеплением между наносимым материалом и наконечником АСМ [9]. Одним из источников возникновения адгезии является поверхностный заряд. Статическое взаимодействие между заряженной поверхностью подложки и наночастицами с противоположным зарядом приводит к эффективному отложению материала на поверхность носителя [7].

Процесс переноса материала с наконечника на подложку также находится под влиянием когезии, возникающей между уже нанесенным материалом и материалом на кончике АСМ [8]. Температура проведения процесса сильно влияет на проведение перьевой литографии. От нее зависят растворимость и скорость диффузии биомолекул и органических молекул, определяющих размер нанок картинок. Еще один фактор — тип применяемого растворителя. Количество растворителя в материале может размывать очертания формирующегося

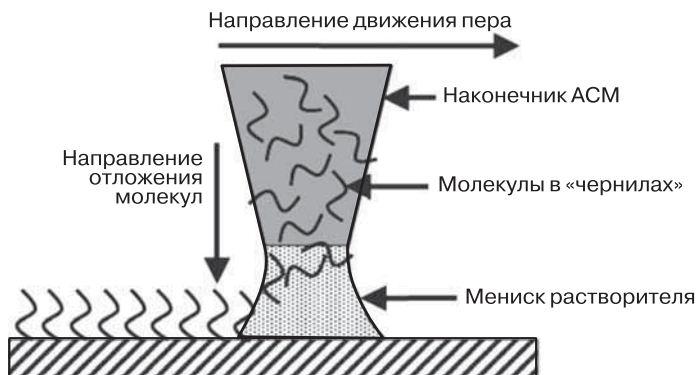


Рис. 1.2. Перьевая литография, перенос молекул с пера на поверхность подложки

на подложке осадка. По мере испарения растворителя из нанесенного материала, отложенный слой затвердевает [8].

Скорость перемещения наконечника относительно подложки может изменять размеры картинки. Увеличение скорости движения наконечника вызывает уменьшение рисунка. Влажность окружающей среды также важна для успешного переноса наносимого материала на подложку [7].

В недавнем прошлом был достигнут значительный прогресс в использовании перьевой литографии при прорисовывании нанок картинок биомолекулами и органическими молекулами за счет регулирования характеристик взаимодействия между поверхностью подложки и наносимыми молекулами [8]. Отметим, что для получения шаблонов или создания рисунков данным методом удалось подобрать совсем немного неорганических соединений. Примерами удачно подобранных целевых материалов служат чистые металлы и их оксиды [7].

1.3.5. Процесс LIGA

Буквенное сочетание **LIGA** — аббревиатура от немецких слов *Lithographie* (литография), *Galvanoformung* (гальваническое формирование) и *Abformung* (литье). Этот многостадийный процесс, описанный в работах [10, 11], был разработан в 1980-е гг. специально для создания трехмерных микромасштабных структур. Данная технология включает стадии литографии, электроформовки и литья пластиков и применяется в производстве микро- и наномасштабных литейных форм, которые обеспечивают значительный экономический выигрыш при масштабировании процесса. Основные стадии процесса LIGA (рис. 1.3) описаны ниже [10–12].

1.3.5.1. Глубокая рентгеновская литография

В методе LIGA на подложку — металлическое основание или кремневую пластину — толстым слоем в несколько сотен микрометров наносят радиационно-чувствительный полимер. Он либо приклеивается к подложке, либо полимеризуется на ней. Над полимерным слоем устанавливают маску, и ее очертание затем переносится на него при экспозиции с глубоким рентгеновским излучением и длиной волны от 0,2 до 0,6 нм (обычно применяется синхротронное излучение [11]).

1.3.5.2. Электроосаждение

На стадии проявления экспонированный полимер удаляют растворителем. На подложке остается полимерная микро- или наноструктура с большим аспектным соотношением — отношением высоты профиля к ширине. С помощью электроосаждения полости между трехмерными структурными элементами обычно заполняются золотом, медью, никелем, сплавами никель–железо или никель–кобальт [8].

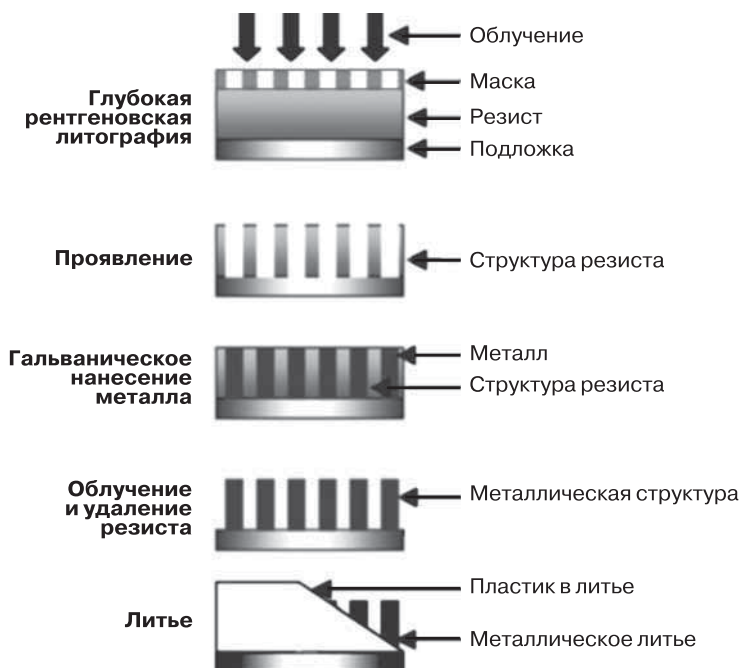


Рис. 1.3. Этапы процесса LIGA

1.3.5.3. Литье

Полученная структура (без маски) подвергается повторному рентгеновскому облучению, а остатки полимера удаляются с помощью растворителя или проявителя. На этой стадии формируется металлическая микро- или наноструктура с большим коэффициентом соотношения размеров. Затем эти структуры используют в качестве литейных форм при создании пластиковых деталей методами инъекционного литья, горячей штамповки или литья из смол [8].

1.4. Осаждение тонких пленок

Иногда на поверхность изделия необходимо нанести очень тонкую пленку материала. Обычно толщина пленок должна находиться в нанометровом диапазоне размеров. Модифицированные методики позволяют покрыть поверхность одноатомным слоем материала. Данные технологии применяются для создания различных устройств: оптических покрытий, проводников, полупроводников, изоляторов для электронных устройств и упаковочных пленок.

В общем, процесс осаждения можно описать тремя стадиями: первая — создание потока конденсируемого образца, включающего либо нейтральные ато-

мы, либо ионы; вторая — перенос образца на подложку; третья — выращивание пленки. Нанесение тонких пленок используется во многих отраслях промышленности: в производстве отражающих покрытий для оптических деталей (изоляторы, полупроводники и интегральные микросхемы), при изготовлении электронных деталей и очистке металлов, например меди, путем электроосаждения. Технологии создания тонких пленок наиболее востребованы в электронике. Процесс осаждения тонких пленок можно разделить на две категории: физическое нанесение и химическое осаждение. Лишь малое число методик нанесения тонких пленок полностью не подходят под эту классификацию: они будут описаны ниже. Заметим, что многие способы нанесения тонких пленок не основываются только на одной технологии; довольно часто применяется комбинация различных методов и технологий.

Физическое нанесение состоит из трех основных этапов: испарения, напыления и применения ионного пучка. В процессе испарения при нанесении тонкой пленки используют способность наносимого материала к испарению с целью создания потока вещества путем физического нагрева. Полученную нагретом субстанцию затем переносят на подложку для осаждения на требуемую поверхность. Разогрев материала осуществляют различными методами: нагревом с помощью пучка электронов, нитей накала, испарением в электрической дуге постоянного или переменного тока, индукционным нагревом и импульсным испарением.

Примером испарения в дуговом разряде постоянного тока является осаждение из катодной плазмы. В этой методике для создания способных к конденсации материалов применяется дуговой электрический разряд в вакууме. Конденсат создается из материала-источника катода путем импульсного испарения при перемещении активных пятен дуги вдоль целевой поверхности мишени. Эти пятна поддерживаются образующейся плазмой за счет самой дуги [13].

В технологию напыления входит синтез конденсируемого субстрата, получаемого бомбардировкой источника материала (мишени) положительно заряженными ионами инертного газа. Происходящие при этом столкновения выбивают атомы из источника, что приводит к образованию ионов на мишени. Описанный метод называется «напыление, индуцированное плазмой», так как плазма способствует выбиванию атомов и их скоплению на необходимой поверхности [13]. Напыление обладает преимуществом над упомянутыми выше технологиями испарения, поскольку оно не требует нагрева и не зависит от скорости испарения материала.

Технология на основе формирования пучков ионов базируется на ионизации материала, наносимого на поверхность, пучком ионов. Примером может служить методика, основанная на применении пучков ионов из газовых кластеров нейтрального газа, которые формируются путем переноса потока атомов или молекул, находящихся при высоком давлении, в вакуум через специальное сопло. Кластеры из нейтрального газа ионизируются за счет бомбардировки электронами и ускоряются приложением высокого напряжения, чтобы столкнуться с целевой подложкой. Удар влечет за собой почти одновременную реакцию

всех атомов, создающих очень высокую плотность энергии в небольшом объеме материала мишени [14].

Второй категорией методик нанесения тонких пленок является химическое осаждение. Его вызывают химические реакции в жидкой среде, приводящие к выпадению в осадок целевого продукта. Химическое осаждение из паровой фазы — вид осаждения, в ходе которого конденсируемый субстрат формируется из газов или паров, не конденсируемых без подвода энергии. Подложки нагреваются до высокой температуры, индуцируя разложение газов и приводя к осаждению необходимого субстрата. В технологии химического осаждения из паровой фазы иногда применяют плазму, созданную наложением электрического поля. При прохождении реагентов через плазму с низким давлением происходят ионизация, диссоциация и реакции в газовой фазе. Использование плазмы позволяет проводить процесс при значительно более низких температурах и не полагаться полностью на химические реакции, происходящие под действием термического нагрева [13]. Более подробно данный метод будет обсужден в разд. 1.7.

Нанесение гальванического покрытия — еще один вид химического осаждения, формирующего тонкие пленки. Гальваническое нанесение покрытий отличается от других типов нанесения тонких пленок применением жидких исходных веществ. Материал, подлежащий осаждению, сначала переводят в водный раствор. Несмотря на то, что нанесение гальванического покрытия может вызываться действием специальных реагентов в растворе, для инициации реакции образования слоя из желаемого материала обычно используется электрический ток или поток ионов.

Две следующие технологии осаждения тонких пленок, обсуждаемые в этом разделе, — эпитаксия молекулярным пучком и реактивное напыление. Строго говоря, их трудно отнести только к физическому или только к химическому осаждению, поскольку они представляют собой сочетание этих процессов. В ходе эпитаксии сверхчистые элементы нагревают с помощью молекулярных пучков, пока они не начинают постепенно переходить в газообразное состояние. Испарившиеся элементы не взаимодействуют с другими до конденсации на подложке. Эпитаксия происходит в глубоком вакууме, что обуславливает низкую скорость этого процесса, а следовательно, вещество формируется на носителе в виде больших по размеру зерен с упорядоченной ориентацией. Поэтапное осаждение позволяет каждый раз осаждать необходимый элемент в виде монослоя [15].

И наконец, последним приведенным в этом подразделе методом является реактивное напыление. В данном процессе небольшое количество неинертного газа, например кислорода или азота, смешивают с газом, образующим плазму. Затем материал мишени напыляют на подложку, взаимодействующую с газом. В результате происходит осаждение материала, отличного от исходного субстрата. Если используются кислород или азот, то на носителе формируются оксид или нитрид. Путем реактивного напыления можно получить весьма широкий спектр соединений [16].

1.5. Электроспиннинг

Электроспиннинг применяют для получения полимерных волокон с диаметром, относящимся к нанометровой области размеров. Основу метода составляет инъекция заряженного полимерного раствора на поверхность с противоположным зарядом. Впервые исследования по пропусканию проводящей жидкости через заряженную трубку с противоположно заряженным электродом, находящимся на некотором расстоянии от нужной поверхности, были описаны в работе [17]. В большинстве экспериментов исходным материалом служили водные растворы электролитов с высокой электропроводностью и низкой вязкостью. Приложение электрического заряда к раствору вызывало образование аэрозоля из заряженных капель, которые притягивались к противоположно заряженному электроду.

Практическое воплощение электроспиннинга похоже на электрораспыление; в обоих процессах заряд прилагается к раствору или расплаву полимера, инжектируемого в направлении противоположно заряженной мишени. Типичная установка для электроспиннинга изображена на рис. 1.4. В этих методах силы поверхностного натяжения и вязкость полимерного раствора придают капле на кончике иглы шприца полусферическую форму. Заряд, наведенный электрическим полем, заставляет эту каплю деформироваться в «конус Тейлора» [18]. Когда приложенное напряжение увеличивается выше пороговой величины, напряженность в капле превосходит противоположно действующие силы поверхностного натяжения и узкая заряженная струя выбрасывается из кончика «конуса Тейлора». При электрораспылении напряженность электрического поля и низкая вязкость раствора заставляют капли отделяться от конуса и распыляться на мишень. В ходе электроспиннинга концентрация раствора, вязкость раствора и хаотичное расположение волокон полимера вызывают его выталкивание из верхушки конуса. Сначала струя полимера идет почти по пря-

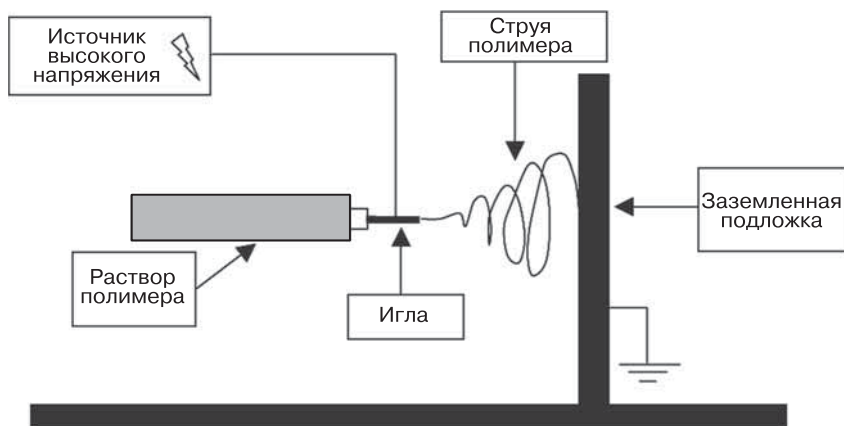


Рис. 1.4. Приборное оснащение типичного эксперимента электроспиннинга

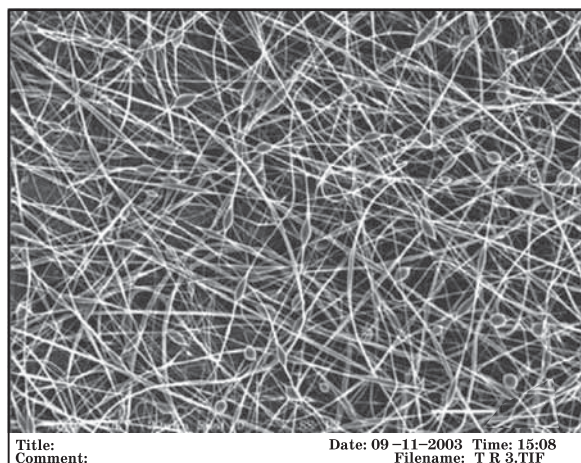


Рис. 1.5. Электроспиннинг волокон из сополимера полимолочной и гликолевой кислот

мой за счет внешнего электрического поля, взаимодействующего с полимером. Затем сформировавшаяся струя скручивается в спираль, что подтверждено скоростной видеосъемкой в работе [19]. Во время изгибания и сворачивания в спираль полимерная струя растягивается; при этом значительно уменьшается диаметр волокна и происходит быстрое испарение растворителя. В результате формируются нановолокна. Они неупорядоченно ложатся на заземленную мишень, образуя нетканый волоконный мат (рис. 1.5).

Электроспиннинг позволяет получать волокна субмикронного диаметра, изменяемого различным расстоянием между источником полимера и мишенью, концентрацией полимера и приложенным электрическим потенциалом [19]. На поверхности волокна могут ориентироваться по-разному под воздействием внешних механических или электростатических сил [20].

В 1934 г. этот процесс был запатентован в США [21]. В некоторых более ранних работах было обнаружено, что расплавленный воск может формировать нити под воздействием электрического поля высокой напряженности [17].

На ход электроспиннинга влияют несколько факторов. Их можно разделить на группы по свойствам полимерных растворов, параметрам процесса и условиям окружающей среды. К свойствам растворов полимеров относят вязкость, молекулярный вес, концентрацию полимера, поверхностное натяжение раствора и диэлектрические свойства растворителя [22–24]. Параметры электроспиннинга включают приложенный электрический потенциал, расстояние от иглы до коллектора, скорость движения потока, соотношение диаметров иглы и инъекционного отверстия и тип коллектора [22, 23, 25, 26]. К условиям окружающей среды, влияющим на процесс, относятся влажность, давление и газовый состав атмосферы [22, 25].

1.6. Наносферы

Технология создания наносфер представляет собой получение полимерных частиц диаметром несколько сотен нанометров. Их размеры и способность абсорбировать или присоединять к себе с помощью химических реакций на поверхности лекарственные препараты или факторы роста делают наносферы перспективными материалами для адресной доставки лекарств или факторов роста к определенным органам и тканям.

Наносферы можно получить путем эмульсионной диффузии растворителя. Сначала полимер растворяют в летучем органическом растворителе, например хлороформе, этилацетате или метилхлориде. Затем раствор полимера добавляют к воде, содержащей поверхностно-активное вещество (ПАВ) или стабилизатор, и перемешивают с помощью ультразвука. Образовавшиеся наносферы собирают посредством испарения растворителя при перемешивании или добавлением избытка воды.

Для характеристики данного продукта используют сканирующую электронную микроскопию. Размер и плотность сфер можно изменять варьированием скорости перемешивания раствора, количества добавленного полимера к раствору ПАВ или стабилизатора.

1.7. Углеродные нанотрубки

Свойства углерода сильно различаются в зависимости от формы, в которой он находится. В природе этот элемент существует в нескольких формах — от мягкого, легко обрабатываемого и электропроводящего графита до твердого, не поддающегося обычной обработке алмаза, проявляющего свойства изолятора. В графите атомы образуют ковалентно связанные матрицы, похожие на соты, уложенные слоями. Листы удерживаются слабыми силами Ван-дер-Ваальса, и если прикладывается большая сила, то слои углеродных атомов скользят друг относительно друга. Это делает графит хорошим смазочным материалом. Напротив, атомы углерода в алмазе расположены в виде тетраэдра. Такое строение объясняет исключительную твердость алмаза и препятствует его расслоению. Аналогично, расположение атомов в углеродных нанотрубках (УНТ) и их наномасштабные размеры придают этим структурам уникальные механические, химические и электрические свойства.

Углеродные нанотрубки по структуре напоминают длинные рулоны графита. Они могут синтезироваться в виде однослойных или многослойных трубок. Слои многослойных нанотрубок удерживаются ван-дер-ваальсовыми силами. Свойства УНТ определяются длиной, диаметром и хиральностью.

Вытянутые углеродные структуры были впервые обнаружены в газообразном состоянии в 1950-е гг. после изобретения электронного микроскопа. Углеродные нити длиной до нескольких сотен нанометров выросли на частицах катализатора из переходных металлов [27]. В приведенной работе была описа-

на их структура и высказано предположение о механизме роста. В 1990-х годах не раз наблюдали формирование многослойных углеродных нанотрубок в синтезах с применением электрической дуги, позднее с помощью лазерной абляции были получены однослойные УНТ [28].

Однослойные углеродные нанотрубки — очень устойчивые и жесткие структуры, что обусловлено прочной связью углерод–углерод и их бесшовностью. Модуль Юнга для монослойных углеродных нанотрубок равен 0,64 ТПа с пределом прочности на растяжение (т. е. напряжением, соответствующим максимальному значению нагрузки в момент разрыва образца), составляющим приблизительно 37 ГПа [29]. Электропроводность однослойных УНТ может быть различной: она варьируется от характеристик металлических проводников до полупроводников с различной шириной запрещенной энергетической зоны, зависящей от хиральности и диаметра трубки [29]. Углеродные нанотрубки применяются в качестве наполнителей полимеров для увеличения механической прочности композитов, в наносенсорах и при получении изображений биообъектов и т. п.

УНТ обычно синтезируют, используя электрический дуговой разряд, лазерную абляцию углерода, химическое осаждение из паровой фазы и другие методы.

1.7.1. Электрический дуговой разряд

Данная технология — одна из первых, которую применили для получения углеродных нанотрубок [30]. Электрической дугой называют электрический разряд в газе в виде яркосветящегося плазменного шнура, образующегося между двумя электродами. Состав электродов влияет на тип получаемых углеродных нанотрубок. Обычно для формирования многослойных углеродных нанотрубок используют электроды из высокочистого углерода. Анод как источник углерода в ходе процесса выгорает и расходуется. Осаждение УНТ происходит на катоде. Для получения однослойных углеродных нанотрубок в аноде высверливают небольшое отверстие, которое затем заполняют смесью частиц металлического катализатора и графитового порошка. Возможность получения однослойных УНТ весьма высокого качества доказана экспериментально на катализаторе из смеси металлов Ni и Y [31].

1.7.2. Лазерная абляция

В лазерной абляции для производства углеродных нанотрубок графитовую мишень, прогретую до высокой температуры, возгоняют под воздействием мощного лазерного излучения в атмосфере инертного газа. Газ собирает унесенный порошок углерода и осаждает его на охлаждаемой поверхности. Полученный порошок состоит из углеродных нанотрубок и луковичеподобных углеродных структур [30]. Формирование многослойных углеродных нанотрубок при лазерной абляции аналогично методу электрической дуги, если исходным мате-

риалом является чистый графит. При добавлении к нему небольшого количества металлического катализатора происходит синтез однослойных УНТ [30].

1.7.3. Химическое осаждение из паровой фазы

В отличие от методов электрического дугового разряда и лазерной абляции химическое осаждение из паровой фазы позволяет проводить осаждение углеродных нанотрубок непосредственно на подложке. Химическое осаждение из паровой или газовой фазы широко распространено при производстве чистых металлов и керамических материалов [27]. Эта технология позволяет наладить коммерческий выпуск углеродных нанотрубок, поскольку легко масштабируется [30]. Путем изменения условий роста (температуры, источника углерода, вида и типа катализатора, соотношения катализатор/углерод и типа подложки) углеродные нанотрубки могут формироваться по-разному — хаотично ориентированными или упорядоченными по направлению роста.

Существует несколько способов химического осаждения из паровой фазы: на горячих и холодных стенках, из паровой фазы при конверсии оксида углерода под высоким давлением и осаждение под действием лазерного излучения. В процессе химического осаждения из паровой фазы на горячих стенках синтез проводится в трубчатой печи при высокой температуре. Подложку, на которую осаждаются углеродные нанотрубки, размещают внутри подогреваемой трубки-реактора, нагревая подложку до необходимой для роста температуры. Источником углерода обычно служат углеводороды, например бензол, ксилол или гексан. Как только углеводород попадает в трубку-реактор, происходит осаждение углерода на подложке. В ходе химического осаждения из паровой фазы на холодных стенках, включая индуцированное плазмой химическое осаждение из паровой фазы, нагревают лишь держатель образца, тогда как остальная часть системы находится при более низкой температуре. При осаждении из паровой фазы с СО-конверсией монооксид углерода подается в систему под высоким давлением и служит источником углерода.

Индукцированное лазером химическое осаждение из паровой фазы может использоваться для получения пленок на основе углеродных нанотрубок. В усиленном лазером химическом осаждении из паровой фазы источник тепловой энергии, подогревающий трубчатую печь, заменяют на локальный источник энергии — лазер. Таким образом, подача тепловой энергии на подложку от источника становится локализованной, следовательно, рост углеродных нанотрубок осуществляется на определенных, облучаемых лазером зонах.

Химическое осаждение целевого субстрата из паровой фазы контролируется двумя механизмами: фотолитическим, вызванным лазерным излучением, и пиролитическим. В зависимости от условий проведения процесса (температуры и геометрии лазерного пучка) химическое осаждение одновременно может протекать по обоим механизмам. При низкой температуре происходит только фотолитическое осаждение, однако при высокой температуре фотолитическое и пиролитическое осаждение часто наблюдаются одновременно [32]. На фотоли-

тические и пиролитические реакции влияют длина волны лазерного излучения, тип и свойства исходных веществ, а также материал, выбранный в качестве подложки [33].

1.7.4. Фотоиндуцированное лазером химическое осаждение из паровой фазы

Фотоиндуцированное лазером химическое осаждение из паровой фазы может проводиться посредством лазерных импульсов с короткой длиной волны излучения. Описанные условия не только позволяют проводить осаждение при низкой температуре, но и устраняют опасности, обусловленные нагреванием подложки, — инициализацию процессов рекристаллизации, реакций окисления или возникновения и развития трещин в носителе. Снижение температуры благоприятствует точной обработке материалов при использовании данной технологии в микроэлектронике [34]. Поскольку в этом методе температура не повышается, он пригоден для работы с термочувствительными подложками. В качестве источников фотонов могут применяться лазеры или лампы, однако повышенная плотность энергии при использовании лазеров приводит к 100-кратному увеличению скорости роста покрытия по сравнению с таковой при облучении лампами [35].

Резонансное поглощение лазерного излучения исходными веществами вызывает разрушение связей в молекулах данных веществ, освобождая их для осаждения на подложку [30]. В фотоиндуцированном лазером химическом осаждении из паровой фазы лазерный пучок направляют параллельно подложке. Лазерное излучение поглощается газовой средой, инициируя реакцию [36]. Это позволяет задавать температуру подложки, не учитывая интенсивность лазерного излучения [30]. Осаждение из паровой фазы может происходить и при перпендикулярном расположении пучка лазерного излучения относительно подложки, однако это одновременно вызывает и пиролитическое осаждение [33].

1.7.5. Пиролитическое, индуцированное лазером химическое осаждение из паровой фазы

В этом процессе генерируемая лазером термическая энергия вызывает диссоциацию молекул реагента и осаждение углеродных нанотрубок на подложке. Лазерный пучок сталкивается с подложкой при перпендикулярном направлении луча, и химическая реакция вызывается локальным подогревом подложки. Если подложка движется в ходе реакции, то шаблоны создаются в течение одного цикла перемещения. В том случае, когда подложка неподвижна, формируются трехмерные структуры [33]. Главным отличием метода является наличие локализованного источника тепловой энергии, лазера. Его применение изменяет кинетические параметры реакции, увеличивает скорость осаждения и дает возможность получать трехмерные объекты [37].

Пиролитическое, индуцированное лазером химическое осаждение из паровой фазы впервые проведено в 1972 г. с использованием излучения ИК-лазера для осаждения углерода на алюминиевую подложку [33]. Обычно для работы с шаблонами субмикронных размеров, необходимыми для создания наноструктур и микроэлектроники, применяют аргоновый или криптоновый лазер [30]. Можно использовать и другие типы лазеров, например CO_2 -лазеры, поскольку большинство газов не поглощают излученный свет в инфракрасной или видимой части спектра.

Пиролитическое, индуцированное лазером химическое осаждение из паровой фазы может проводиться с помощью ИК-лазера путем колебательного возбуждения. При этом происходит возбуждение молекул газа посредством столкновений и колебательных процессов. В результате осуществляется нагрев газовой фазы и подложки, что в свою очередь ведет к формированию пленки. Примерами лазеров и газофазных систем, применяемых в этом методе, являются CO_2 -лазеры и системы BCl_3 , SiH_4 или NH_3 [33].

1.7.6. Рост нанотрубок на определенном участке подложки

Одним из способов осаждения углеродных нанотрубок по точно заданному очертанию или картинке, кроме изложенных выше, является метод, объединяющий литографию и химическое осаждение из паровой фазы. В данном процессе, используемом при производстве шаблонов и трафаретов, маску помещают на подложку аналогично методике литографии [30]. После укладки шаблона нанотрубки формируются методом химического осаждения из паровой фазы. В более раннем исследовании [30] авторы использовали обычную трубчатую печь с ферроценом $[\text{Fe}(\text{C}_5\text{H}_5)_2]$ в качестве инициатора образования нанотрубок и ксилол как источник углерода. Печь постепенно нагревали до 800°C . Раствор ферроцена в ксилоле подавался в реактор при температуре 150°C . Очень важным фактором является выбор исходных веществ, поскольку он определяет длину осаждающихся трубок. Применение комбинации ферроцена и ксилола позволило получить вытянутые по вертикали однослойные УНТ длиной 20–30 мм на шаблоне SiO_2 , при этом на поверхности кремния углеродные нанотрубки не осаждались [30]. Описанный метод пригоден для разработки мезомасштабных систем, сходных с МЭМС [30].

1.8. Наноструктуры с самосборкой

Самосборка молекул — явление, часто наблюдаемое в природе. Например, молекулы коллагена типа I служат примерами молекул, которые ориентируются и самоорганизуются с образованием двумерных и трехмерных структур. Среди технологий, обсужденных в этой главе, самосборка — один из самых многообещающих путей для формирования разнообразных наноструктур [38]. Данный метод основывается на нековалентных межмолекулярных взаимодействиях (электростатических, ван-дер-ваальсовых, водородных связях,

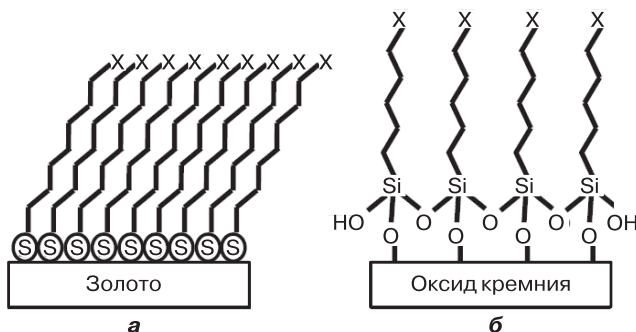


Рис. 1.6. Диаграмма самоорганизованных монослоев: *а* — золото–алкилтиолат ; *б* — оксид кремния–алкилсилан

π – π -взаимодействиях и капиллярных силах для организации групп молекул в регулярные структуры [38].

Самоорганизованные монослои принадлежат к наиболее исследованным структурам с самосборкой. Это поверхности, покрытые тонкой пленкой из одного слоя молекул. Обычно мономолекулярный слой формируется во время адсорбции молекул ПАВ на подложке. К наиболее распространенным и всесторонне исследованным системам самоорганизованных монослоев относятся золото–алкилтиолатные $[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{S}]$ и кремний оксид–алкилсилановые системы (рис. 1.6).

При обычной организации монослоя химическая группа в головной части длинной молекулы с сильным сродством к веществу подложки присоединяется к поверхности; алкильная составляющая этой молекулы имеет приблизительно 10–20 метиленовых групп. Головная группа легко адсорбируется на поверхности подложки, создавая монослой с концевыми группами, выступающими от поверхности подложки [39]. Подобным процессом является самоорганизованный монослой золото–тиол, где тиольная головная группа (S–H) легко адсорбируется на золоте. При работе с тиолами, содержащими концевые метильные группы, исследователи сначала очищали подложку — кремневые пластины в горячей жидкой смеси (соотношение 1 : 4) H_2O_2 (30%) / H_2SO_4 — и затем промывали их дистиллированной/деионизованной водой и абсолютным этанолом. Затем на поверхность наносили слой золота для присоединения тиольных групп. Пластины покрывались золотом путем последовательного осаждения из паровой фазы хрома и золота из нагретой вольфрамовой лодочки в криогенно откачиваемой камере осаждения [39].

Покрытые золотом образцы вынимали, помещали в 1 мМ раствор 1-гексадекантиола в этиловом спирте и выдерживали при комнатной температуре в течение 3 суток. Затем пластины помещали в тиольный раствор. Перед экспериментальным использованием их ополаскивали этанолом и высушивали на воздухе [39]. Оказалось, что тиольные головные части формируют плотный слой тол-

щиной в одну молекулу на поверхности золота, а «хвосты» молекул, направленные от подложки, образуют еще один слой на ее поверхности.

Функциональные особенности самоорганизованных монослоев могут быть изменены путем присоединения различных групп к концевым группам после образования монослоя. Добавление коротких олигомеров с этиленгликолевыми группами к «хвосту» молекулы уменьшает адгезию белков [40]. Группы с метильной группировкой на конце могут увеличивать связывание с плазмой и белками [39], что, в свою очередь, повышает биосовместимость с подложкой. Создание монослоя из фторалкилсилана на поверхности кремния уменьшает рост нервных клеток [41]. Применение 1-октадекантиольных, 1-додекантиольных и 1-гексантиольных групп защищает медь от коррозии [42]. Адсорбция слоя октадецилтрихлорсилана повышает устойчивость к истиранию полисилоконовых полимеров — это методика, позволяющая продлить срок службы и повысить надежность МЭМС и НЭМС [43].

1.9. Заключение

Нанотехнологии активно применяются в биомедицине и электронике, и производство нанопродукции для нужд этих отраслей неуклонно растет. В настоящее время разработано множество подходов к изготовлению наномасштабных устройств для применения в биомедицинской инженерии. Многие из них, например методики на основе литографии, — всего лишь модификации известных технологий с применением более совершенного оборудования. Но есть принципиально новые методы, позволяющие производить шаблоны, маски, структуры и поверхности на другом — наномасштабном уровне. Эти технологии позволяют получать материалы с уникальными химическими, механическими, электрическими и оптическими свойствами, что, в свою очередь, создает предпосылки к созданию новых технологий.

Литература

1. Urban G.A., Prohaska O, Olcaytug F. In: Urban G.A., editor. *BioMEMS*. Dordrecht, The Netherlands: Springer; 2006. 1–14.
2. Henshaw M. First impressions: the early history of lithography—a comparative survey. *Artonview* 2003; (33): 33–38.
3. Mack C.A. Optical lithography modeling. In: Sheats J.R, Smith B.W, editors. *Micro-lithography Science and Technology*. N-Y: Marcel Dekker, Inc.; 2006. 109–170.
4. Xia Y.N., Whitesides G.M. Soft lithography. *Annu. Rev. Mater. Sci.* 1998; 28: 158–184.
5. Madou M.J. *Fundamentals of Microfabrication: The Science of Miniaturization*. Boca Raton, FL: CRC Press LLC; 2002.
6. Atkinson G.A., Ounaies Z. Polymer systems: materials and fabrication. In: Gadel-Hak M., editor. *MEMS Design and Fabrication*. Boca Raton, FL: Taylor Francis; 2006. 9-1–9-39.
7. Ding L., Li Y., Chu H.B., Li X.M., Liu J. Creation of cadmium sulfide nanostructures using AFM dip-pen nanolithography. *J. Phys. Chem. B* 2005; 109: 22337–22340.

8. Jaschke M., Butt H.J. Deposition of organic material by the tip of a scanning force microscope. *Langmuir* 1995; 11: 1061–1064.
9. Lee K.B., Lim J.H., Mirkin C.A. Protein nanostructures formed via direct-write dippen nanolithography. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 5588–5589.
10. Becker E.W., Ehrfeld W., Hagmann P., Maner A., Muenchmeyer D. Fabrication of microstructures with high aspect ratios and great structural heights by synchrotron radiation lithography, galvanofforming, and plastic moulding (LIGA process). *Microelectron. Eng.* 1986; 4: 35–36.
11. Kathuria Y.P. L3: laser, LIGA and lithography in microstructuring. *Indian Inst. Sci. J.* 2004; 84: 77–87.
12. Menz W., Mohr J., Paul O. The LIGA process. In: Menz W., Mohr J., Paul O., editors. *Microsystem. Technology.* Wiley-VCH; 2001. 285–350.
13. Randhawa H. Review of plasma-assisted deposition processes. *Thin Solid Film* 1991; 196: 329–349.
14. Yamada I., Toyoda N. Recent advances in R and D of gas cluster ion beam processes and equipment. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B: Beam Interact Mater. Atoms* 2005; 241: 589–593.
15. Ota Y. Silicon molecular beam epitaxy. *Thin Solid Films* 1983; 106: 1–136.
16. Brodsky M.H. Plasma preparations of amorphous silicon films. *Thin Solid Films* 1978; 50: 57–67.
17. Zeleny J. Electric discharge from points. *Phys. Rev.* 1917; 9: 562–563.
18. Yarin A.L., Koombhongse S., Reneker D.H. Taylor cone and jetting from liquid droplets in electrospinning of nanofibers. *J. Appl. Phys.* 2001; 90: 4836–4846.
19. Reneker D.H., Yarin A.L., Fong H., Koombhongse S. Bending instability of electrically charged liquid jets of polymer solutions in electrospinning. *J. Appl. Phys.* 2000; 87: 4531–4547.
20. Huang Z.M., Zhang Y.Z., Koraki M., Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Composites Sci. Technol.* 2003; 63: 2223–2253.
21. Formhals A. Apparatus for producing artificial filaments from material such as cellulose acetate. US patent 1,975,504. 1934.
22. Ramakrishna S., Fujihara K., Teo W., Lim T., Ma Z. An introduction to electrospinning and nanofibers. Singapore: World Scientific Publishing Co.
23. Buchko C.J., Chen L.C., Shen Y., Martin D.C. Processing and microstructural characterization of porous biocompatible protein polymer thin films. In: 1999. 7397–7407.
24. Fong H., Reneker D.H. Elastomeric nanofibers of styrene-butadiene-styrene triblock copolymer. *J. of Polymer Science. Part B-Polymer Physics* 1999; 37: 3488–3493.
25. Baumgarten P.K. Electrostatic spinning of acrylic microfibers. *J. of colloid and interface science* 1971; 36: 71–79.
26. Deitzel J.M., Kleinmeyer J., Harris D., Tan N.C.B. The effect of processing variables on the morphology of electrospun nanofibers and textiles. *Polymer* 2001; 42: 261–272.
27. Tibbetts G.G. Why are carbon filaments tubular. *J. Crystal Growth* 1984; 66: 632–638.
28. Iijima S. Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 1991; 354: 56–58.
29. Baughman R.H., Zakhidov A.A., de Heer W.A. Carbon nanotubes – the route toward applications. *Science* 2002; 297: 787–792.
30. Wei B., Vajtai R., Ajayan P.M. Synthetic approaches for carbon nanotubes. In: Kumar CSSR, Hormes J., Leuschner C., editors. *Nanofabrication Towards Biomedical Appli-*

- cation Techniques, Tools, Applications and Impact. Weinheim: Wiley-VCH; 2005. 33–55.
31. Journet C., et al. *Nature* 1997; 388: 756–758.
 32. Mogyorosi P., Carlsson J.O. Growth characteristics of photolytic laser-induced chemical vapor-deposition of tungsten from WF₆. *J. Vac. Sci. Technol. A: Vac. Surf. Films* 1992; 10: 3131–3135.
 33. Conde O., Silvestre A.J. Laser-assisted deposition of thin films from photoexcited vapour phases. *App. Phys. A: Mater. Sci. Process* 2004; 79: 489–497.
 34. Jantunen H. Electronics materials, packing and reliability techniques (EMPART). INFOTECH OULU Annual Report; 2005. 16–24.
 35. Gonzales P., et al. Photo-induced chemical vapour deposition of silicon oxide thin films. *Thin Solid films* 1992; 218: 170–181.
 36. Heszler P., Landstrom L., Lindstam M., Carlsson J.O. Light emission from tungsten nanoparticles during laser-assisted chemical vapor deposition of tungsten. *J. Appl. Phys.* 2001; 89: 3967–3970.
 37. Lehmann O., Stuke M. 3-Dimensional laser direct writing of electrically conducting and isolating microstructures. *Mater. Lett.* 1994; 21: 131–136.
 38. Wei B., Vajtai R., Ajayan P.M. Molecular Biomimetics: Building Materials Nature's Way, One Molecule at a time. In: Kumar CSSR, Hormes J., Leuschner C., editors. *Nanofabrication Towards Biomedical Applications Techniques, Tools, Applications and Impact*. Weinheim: Wiley-VCH; 2005, 119–134.
 39. Krishnan A., Cha P., Liu Y.H., Allara D., Vogler E.A. Interfacial energetics of blood plasma and serum adsorption to a hydrophobic self-assembled monolayer surface. *Biomaterials* 2006; 27: 3187–3194.
 40. Senaratne W., Andruzzi L., Ober C.K. Self-assembled monolayers and polymer brushes in biotechnology: current applications and future perspectives. *Biomacromolecules* 2005; 6: 2427–2448.
 41. Patel K.R., et al. Evaluation of polymer and self-assembled monolayer-coated silicone surfaces to reduce neural cell growth. *Biomaterials* 2006; 27: 1519–1526.
 42. Li G., Ma H., Jiao Y., Chen S. An impedance investigation of corrosion protection of copper by self-assembled monolayers of alkanethiols in aqueous solution. *J. Serb. Chem. Soc.* 2004; 69: 791–805.
 43. Baker M.A., Li J. The influence of an OTS self-assembled monolayer on the wear-resistant properties of polysilicon based MEMS. *Surf. Interface Anal.* 2006; 38: 863–867.

МИКРО- И НАНООБРАБОТКА. ПОЛУЧЕНИЕ МАТЕРИАЛОВ ДЛЯ БИМЕДИЦИНСКИХ ЦЕЛЕЙ

Вэй Хэ, Кеннет Е. Гонсалвес, Крейг Р. Хальберштадт

2.1. Введение

В 1965 г. соучредитель компании «Intel» Г. Мур сформулировал закон, гласящий, что инновации в электронной промышленности позволяют приблизительно каждые два года удваивать число транзисторов, размещаемых на микросхеме [1]. Закон Мура, благодаря технологическим успехам, вероятно, будет применим и в будущем.

Помимо традиционной оптической литографии, при производстве наномасштабных изделий значительный интерес вызывает литография, основанная на применении коротковолнового УФ-излучения, рентгеновская электронная литография и литография с использованием пучков ионов. Инновации в литографическом процессе не только оказали большое влияние на совершенствование полупроводниковых приборов, но также позволили достичь баланса в соотношении инструменты/ресурсы при развитии многих областей биомедицинской инженерии.

Литография применяется в биоинженерных микро- или нанотехнологиях при получении биоматериалов. Биоматериалы — класс материалов, предназначенных для использования в биологических системах, для восстановления или замены некоторых биологических тканей и органов [2]. Он включает полимеры, металлы, керамику, композитные и природные материалы. Одним из решающих факторов для успешного внедрения биоматериалов являются свойства поверхности, на которой происходит взаимодействие материала с биологической системой. Например, клеточная адгезия может быть либо усилена за счет иммобилизации адгезивных к клеткам белков: RGD [3], IKVAV [4], фибронектина [5] и ламинина [6], либо ослаблена присоединением полиэтиленгликоля [7].

Помимо химических особенностей, структура поверхности очень важна для проявления требуемого биологического отклика материалов. Хорошо известно, что ориентация клеток и направление их движения зависят от топографии подложки — «контактного управления». Возможности контроля расположения клеток и клеточного связывания сулят большие перемены в развитии биоинженерии тканей. И в этом ключе преимущество литографических методов состоит в осуществлении точной поверхностной инженерии биоматериалов вплоть до нанометровых размеров [8].

В данной главе будут описаны примеры использования ионно-пучковой литографии и ионной имплантации для увеличения эффективности «мягких» полимерных материалов и «жестких» металлизированных биоматериалов. Здесь также кратко будут приведены сведения о замене некоторых тканей, имплантатах, контактирующих с кровью, и других изделиях. Включен и небольшой обзор современных разработок биосовместимых фоторезистов, объединяющих обычную фотолитографию с биомолекулярными технологиями.

2.2. Процессы ионной имплантации

Ионная имплантация — метод бомбардировки поверхности материала ионами с энергией 10–20 кэВ с минимальной экспозицией [9]. При этом высокоэнергетические ионы ударяются о кремневую или иную мишень, что приводит к их проникновению вглубь мишени. Таким образом, происходит контролируемое распределение реагента в мишени. Благодаря высокой начальной энергии, ионы реагента оказываются в приповерхностном слое материала, теряя энергию за счет упругих столкновений с ядрами мишени и неупругих соударений с электронами [10]. Поскольку ионы реагента не проникают в мишень слишком глубоко (обычно максимум на микрометр), изменение свойств мишени ограничивается лишь приповерхностной областью, и модификация затрагивает только поверхность подложки.

Главным преимуществом ионной имплантации является возможность селективного изменения поверхности без воздействия на свойства материала в объеме, так как процесс протекает при низкой температуре подложки. Данный метод служит для создания поверхностных слоев определенного состава, причем исключено возникновение отслаиваний, обычно возникающее при нанесении покрытий. Эта технология, легко контролируемая и воспроизводимая, позволяет создавать высокую концентрацию легирующего компонента в заданном слое. Ионная имплантация является чрезвычайно гибким процессом, который позволяет выбирать ионы, соответствующие характеристикам видоизменяемого материала. При ее применении в комбинации с экранными сетчатыми масками можно переносить рисунок с маски на поверхность за счет удаления атомов из немаскированной зоны (рис. 2.1) [11]. Важно также, что нанесение рисунка и химическую модификацию поверхности можно совместить по времени. Однако ионной имплантацией с использованием особых шаблонов трудно одновременно изменять химические свойства поверхности и внутреннего объема подложки.

2.3. Микро- и нанообработка «мягких» полимерных биоматериалов

Полимеры находят широкое применение в биомедицине. Они служат материалом для изготовления контактных линз, глазных хрусталиков, стоматологических имплантатов, трансплантатов кровеносных сосудов, искусственных сердечных клапанов, грудных имплантатов, биологически разлагаемых шовных материалов, кардиостимуляторов, искусственной кожи и соединительных эле-

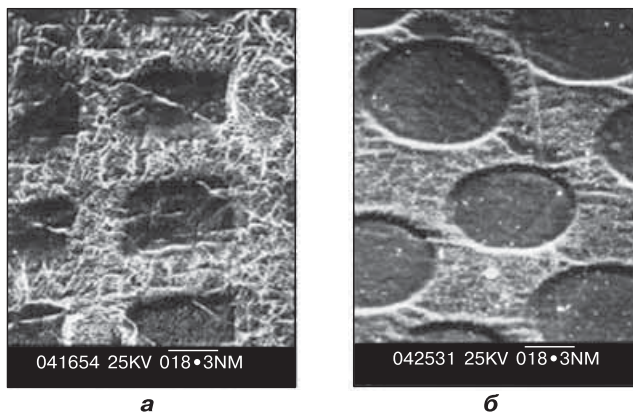


Рис. 2.1. Морфологические характеристики силиконовой резины, подвергнутой текстурообразованию с помощью ионного пучка (получено с помощью электронной сканирующей микроскопии). Использована сформированная электронами экранирующая сетчатая маска с квадратными (*а*) или круглыми (*б*) шаблонами. Энергия примененного пучка ионов Ag составила 1 кэВ. (Перепечатывается из работы [11], с разрешения Elsevier.)

ментов суставов. В зависимости от применения полимеры должны быть устойчивы к коррозии и износу, должны способствовать адгезии клеток и их дифференцировке, обладать противомикробными и антитромбообразующими свойствами и т. д.

2.3.1. Применение полимеров в ортопедии

Полимер поли(метилметакрилат), ПММА, используют как цементирующее вещество для костей, в первую очередь для закрепления стержней соединительных протезов в полости кости [12]. Поскольку данный полимер работает в качестве соединительного элемента между протезом и костной тканью, необходимо, чтобы он был биологически совместим с остеобластами, синтезирующими костную ткань, тем самым ускоряя формирование матрицы и минерализацию, которые будут поддерживать соединение имплантата с костью и окружающими тканями. Хи с соавторами [13, 14] исследовали возможность применения маскированного пучка ионов для регенерации костной ткани. По сравнению с обычной шаблонной литографией маскированная ионно-лучевая литография позволяет создавать картинки без использования токсичных химических веществ, способных денатурировать белки и пептиды. В приведенных выше исследованиях на пленки из ПММА воздействовали ионами Ca^+ (85 кэВ, $1 \cdot 10^{14}$ ионов/ см^2), ионами P^+ (85 кэВ, $1 \cdot 10^{15}$ и $1 \cdot 10^{16}$ ионов/ см^2) и ионами Ag^+ (115 кэВ, $1 \cdot 10^{15}$ ионов/ см^2).

С помощью атомно-силовой микроскопии была изучена структура поверхности пленок ПММА после облучения. Как показано на рис. 2.2, на поверхности пленок наблюдаются отверстия наномасштабной глубины и микромасштабной ширины. Результаты структурного анализа образцов, облученных ионами Ca^+ , показали, что расстояние между двумя левыми кромками изолированного островка составляет около 11 мкм, а высота каждого островка приблизительно равна 87 нм. В образце, обработанном меньшим количеством ионов P^+ , аналогичное расстояние составило 9,8 мкм, а глубина — 129 нм. При увеличении концентрации ионов P^+ расстояние увеличилось до 11,3 мкм при глубине 95 нм, т. е. боковые стенки подложки истончаются. Этот эффект объясняется отклонением ионов от намеченной траектории и пологими углами отскока от поверхности. Так происходит разрушение боковых сторон стенок.

Для выяснения влияния обработки ионным пучком на адгезию клеток провели культивирование остеобластов свода черепа крысы на необлученной, облученной P^+ -ионами и облученной Ag^+ -ионами поверхностях ПММА [13].

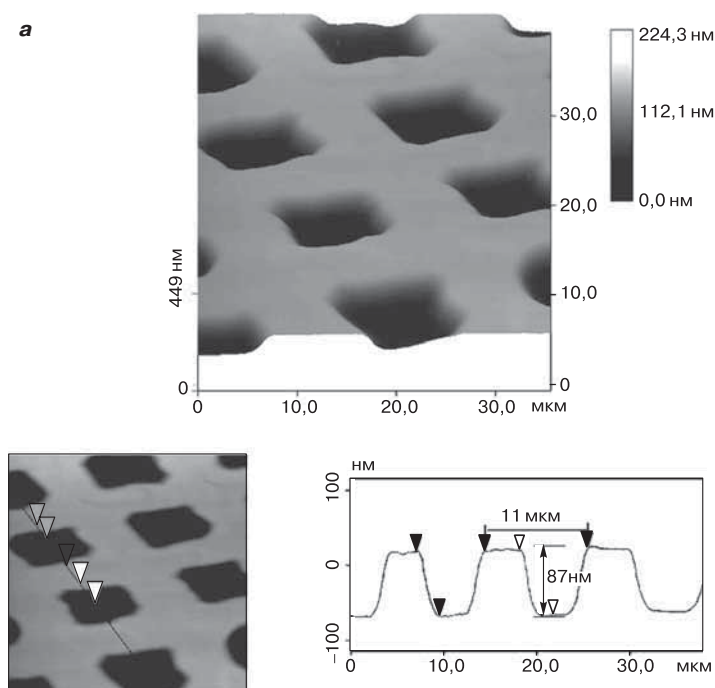


Рис. 2.2. Полученные с помощью атомно-силовой микроскопии изображения поверхности пленки ПММА с типичными геометрическими характеристиками, подвергнутой различным воздействиям: *a* — 85 кэВ, $1 \cdot 10^{14}$ ионов/ см^2 Ca^+ ; *б* — 85 кэВ, $1 \cdot 10^{15}$ ионов/ см^2 P^+ ; *в* — 85 кэВ, $1 \cdot 10^{16}$ ионов/ см^2 P^+ ; *г* — 115 кэВ, $1 \cdot 10^{15}$ ионов/ см^2 Ag^+ (*a–в* воспроизводятся из работы [14] с разрешения Elsevier; *г* взята из работы [13] с разрешения Springer Science и Business Media)

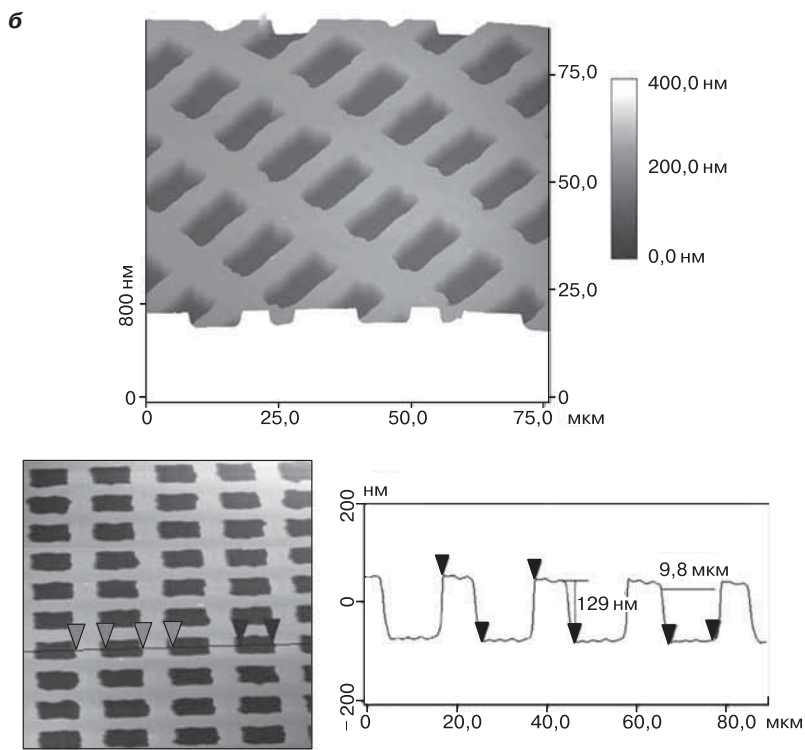


Рис. 2.2. (Продолжение)

На обоих образцах ПММА, содержащих ионы P^+ и Ag^+ , обнаружено более интенсивное прикрепление клеток, чем на необлученной поверхности. Это подтверждает способность ионного воздействия усиливать адгезию остеобластов на полимерной подложке, вероятно, путем увеличения шероховатости поверхности. Полученные результаты согласуются с литературными данными по наличию корреляции между увеличившейся шероховатостью поверхности и усиливающейся адгезией остеобластов [15]. Кроме того, несмотря на похожую топографию поверхности и наличие шероховатостей на обоих обработанных образцах, клетки более активно прикреплялись к подложкам, облученным ионами P^+ , чем к облученным ионами Ag^+ . Глубину профиля в обработанной ионами P^+ пленке ПММА исследовали динамической масс-спектрометрией вторичных ионов. Большинство ионов P^+ было обнаружено в области, лежащей приблизительно на расстоянии 100 нм от поверхности, максимальная концентрация составила $1,1 \cdot 10^{20}$ ионов/ $см^3$, глубина проникновения — 121 нм.

Отметим, что ионная имплантация как технология микроизготовления обладает следующими преимуществами: во-первых, она представляет собой одностадийный процесс, поэтому шаблон может быть получен в контролируемом

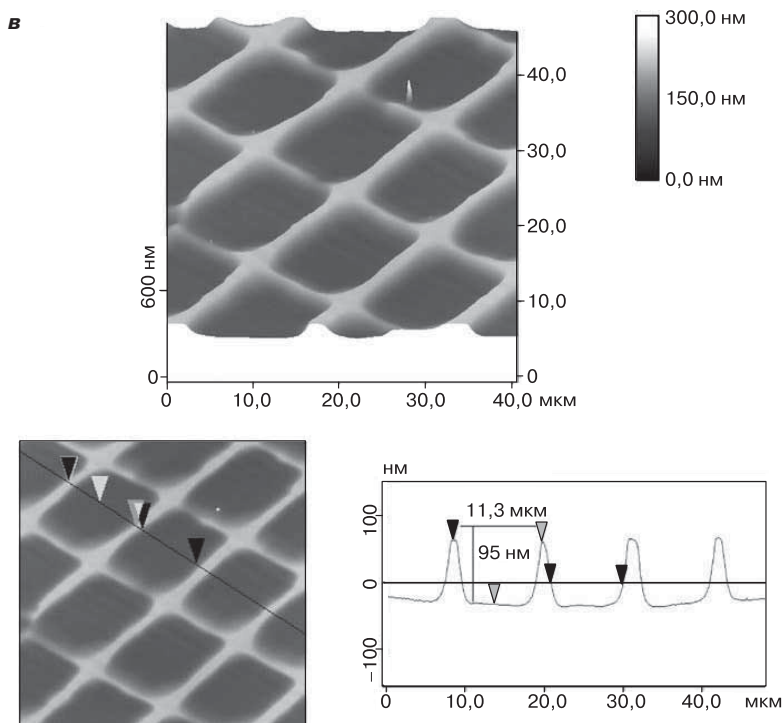


Рис. 2.2. (Продолжение)

режиме микромашиной обработки с применением специальной маски; во-вторых, путем выбора ионов, например Са или Р, можно варьировать химические характеристики поверхности; в-третьих, свойства получаемых наноструктур можно контролировать за счет различной адгезии клеток к разным шаблонам.

Другой широко используемый в ортопедии полимер — сверхвысокомолекулярный полиэтилен, СВМПЭ. В основном он применяется для замены суставов благодаря особой пластичности, возможности демпфирования ударных нагрузок и биосовместимости [16, 17]. Однако следует учитывать, что образующиеся за счет износа частицы этого материала на поверхности сустава ограничивают длительное нахождение СВМПЭ в организме [18]. Ионная имплантация — довольно эффективный способ увеличения износостойкости СВМПЭ. Например, в ряде работ описана обработка СВМПЭ посредством введения в них ионов азота [19, 20], после которой устойчивость к износу СВМПЭ увеличилась в 68 раз. Исследователи объясняют это явление поперечной шивкой в СВМПЭ, уменьшающей скольжение между макромолекулами. Также у полимера увеличивается устойчивость к нагрузкам, возможно, из-за наличия более твердого и жесткого поверхностного модифицированного слоя, полученного обработкой ионами азота.

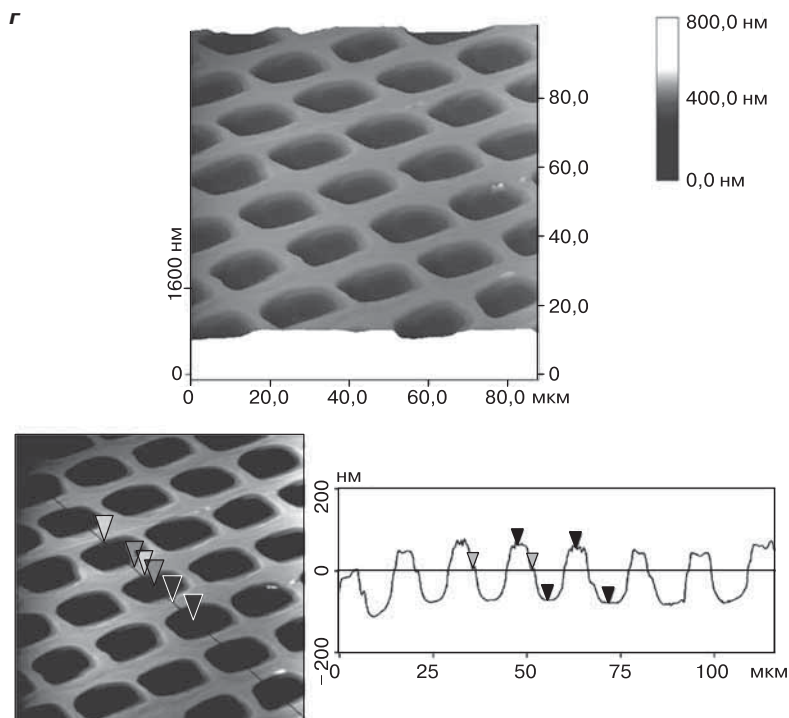


Рис. 2.2. (Окончание)

Валенса с сотрудниками [21] изучили влияние других ионов на износостойкость СВМПЭ. Полимер облучали пучками ионов H^+ , He^+ , Ag^+ и Xe^+ с энергией 300 кэВ. Интенсивность потока составляла от 10^{14} до 10^{17} ионов/ см^2 . После проведения традиционного испытания на микроабразивный износ с помощью штифто-дискового тестера авторы установили, что износостойкость для обработанных поверхностей увеличивается с возрастанием дозы облучения: износ образца СВМПЭ, обработанного потоком с интенсивностью $3 \cdot 10^{15}$ ионов Xe^+ / см^2 , снижался примерно на 76% после 72 ч испытаний.

2.3.2. Устройства, контактирующие с кровью

Синтетические полимеры также используются в устройствах и имплантатах, соприкасающихся с кровью. В клинической практике часто применяют сосуды для искусственной крови, изготовленные из политетрафторэтилена (тефлона) или поли(этилентерефталата), известного под названием «Дакрон». Главными ограничениями для изделий, контактирующих с кровью, являются возникнове-

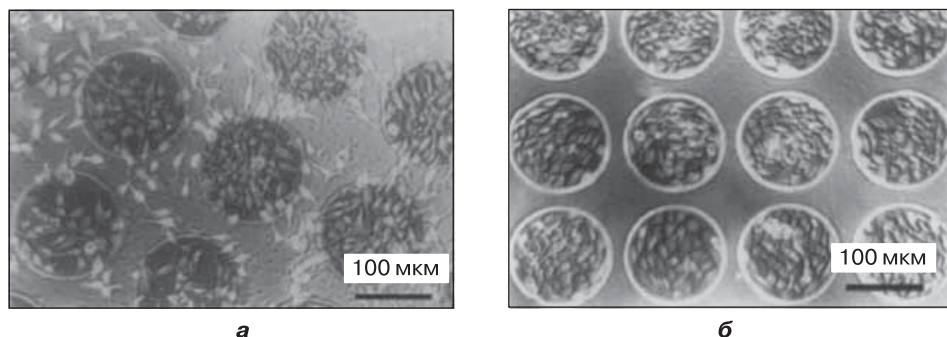


Рис. 2.3. Морфология присоединения эндотелиальных клеток к обработанному ионами Ne^+ : полистиролу (а) и сегментированному полиуретану (б) после инкубационного периода (3 дня). Плотность энергии составляла $1 \cdot 10^{15}$ ионов/см². (Перепечатывается из [30] с разрешения Elsevier.)

ние инфекций, образование тромбов и сужение сосудов. Для улучшения антитромбообразующей способности и гемосовместимости полимерных материалов успешно применяют ионную имплантацию [22–30]. Обработкой поверхности силиконовой резины ионами водорода, азота, аргона и неона с целью повышения ее гидрофильности и долговременного препятствования отложению биоосадков была понижена тромбобиогенность катетеров [25, 30]. Другим способом улучшения биосовместимости трансплантатов сосудов стала разработка поверхности, поддерживающей эндотелизацию, что является определяющим фактором в трансплантации, поскольку эндотелиальные клетки отвечают за формирование нетромбогенного взаимодействия между кровью и тканью. В начале 1990-х гг. было показано [22], что адгезия и разрастание эндотелиальных клеток могут быть значительно усилены, если поверхность сегментированного полиуретана (СПУ) модифицировать ионами неона или натрия (рис. 2.3). В организме ионно-имплантированные трубки из СПУ оказались приемлемыми трансплантатами при пересадке ткани в раскрытом состоянии сосуда при замене бедренной артерии [24]. В работе [31] описано получение небольших гибридных трансплантатов сосудов из тефлона в три стадии: бомбардировки ионами Ne внутренних стенок небольших трубок, покрытие имплантированной поверхности белком плазмы крови и бомбардировки ионами Ne через белковое покрытие внутренних стенок. Созданный имплантат вживили в сонную артерию собаки, после чего за ее здоровьем следили в течение 180 дней.

Таким образом, показано, что обработка ионами кислорода [28], серебра [26, 27] и фтора [29] влияет на адгезию и рост эндотелиальных клеток на полимерных подложках.

2.3.3. Другие применения

Недавно ионную имплантацию использовали при обработке полимеров, предназначенных для восстановления нервной системы. С помощью резиновых трубок из полидиметилсилоксана (ПДМС) в клинической практике обычно восстанавливают периферические нервы. Для лучшей регенерации нервной ткани поверхность ПДМС-резины модифицировали анионами углерода с помощью ионной обработки [32] для придания ей гидрофильных свойств. Эти трубки оказались подходящими для тубуляции седалищного нерва крыс, регенерированного для передачи нервного возбуждения. Окияма с сотрудниками [33] исследовали разрастание аксона нервной клетки на фторированной полиимидной пленке, микрошаблонно обработанной ионным пучком. Возможность контроля взаимодействия нерва с поверхностью имплантата актуальна для исследования работы нейронов и для конструирования современных биоэлектронных устройств, например биосенсоров и нейронных компьютеров. Для подтверждения влияния топографии подложки и ее химических свойств на поведение нейронов были созданы микрошаблоны шириной 120 или 160 мкм (рис. 2.4) на поверхности полиимида с применением маски для ионного пучка из ионов Ne^+ , Ne^+ или K^+ при интенсивности потока $1 \cdot 10^{14}$ ионов/см². Нейроны в основном присоединялись к облученным областям. Заметим, что, хотя максимальное присоединение нейронов наблюдалось на поверхности, обработанной K^+ , и наименьшее — на обработанной Ne^+ , аксоны в большей степени разрастались на поверхности, обработанной Ne^+ , а на подложке с введенными ионами K^+ аксоны имели самые короткие отростки. Приведенные результаты свидетельствуют, что ионную имплантацию можно использовать при культивировании клеток по шаблону на подложке.

Другим примером использования ионной имплантации в биомедицине является разработка заменителя из дюралюминия для восстановительной черепной хирургии. Идеальный синтетический заменитель части черепа требует наличия двухсторонней поверхности, внешняя сторона которой сцеплена с клетками эпителия, а внутренняя не взаимодействует с головным мозгом. Обычно в черепной хирургии применяется неадсорбирующий неадгезивный политетрафторэтилен (ПТФЭ). Введение ионов Ne^+ с одной стороны пленки ПТФЭ приводит к хорошему костному присоединению и тканевому врастанию без изменения свойств неадгезивной церебральной стороны [30]. В другом исследовании ПТФЭ модифицировали ионами Ag^+ . С помощью полученного материала был устранен дефект в черепе без послеоперационной утечки спинномозговой жидкости [34].

Введение ионов в полимеры также используется для активации присоединения клеток к главному хрусталику из ПММА [35], для модификации полиэтилена, применяемого в качестве заменителя кожного покрова, — обработка ионами F^+ [36, 37]; ионы Ag^+ добавляют к полиуретанам с целью уменьшения воспалительной реакции [38]. Однако нужно отметить высокую сложность производства данных материалов, что, естественно, повышает стоимость лечения

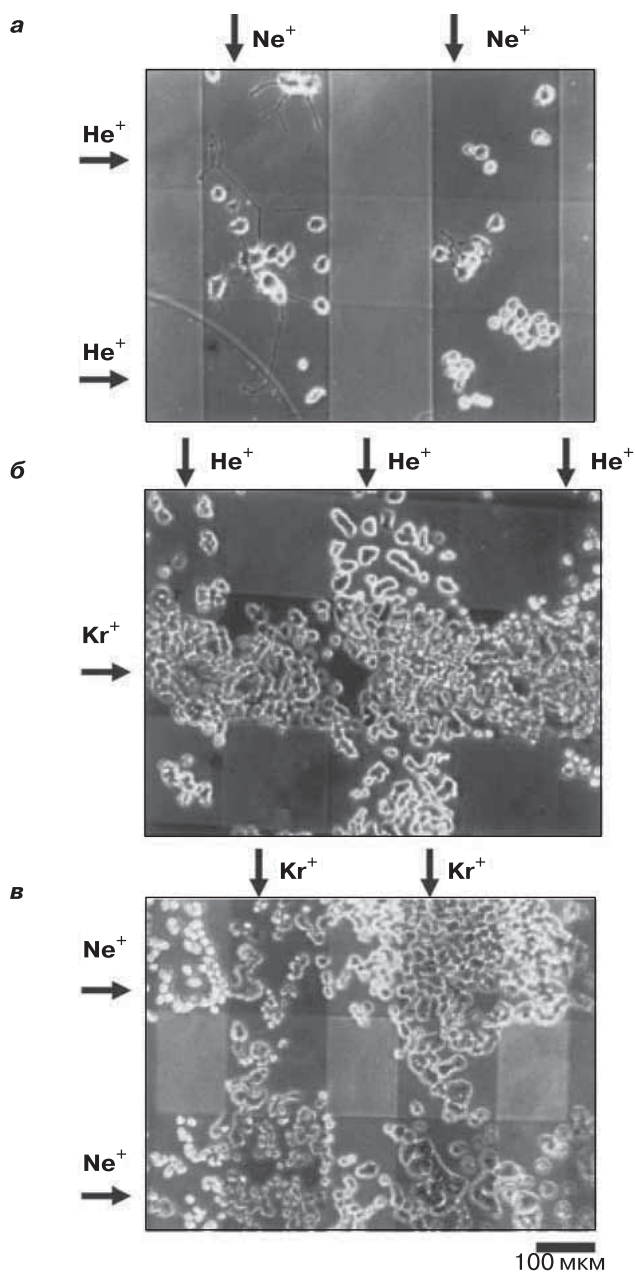


Рис. 2.4. Полученные с помощью фазово-контрастной микроскопии изображения клеток PC12, культивируемых на фторированных полиимидных пленках. Облучение осуществлялось различными ионами в течение 72 ч: а — ионами He^+ + Ne^+ ; б — ионами He^+ + Kr^+ ; в — ионами Ne^+ + Kr^+ . (Перепечатывается из работы [33] с разрешения Elsevier.)

и снижает его доступность. К тому же для биомедицины требуются полимеры с противомикробными свойствами. Проведенные исследования подтвердили, что ионная имплантация препятствует адгезии бактерий на полимерах. В ряде работ изучалось введение ионов серебра в различные материалы [39, 40]. Болдурьева с соавторами показали, что имплантация отрицательных ионов серебра на ПММА не только приводит к образованию наночастиц серебра с диаметром менее 10 нм, но и создает поверхностно открытый градиент из подобных наноструктур [40]. В нескольких исследованиях было обнаружено, что антибактериальную активность полимерных материалов повышают и другие ионы, например ионы аргона [41] и ацетилена [42].

2.4. Микро- и наноизготовление металлических биоматериалов

Металлические имплантаты широко применяются в ортопедии, стоматологии и сердечно-сосудистой хирургии и обеспечивают полную замену тазобедренного и коленного суставов, коленных чашечек и стентов. В ортопедии использование металлов обусловлено их способностью выдерживать значительные механические и усталостные нагрузки, а также пластически деформироваться перед разрушением. В настоящее время наиболее употребляемые металлические имплантаты изготавливают из нержавеющей стали, сплавов кобальт–хром–молибден, химически чистого титана и титановых сплавов [12]. В этом разделе приведен обзор исследований, включающих ионную имплантацию металлов.

2.4.1. Применение металлов в ортопедии

Как было упомянуто выше, металлы — приемлемый ортопедический материал. Их использование в этой области трансплантологии обусловлено биосовместимостью, хорошими механическими свойствами и устойчивостью к износу и истиранию. Однако есть некоторые исключения: например, титан недостаточно износостойчив. Среди различных методов, повышающих эффективность металлических ортопедических изделий, ионная имплантация — наиболее удобный способ обработки. С ее помощью поверхность металла можно сделать тверже и снизить коэффициент трения, что в конечном итоге повысит износостойкость [43]. В работе [44] показано, что вкрапления ионов азота в сплав Ti6Al4V значительно улучшают сопротивление данного соединения против инициированной истиранием коррозии — как в солевом, так и в сывороточном растворе — при всех уровнях допустимых физических нагрузок. В других экспериментах наблюдали устойчивость к истиранию титановых сплавов, обработанных ионами азота. Оно повышалось на порядок [45, 46]. Для улучшения устойчивости против истирания–коррозии и определения характеристик коррозионной стойкости металлов кроме азота были использованы и другие элементы. Так в работе [47] опи-

сан модифицированный кислородом никель-титановый сплав при трех уровнях имплантации ионами кислорода: $5 \cdot 10^{16}$; $1 \cdot 10^{17}$ и $3 \cdot 10^{17}$ ионов/см² соответственно. Изменение топографических свойств поверхности этого сплава вызвало внедрение ионов кислорода. Первоначально присутствовавшие на поверхности сплава Ni–Ti канавки сглаживались под воздействием низкого и среднего уровней имплантации ионами кислорода; образцы со средним уровнем, $1 \cdot 10^{17}$ ионов/см², показали наилучшую коррозионную устойчивость. Впрочем, нанопоры, появившиеся на поверхности модифицированного материала при высоком уровне имплантации кислорода, являлись источниками точечной коррозии и, соответственно, ухудшали устойчивость сплава. В работе [48] исследовали влияние модификации поверхности титана имплантацией ионами кальция на коррозионную устойчивость. Обнаружено, что такая имплантация при интенсивности $1 \cdot 10^{17}$ ионов/см² повышает коррозионную устойчивость, однако при более продолжительной экспозиции восприимчивость титана к точечной коррозии увеличивается в условиях анодной поляризации. В более позднем исследовании [49] проведена обработка поверхности титана ионами фосфора с интенсивностью $1 \cdot 10^{17}$ ионов/см². Этот процесс привел к аморфности поверхностного слоя и к образованию соединения TiP. Обработка увеличила коррозионную устойчивость материала как после короткой, так и после продолжительной экспозиции, что предполагает целесообразность внедрения ионов фосфора на поверхность титана.

Значительные усилия были затрачены на выявление интеграции металлических имплантатов в окружающую костную ткань. Известно, что керамические материалы хорошо соединяются с костной тканью из-за благоприятного воздействия составляющих компонентов CaO и P₂O₅, способствующих образованию гидроксиапатита (ГА). Гидроксиапатит имеет кристаллографические характеристики, сходные с таковыми у природного апатита, присутствующего в кости. Поэтому имплантация керамических материалов часто применяется для получения покрытий, хорошо срастающихся с костью. Металлы, например титан, не поддерживают осаждение ГА. Для придания поверхности металла свойств, благоприятных для активного вовлечения в процесс объединения с костью, было исследовано влияние обработки ионами кальция и фосфора на химические свойства поверхности и ее биоактивность *in vitro* и *in vivo*. В работе [50] в условиях *in vivo* показано, что имплантация ионов Ca⁺ на поверхности Ti усиливает интеграцию с костью и способствует формированию новой ткани, вероятно, из-за более быстрого осаждения фосфата кальция на имплантированной поверхности. В работе [51] исследована реакционная способность Ti за счет внедрения ионов Ca и P при различных уровнях энергии имплантации. На всех опытных поверхностях обнаружены иглоподобные кристаллиты ГА, отсутствующие в контроле. Полученные данные подтверждают, что обработка ионами Ca и P в процессе биоминерализации переводит поверхность Ti в активное состояние. Культивирование остеобластов *in vitro* на образцах Ti с введенными ионами Ca показало, что взаимодействие клеток изменилось и зависело от интенсивности ионной имплантации [52–54]. Большие концентрации

ионов Ca, $1 \cdot 10^{17}$ ионов/см², значительно увеличили распространение клеток, формирование фокальных адгезионных кровяных бляшек и вызвали появление интегринов. Несколько групп исследователей [55–57] также изучали влияние комбинированной ионной имплантации Ca и P на свойства Ti и его сплавов. Было обнаружено, что энергия связей Ca 2*p*-уровней, P 2*p*-уровней и O 1*s*-уровней для модифицированного поверхностного слоя толщиной около 100 нм является аналогичным стандарту гидроксиапатита. Путем выращивания на поверхностях, обработанных таким образом, клеток костного мозга было подтверждено улучшение их биосовместимости с подложкой.

В титан имплантировали также натрий [58–60]. Введение вызвало модификацию химических свойств и структурных характеристик поверхности титана, было отмечено появление шероховатости. В поверхностный слой внедряли титанат натрия; структура подложки зависела от параметров проведенной ионной обработки. Рост остеобластов на поверхностях, имплантированных ионами Na, значительно улучшался по сравнению с необработанным образцом, что было доказано высокой активностью щелочной фосфатазы и лучшим распространением клеток [60].

Для модификации поверхности Ti также используют и аминогруппы [61, 62]. Из-за образования нитрида TiN во время имплантации и возможности создания слоя толщиной до 61 нм у титана могут быть повышены устойчивость к истиранию, коррозионная устойчивость и сопротивление усталости. Кроме того, на образцах Ti, имплантированного ионами NH₂⁺, наблюдаются повышенные адгезии и распространение искусственно выращенных остеобластов, чем на образцах гидроксиапатита.

2.4.2. Стоматологические имплантаты

В стоматологии используют металлические имплантаты для формирования корней зубов, эндодонтических стабилизаторов и резцов. Подобно ортопедии здесь также желательно получить быстрое и прочное соединение имплантата с костью. Для повышения эффективности стоматологических имплантатов их поверхность модифицируют примесями ионов. В работе [63] изучали интеграцию стоматологических имплантатов, обычно применяемых в клинической практике, с костью; материал дополнительно подвергали поверхностной обработке ионной имплантацией. Были исследованы коммерчески доступные стоматологические имплантаты, полученные из чистого титана и сплава Ti6Al4V, обработанные и необработанные оксидом углерода (CO⁺); азота (N⁺); углерода (C⁺); неона (Ne⁺). Оказалось, что модификация поверхности стоматологических имплантатов с целью улучшения костной интеграции является не только количественной, т. е. повышается число контактов между костью и имплантатом, но и качественной: происходит сильное и более стабильное связывание. Показана статистическая разница между обработанными имплантатами и контрольными образцами, особенно при внедрении ионов C⁺ в Ti и ионов CO⁺ в сплав

Ti6Al4V, когда наличие ковалентной связи между атомами Ti–O–C было подтверждено рентгеновской фотоэлектронной спектроскопией. В работе [64] пытались последовательно улучшить поверхностную твердость нитинола (никель-титановый сплав), применяемого в производстве эндодонтического инструмента для обработки каналов в корне зуба, имплантацией бора. Внедрение ионов азота в концентрации $2 \cdot 10^{17}$ ионов/см² в нитинол для изготовления эндодонтического инструмента позволяет сделать его более устойчивым к истиранию и, следовательно, пригодным для формирования большего количества корневых каналов [65]. Было также показано, что обработка ионами азота поверхности ортодонтических зондов уменьшает силы трения, возникающие во время прохождения канала, и таким образом улучшает эффективность обработки зуба [66].

2.4.3. Устройства, контактирующие с кровью

В некоторых устройствах металлы соприкасаются с кровью. Например, коронарные стенты создают из нержавеющей стали марки 316L. Есть предположение, что обработка стентов ионами углерода может снизить вероятность повторного сужения просвета в каком-либо органе за счет воспалительной реакции после его оперативного расширения и замены сосудов [67]. В недавней работе [68] было показано, что легирование фосфором — эффективный путь улучшения совместимости с кровью пленки оксида титана; авторы связали это с изменением электронной структуры и свойств поверхности. Но, с другой стороны, ионная имплантация может способствовать тромбообразованию. В работе [69] приведены данные о модернизации съемных платиновых колец, предназначенных для внутрисосудистой обработки широкогорлой аневризмы, применением комбинации белкового покрытия с обработкой ионами Ne⁺ в концентрации $1 \cdot 10^{15}$ ионов/см². Была обнаружена усиленная реакция тромбоцитов с поверхностью кольца и сделан вывод об эффективности такого приема для улучшения адгезии клеток и их разрастания. Данная технология может оказаться полезной при ранней диагностике повреждений в шейках эмболизированных широкогорлых церебральных аневризм.

2.4.4. Другие применения

Как уже упоминалось в предыдущих разделах, с помощью ионной имплантации металлическим поверхностям можно придавать антибактериальные свойства. Например, титан, имплантированный ионами F⁺ *in vitro*, интенсивнее препятствует росту бактерий видов *Porphyromonas gingivalis* и *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, чем контрольные образцы из полированного титана [70]. Другие ионы, например серебро и медь, также улучшают антибактериальные свойства подложек. В работе [71] обнаружено, что внедрение ионов меди в нержавеющую сталь марки AISI 420 в концентрации $5 \cdot 10^{17}$ ионов/см² придает ей устойчивость к микроорганизмам *Escherichia coli* и *Staphylococcus aureus*.

2.5. Новые биосовместимые фоторезисты

Путем традиционной фотолитографии трудно создать клеточный и биомолекулярный рисунки, поскольку для появления изображения на поверхности материала и растворения фоторезиста обычно пользуются органическими растворителями, что может привести к денатурации биомолекул. Следовательно, для создания биосовместимых поверхностей методом фотолитографии необходимо разрабатывать новые классы фоторезистов. В настоящее время существуют два типа биосовместимых фоторезистных материалов: первый — на базе поли-*трет*-бутилацетата [72–74], а второй — на основе поли-3-*трет*-бутоксикарбонил-N-винил-2-пирролидона [75, 76].

Для обоих фоторезистов используют механизм химического усиления, иными словами, полученная фотооблучением кислота снимает защиту с *трет*-бутильных эфирных групп, что приводит к изменению растворимости и гидрофильности. Было показано, что с помощью поли-*трет*-бутилакрилатного фоторезиста можно получать литографический рисунок из биомолекул непосредственно во время приготовления резиста, поскольку биологические соединения устойчивы к применяемым тепловым нагрузкам и концентрации проявителя. Вместо распространенного проявителя с содержанием щелочи 0,27 н. для проявления изображения оказалось вполне достаточно раствора с концентрацией 0,0026 н. или даже меньше. При экспозиции в процессе литографического формирования рисунка из биомолекул с применением поли-3-*трет*-бутоксикарбонил-N-винил-2-пирролидона под действием УФ-света происходит фотолиз *трет*-бутоксикарбонильных групп и их превращение в карбоксильные группы, что влечет за собой изменение поверхностных свойств материала — от гидрофобных к гидрофильным. При выращивании фибробластов на данных поверхностях клетки располагались вдоль гидрофильных канавок, полученных с применением шаблонов. Предпочтительная адгезия клеток по очертаниям рисунка, вероятно, происходит из-за перемещения белков сыворотки из культуральной среды в более гидрофильные и облученные УФ-светом области.

Образовавшиеся карбоксильные группы также обеспечивают возможность связывания пептидов или белков, которые затем будут управлять взаимодействиями клеток с подложкой. Помимо прочего, новые технологии фотолитографии позволяют регулировать глубину и расположение топографических особенностей поверхности в нанометровом диапазоне. На рис. 2.5 (см. цв. вклейку) изображена полученная по шаблону структура, представляющая собой наноканавки глубиной около 200 нм, способствующие ориентированному росту клеток. Возможность создания по шаблонам различных рисунков из адгезивных и неадгезивных пептидов позволит впоследствии формировать сложные поверхности для выращивания тканей и органов.

2.6. Трехмерная литография

Основное внимание в области тканевой инженерии уделяется формированию трехмерных клеточных каркасов, имитирующих внеклеточный матрикс (ВКМ), и способных ориентировать рост клеток млекопитающих в трех направ-

лениях. ВКМ включает множество топографических характеристик: нановолокна, поры, полосы и мостики [77]. В настоящее время технологические приемы, с помощью которых можно производить наношаблоны на поверхностях, подходящих для биомедицинских целей, можно пересчитать по пальцам. В идеальном случае такие методики должны иметь наномасштабное разрешение, обеспечивать высокий выход целевого продукта, быть хорошо воспроизводимыми и недорогими, контролировать получение 3D-наноструктур и предоставлять возможность нанесения рисунка на большие площади [78]. Нанопечатная литография (НЛ) вполне отвечает перечисленным требованиям. НЛ может применяться для создания изделий с разрешением ниже 10 нм как на плоских, так и на объемных поверхностях, и этим методом получают наноустройства в различных областях: от электроники до биологии [79, 80]. В работе [78] описано использование НЛ для формирования трехмерных клеточных каркасов, построенных из многослойных наноструктур, на биологически совместимых подложках. Взяв за образец 3D-наноструктуру природных коллагенов шириной 400 нм и поперечным размером 70 нм, технологи разработали процесс многократной НЛ для синтеза аналогичных 3D-наноструктур на полистироле с тканевой культурой. На клеточных каркасах выращивали клетки для гладкой мышцы, выделенные из бычьей легочной артерии.

Другим методом для создания 3D-наноструктур является УФ-наногравировка. УФ-гравировка имеет ряд преимуществ; в частности она протекает при комнатной температуре и низком давлении. Данное условие представляет интерес для изготовления шаблонов или картинок из неустойчивых и требующих бережного обращения соединений, например капсулированного в полимере белка или водосодержащих гелей [81]. Группа авторов использовала УФ-гравировку для создания 3D-структур на субмикрометровом уровне с большим соотношением глубина/ширина на биосовместимых полимерах. Главное — точное воспроизведение картинок, определяющее пригодность процесса для внедрения белков в полученные по шаблонам структуры [81, 82].

2.7. Заключение

Модифицированные литографические процессы представляют собой мощные и гибкие инструменты для исследований в области биомедицинской инженерии. В недавнем обзоре [83] проанализировано влияние микро/наномасштабной инженерии, обеспеченное широким распространением и доступностью литографических методов, на тканевую инженерию и другие биологические приложения нанотехнологии. В большинстве проведенных исследований показано, что поверхностные структуры даже в нижнем диапазоне нанометровой шкалы могут регулировать клеточное поведение как *in vitro*, так и *in vivo*. Для исследований в области биомедицины создание биосовместимых структур с полным контролем свойств и состава очень привлекательно. Из-за уникальной возможности одновременного изменения химических свойств поверхности и микро/наномасштабной топографии ионная имплантация и современная

литография становятся передовыми методами при изучении взаимодействий биоматериал–клетки. Можно предположить, что микро/наномасштабные методы будут играть ключевую роль в развитии многих медицинских технологий.

Литература

1. Moore G. Cramming more components onto integrated circuits. *Electronics* 1965; 38 (8): 114–117.
2. Boretos J.W., Eden M. *Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects*. Park Ridge: Noyes Publications; 1984. 232–233.
3. Massia S.P., Hubbell J.A. Covalent surface immobilization of Arg–Gly–ASP– and Tyr–Lle–Gly–Ser–Arg-containing peptides to obtain well-defined cell-adhesive substrates. *Anal. Biochem.* 1990; 187(2): 292–301.
4. Kam L., Shain W., Turner J.N., Bizios R. Selective adhesion of astrocytes to surfaces modified with immobilized peptides. *Biomaterials* 2002; 23(2): 511–515.
5. Kobayashi H., Ikada Y. Covalent immobilization of proteins onto the surface of poly(vinyl- alcohol) hydrogel. *Biomaterials* 1991; 12(8) 747–751.
6. Chandy T., Das G.S., Wilson R.F, Rao G.H.R. Use of plasma glow for surfaceengineering biomolecules to enhance blood compatibility of Dacron and PTFEvascular prosthesis. *Biomaterials* 2000; 21(7): 699–712.
7. Han D.K, Jeong S.Y, Kim Y.H. Evaluation of blood compatibility of PEO-grafted and heparin-immobilized polyurethanes. *J. Biomed. Mater. Res.* 1989; 23 (A2 Suppl.): 211–228.
8. Clark P. Cell behavior on micropatterned surfaces. *Biosens. Bioelectron.* 1994; 9 (9–10): 657–661.
9. Williams J.M. Ion implantation for implantable devices. *Biomed. Sci. Instrum.* 1986; 22: 75–76.
10. Jagielski J., et al. Ion implantation for surface modifications of biomaterials. *Surf. Coat Technol.* 2006; 200 (22–23): 6355–6361.
11. Cui F.Z., Luo Z.S. Biomaterials modification by ion-beam processing. *Surf. Coat Technol.* 1999; 112 (1–3): 278–285.
12. Agrawal C.M. Reconstructing the human body using biomaterials. *JOM* 1998; 50 (1): 31–35.
13. He W., et al. Micro/nanomachining of polymer surface for promoting osteoblast cell adhesion. *Biomed Microdevices* 2003; 5(2): 101–108.
14. He W., Poker D.B., Gonsalves K.E., Batina N. Micro/nanomachining of polymeric substrates by ion beam techniques. *Microelectron. Eng.* 2003; 65 (1–2): 153–161.
15. Webster T.J., Siegel R.W., Bizios R. Nanoceramic surface roughness enhances osteoblast and osteoclast functions for improved orthopedica/dental implant efficacy. *Scra Mater.* 2001; 44 (8–9): 1639–1642.
16. Lappalainen R., Anttila A., Heinonen H. Diamond coated total hip replacements. *Clin. Orthop. Relat Res.* 1998; 352: 118–127.
17. Kostov K.G., et al. Structural effect of nitrogen plasma-based ion implantation on ultra-high molecular weight polyethylene. *Surf. Coat Technol.* 2004; 186 (1–2): 287–290.

18. Derbyshire B., Fisher J., Dowson D., Hardaker C., Brummit K. Comparative study of the wear of UHMWPE with zirconia ceramics and stainless steel femoral heads in artificial hip joints. *Med. Eng. Phys.* 1994; 16 (3): 229–236.
19. Chen J., et al. Surface modification of ion implanted ultra high molecular weight polyethylene. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res.* 2000; 169 (1–4): 26–30.
20. Shi W., Li X.Y., Dong H. Preliminary investigation into the load bearing capacity of ion beam surface modified UHMWPE. *J. Mater. Sci.* 2004; 39 (9): 3183–3186.
21. Valenza A., Visco A.M., Torrisi L., Campo N. Characterization of ultra-highmolecular-weight polyethylene (UHMWPE) modified by ion implantation. *Polymer* 2004; 45 (5): 1707–1715.
22. Lee J.S., et al. Selective adhesion and proliferation of cells on ion-implanted polymerdomains. *Biomaterials* 1993; 14 (12): 958–960.
23. Sioshansi P. New processes for surface treatment of catheters. *Artif. Organs* 1994; 18 (4): 266–271.
24. Iwaki M., et al. Ion bombardment into inner wall surfaces of tubes and their biomedical applications. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 1995; 106 (1–4): 618–623.
25. Bambauer R., Mestres P., Schiel R., Klinkmann J., Sioshansi P. Surface-treated catheters with ion beam-based process evaluation in rats. *Artif. Organs* 1997; 21 (9): 1039–1041.
26. Sato H., et al. Enhanced growth of human vascular endothelial cells on negative ion (Ag)-implanted hydrophobic surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 44 (1): 22–30.
27. Tsuji H., et al. Negative-ion beam surface modification of tissue-culture polystyrene dishes for changing hydrophilic and cell attachment properties. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 1999; 148 (1–4): 1136–1140.
28. Xu G., et al. Oxygen ion implantation at 20 to 2000 keV into polysulfone for improvement of endothelial cell adhesion. *Colloids Surf. B* 2000; 19 (3): 237–247.
29. Bačaková L., Mareš V., Lisá V., Švorčík V. Molecular mechanisms of improved adhesion and growth of an endothelial cell line cultured on polystyrene implanted with fluorine ions. *Biomaterials* 2000; 21(11): 1173–1179.
30. Suzuki Y. Ion beam modification of polymers for the application of medical devices. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2003; 206: 501–506.
31. Kurotobi K., Kaibara M., Suzuki Y., Iwaki M. Nakajima. Plasma protein adsorption onto cell attachment controlled ion implanted collagen. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2001; 175–177: 791–796.
32. Tsuji H., et al. Improvement of polydimethylsiloxane guide tube for nerve regeneration treatment by carbon negative-ion implantation. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2003; 206: 507–511.
33. Okuyama Y., et al. Neurite outgrowth on fluorinated polyimide film micropatterned by ion irradiation. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2003; 206: 543–547.
34. Takahashi N., et al. Biocompatibility of modified PTFE for an artificial dura mater. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2006; 242 (1–2): 61–64.
35. Li D., Cui F., Gu H. F⁺-ion implantation induced cell attachment on intraocular lens. *Biomaterials* 1999; 20 (20): 1889–1896.
36. Švorčík V., et al. Adhesion and proliferation of keratinocytes on ion beam modified polyethylene. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2000; 11 (10): 655–660.
37. Švorčík V., et al. Fibroblasts adhesion on ion beam modified polyethylene. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2004; 215: 366–372.

38. Melnig V., Apetroaei N., Dumitrascu N., Suzuki Y., Tura V. Improvement of polyurethane surface biocompatibility by plasma and ion beam techniques. *J. Optoelectron. Adv. Mater.* 2005; 7 (5): 2521–2528.
39. Davenas J., Threvenard P., Philippe F., Arnaud M. Surface implantation treatments to prevent infection complications in short term devices. *Biomol. Eng.* 2002; 19 (2–6): 263–268.
40. Boldryeva H., Umeda N., Plaksin O., Takeda Y., Kishimoto N. High-fluence implantation of negative metal ions into polymers for surface modification and nanoparticle formation. *Surf. Coat Technol.* 2005; 196 (1–3): 373–377.
41. Zhang W., et al. Plasma surface modification of polyvinyl chloride for improvement of antibacterial properties. *Biomaterials* 2006; 27 (1): 44–51.
42. Wang J., et al. The effect of amorphous carbon films deposited on polyethylene terephthalate on bacterial adhesion. *Biomaterials* 2004; 25 (16): 3163–3170.
43. Chu P.K., Chen J.Y., Wang L.P., Huang N. Plasma-surface modification of biomaterials. *Mater. Sci. Eng. R.* 2002; 36 (5–6): 143–206.
44. Buchanan R.A., Rigney E.D. Jr., Williams J.M. Wear-accelerated corrosion of Ti–6Al–4V and nitrogen-ion-implanted Ti–6Al–4V: mechanisms and influence of fixed-stress magnitude. *J. Biomed. Mater. Res.* 1987; 21(3): 367–377.
45. Oliver W.C, Hutchings R., Pethica J.B. The wear behavior of nitrogen-implanted metals. *Metall Trans.* 1984; 15A (12): 2221–2229.
46. Sioshansi P., Oliver R.W., Matthews F.D. Wear improvement of surgical titanium alloys by ion implantation. *J. Vac. Sci. Technol.* 1985; 3 (6): 2670–2674.
47. Tan L., Dodd R.A., Crone W.C. Corrosion and wear-corrosion behavior of Ni–Ti-modified by plasma source ion implantation. *Biomaterials* 2003; 24 (22): 3931–3939.
48. Krupa D., et al. Effect of calcium-ion implantation on the corrosion resistance and biocompatibility of titanium. *Biomaterials* 2001; 22 (15): 2139–2151.
49. Krupa D., et al. Effect of phosphorous-ion implantation on the corrosion resistance and biocompatibility of titanium. *Biomaterials* 2002; 23 (16): 3329–3340.
50. Hanawa T., et al. Early bone formation around calcium-ion-implanted titanium inserted into rat tibia. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 36 (1): 131–136.
51. Pham M.T, et al. Surface induced reactivity for titanium by ion implantation. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2000; 11(6): 383–391.
52. Nayab S.N, et al. Adhesion of bone cells to ion-implanted titanium. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003; 14 (11): 991–997.
53. Nayab S.N., Jones F.H., Olsen I. Human alveolar bone cell adhesion and growth on ion-implanted titanium. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004; 69 (4): 651–657.
54. Nayab S.N., Jones F.H., Olsen I. Effects of calcium ion implantation on human bone cell interaction with titanium. *Biomaterials* 2005; 26 (23): 4717–4727.
55. Krupa D., et al. Effect of dual ion implantation of calcium and phosphorous on the properties of titanium. *Biomaterials* 2005; 26 (16): 2847–2856.
56. Tsyganov I., Wieser E., Matz W., Reuther H., Richter E. Modification of the Ti–6Al–4V alloy by ion implantation of calcium and/or phosphorous. *Surf. Coat Technol.* 2002; 158–159, 318–323.
57. Baumann H., Bethge K., Bilger G., Jones D., Symietz I. Thin hydroxyapatite surface layers on titanium produced by ion implantation. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2002; 196 (3–4): 286–292.
58. Pham M.T., et al. Solution deposition of hydroxyapatite on titanium pretreated with a sodium ion implantation. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 59 (4): 716–724.

59. Maitz M.F., et al. Ion beam treatment of titanium surfaces for enhancing deposition of hydroxyapatite from solution. *Biomol. Eng.* 2002; 19 (2–6): 269–272.
60. Maitz M.F., Poon R.W.Y., Liu X.Y., Pham M.T., Chu P.K. Bioactivity of titanium following sodium plasma immersion ion implantation and deposition. *Biomaterials* 2005; 26 (27): 5465–5473.
61. Yang Y.Z., Tian J.M., Tian J.T., Chen Z.Q. Surface modification of titanium through amino group implantation. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001; 55 (3): 442–444.
62. Yang Y.Z., Tian J.M., Deng L., Ong J.L. Morphological behavior of osteoblastlike cells on surface-modified titanium *in vitro*. *Biomaterials* 2002; 23 (5): 1383–1389.
63. De Maezta M.A., Alava J.I., Gay-Escoda C. Ion implantation: surface treatment for improving the bone integration of titanium and Ti6-Al4–V dental implants. *Clin. Oral Implants Res.* 2003; 14 (1): 57–62.
64. Lee D.H., Park B., Saxena A., Serene T.P. Enhanced surface hardness by boron implantation in Nitinol alloy. *J. Endod.* 1996; 22 (10): 543–546.
65. Rapisarda E., Bonaccorso A., Tripi T.R., Condorelli G.G., Torrisi L. Wear of nickel-titanium endodontic instruments evaluated by scanning electron microscopy: effect of ion implantation. *J. Endod.* 2001; 27 (9): 588–592.
66. Ryan R., Walker G., Freeman K., Cisneros G.J. The effects of ion implantation on rate of tooth movement: an *in vitro* model. *Am. J. Orthod. Dentofac Orthop.* 1997; 112 (1): 64–68.
67. Jung J.H., et al. Does a carbon ion implanted surface reduce the restenosis rate of coronary stents? *Cardiology* 2005; 104 (2): 72–75.
68. Yang P., et al. Blood compatibility improvement of titanium oxide film modified by phosphorous ion implantation. *Nucl. Instrum. Methods Phys. Res. B* 2006; 242 (1–2): 15–17.
69. Murayama Y., et al. Ion implantation and protein coating of detachable coils for endovascular treatment of cerebral aneurysms: concepts and preliminary results in swine models. *Neurosurgery* 1997; 40 (6): 1233–1243.
70. Yoshinari M., Oda Y., Kato T., Okuda K. Influence of surface modifications to titanium on antibacterials activity *in vitro*. *Biomaterials* 2001; 22 (14): 2043–2048.
71. Dan Z.G., Ni H.W., Xu B.F., Xiong J., Xiong P.Y. Microstructure and antibacterial properties of AISI 420 stainless steel implanted by copper ions. *Thin Solid Films* 2005; 492 (1–2): 93–100.
72. Douvas A., et al. Photolithographic patterning of proteins with photoresists processable under biocompatible conditions. *J. Vac. Sci. Technol. B* 2001; 19 (6): 2820–2824.
73. Douvas A., et al. Biocompatible photolithographic process for the patterning of biomolecules. *Biosens. Bioelectron.* 2002; 17 (4): 269–278.
74. Diakoumakos C.D., et al. Dilute aqueous base developable resists for environmentally friendly and biocompatible processes. *Microelectron. Eng.* 2002; 61–62: 819–827.
75. He W., Gonsalves K.E., Pickett J.H., Halberstadt C.R. Synthesis, characterization, and preliminary biological study of poly(3-(t-butoxycarbonyl)-N-vinyl-2-pyrrolidone). *Biomacromolecules* 2003; 4 (1): 75–79.
76. He W., Halberstadt C.R., Gonsalves K.E. Lithography application of a novel photoresist for patterning of cells. *Biomaterials* 2004; 25 (11): 2055–2063.
77. Abrams G.A., Goodman S.L., Nealey P.F., Franco M., Murphy C.J. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res.* 2000; 299 (1): 39–46.

78. Hu W., Yim E.K.F., Reano R.M., Leong K.W., Rang S.W. Effects of nanoimprinted patterns in tissue-culture polystyrene on cell behavior. *J. Vac. Sci. Technol. B* 2005; 23 (6): 2984–2989.
79. Chou S.Y. Nanoimprint lithography and lithographically induced self-assembly. *MRS Bull* 2001; 26 (7): 512–517.
80. Bao L.R., et al. Nanoimprinting over topography and multiplayer three-dimensional printing. *J. Vac. Sci. Technol. B* 2002; 20 (6): 2881–2886.
81. Chan-Park M.B., et al. Fabrication of high aspect ratio poly(ethylene glycol)-containing microstructures by UV-embossing. *Langmuir* 2003; 19: 4371–4380.
82. Gao J.X., et al. UV-embossing of sub-micrometer patterns on biocompatible polymeric films using a focused ion beam fabricated Ti–N mold. *Chem. Mater.* 2004; 16: 956–958.
83. Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J., Vacanti J.P. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103 (8): 2480–2487.

НОВЫЕ НАНОСТРУКТУРЫ В КАЧЕСТВЕ МОЛЕКУЛЯРНЫХ НАНОМОТОРОВ

Янь Чэнь, Цзяньвэй Джефф Ли, Цзехуэй Чарльз Цао и Вейхун Тань

3.1. Введение

Нанотехнология по сути занимается разработкой, конструированием и анализом устройств и систем, формы и размер которых находятся в нанометровом диапазоне. В XXI столетии, как предсказал Ричард Фейман еще в середине прошлого века, нанотехнология будет одной из наиболее развивающихся областей науки и техники, в которой исследователям предстоит решить множество важных задач — от фундаментальных научных проблем до биомедицины и космической технологии. Интерес к нанотехнологии возрос благодаря созданию молекулярных структур, позволяющих получать информацию о строении человеческого организма на молекулярном уровне. Это привело к развитию новой отрасли, наномедицины, выводит диагностику, лечение и предотвращение многих заболеваний на новый уровень [1]. В настоящее время изучению взаимодействия наноматериалов с биологическими системами посвящено огромное число исследований.

Возможность изменения свойств биологических наноструктур делает их чрезвычайно привлекательными для применения в научных исследованиях и коммерчески выгодных технологиях. Уже появились различные наноструктуры, используемые в биосенсорах. К ним относятся нанотрубки, нановолокна, наностержни, наночастицы и тонкие пленки. Они позволяют разрабатывать новейшие технологии преобразования сигнала для быстрого анализа многих веществ *in vivo*. Нанотехнологи планируют применение биомолекул и процессов, происходящих с их участием, для создания новых материалов и устройств, вплоть до пока гипотетического конструирования нанороботов. В долгосрочной перспективе даже самые ранние разработки молекулярных наноустройств могут оказаться полезными в создании эффективных инструментов для диагностики заболеваний и продления жизни человека.

Один из вопросов, возникающих при зарождении идеи подобного наноустройства, звучит так: «Как обеспечить энергией наноустройство?» Ведь эти устройства также нуждаются в энергии для надежной и долговременной работы, как и обычное оборудование. Одно из возможных решений вопроса состоит

в конструировании наномоторов на основе биологических молекул. До настоящего времени была показана и охарактеризована вероятность разработки и создания нескольких типов наномоторов, базирующихся на основе свойств белков, ДНК и РНК, а также на их способности к превращению биологической или химической энергии в механическую.

Белки — идеальный объект для инженерных целей, поскольку они обладают сложным строением, разнообразными химическими свойствами, а иногда и ферментативной активностью. Моторные белки можно использовать в наноустройствах для линейного перемещения, вращательного или еще более сложного передвижения в трехмерном пространстве. Наноустройства способны реагировать на воздействие окружающей среды посредством белков со «встроенными переключателями», работающими по принципу «включено–выключено» или же с помощью более тонко настроенных и сложных логических пороговых систем с ранжированным откликом или с многочисленными входами. Такие устройства будут способны «чувствовать» свое окружение.

Более сложные функции могут включать транспорт, т. е. захват, перемещение и доставку грузов с применением белковых транспортеров и полостей пор. Большинство моторных белков совершают реальную работу путем активного перемещения других соединений или белков внутри клетки. Примером белка такого типа является кинезин, который «ходит» на «рельсах тубулина», передвигая везикулы по определенным маршрутам внутри клетки. Подобным образом перемещают груз некоторые миозины, используя филаменты актина в качестве направляющего устройства. Помимо внутриклеточного транспорта по микротрубочным каналам, динеин и тубулин совместно участвуют в передвижении некоторых клеток, например сперматозоидов и простейших микроорганизмов [2].

Наномотры можно создать на основе и других биологических молекул, например ДНК. ДНК предоставляет мощный потенциал для разработки наномоторов за счет способности к формированию двойной спирали путем спаривания нуклеотидов в соответствии с принципом комплементарности, а также за счет изменения конформации под влиянием внешних факторов [3].

3.2. Мульти-ДНК наномоторы

При создании различных наномоторов конформационные изменения, вызванные внутримолекулярной гибридизацией комплементарных молекул ДНК, могут быть превращены в механический отклик.

Первым мотором, основанным на гибридизации, был «ДНК-пинцет», созданный Юрке с коллегами [4]. Основанный на использовании химического «топлива», полученного реакцией обмена между цепями, пинцет вовлекает во внутримолекулярную гибридизацию три олигонуклеотида (рис. 3.1). Цепь А, дважды помеченная 3'-ТАМРА (карбокситетрамелилпродамин) и флуорогенной группой 5'-ТЕТ (тетрахлорфлуоресцин), состоит из двух последовательностей, содержащих по 18 оснований, гибридизующихся с комплементарными последовательностями на концах цепей В и С, с образованием двух жестких консо-

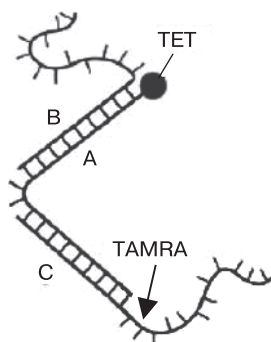


Рис. 3.1. Конструкция молекулярного пинцета, структура которого сформирована путем гибридизации олигонуклеотидных цепей A, B и C

лей; шарнирное соединение формируется из четырехбазовой одноцепочечной зоны A, находящейся между областями, гибридизованными с цепями B и C. В этой конформации, названной «состояние покоя», две оставшиеся негибридизованные 24 базовые части из 42-членных цепей B и C свободно располагаются на концах пинцета.

Работа молекулярного пинцета показана на рис. 3.2 (см. цветную вклейку). В состоянии покоя флуорогенные группы разделены в пространстве, следовательно, никакой передачи внутримолекулярной энергии от TET к TAMRA не происходит, и гашения TET-флуоресценции нет. Созданный пинцет открывается и закрывается посредством топливных цепей F и \bar{F} . Закрывающая цепь F состоит из трех областей, две из которых являются 24-членными базовыми фрагментами, комплементарными со свободными окончаниями пинцета на цепях B и C. Другая цепь, \bar{F} , находится на одной пластинке устройства вместе с дополнительным участком из 8 оснований. Гибридизация цепи F и пинцета на свободных окончаниях зон сводит пластинки пинцета вместе. В закрытом состоянии флуоресцентный сигнал от TET гасится за счет внутримолекулярной передачи энергии от TET к TAMRA. При добавлении открывающей цепи \bar{F} , комплементарной цепи F, происходит обмен цепей и F вытесняется из пинцета из-за образования более стабильного дуплекса с \bar{F} . Разъединившись с F, пинцет возвращается в состояние покоя и снова флуоресцирует. Пинцет совершает один цикл раскрытия и закрытия с уходящим продуктом в виде $F\bar{F}$ -дуплекса, причем данный процесс полностью обратим. Время переключения составляет около 13 с. В каждом цикле флуоресцентный сигнал уменьшается на шесть порядков, когда пинцет закрыт за счет F, и возрастает до первоначального уровня во время раскрытия пинцета посредством \bar{F} . Сила закрытия устройства составляет приблизительно 15 пН — это верхняя граница в диапазоне измеренных сил моторов кинезина с единичной группой и миозином.

Недостатком ДНК-пинцета является отсутствие прочности из-за формирования димера или олигомеров между циклами [5]. Первой жесткой конструкцией мотора на основе топологии многократных гибридизаций ДНК

стал наномотор $PX-JX_2$, предложенный Яном с сотрудниками [6] (рис. 3.3, см. цв. вклейку). Исследователи увеличили прочность исходной конструкции, применив механизм, описанный в работе [4], и добавив два параметрических фрагмента — паранемического скрещивания (PX) ДНК и его топоизомера JX_2 . На рис. 3.4 на цветной вклейке схематично показано превращение одного фрагмента в другой. Фрагмент PX состоит из двух спиральных областей, сформированных четырьмя цепями, расположенными вдоль центральной бивалентной оси, а его топоизомер JX_2 содержит два находящихся рядом участка без перекрещивания. Оба фрагмента составлены из внутренних «наборов» цепей. Зеленая цепь может установить мотор в конформацию PX , а бледно-пурпурная фиксирует его в форме JX_2 . В присутствии биотинилированных топливных цепей и с помощью магнитных слоев, покрытых стрептавидином, зеленые цепи могут быть удалены из PX . В этом случае произойдет формирование бесструктурного промежуточного соединения. Добавление бледно-пурпурных цепей переводит данное соединение в конформацию JX_2 . Обратный переход происходит аналогично.

Подтверждение работы наномотора получено с помощью атомно-силовой микроскопии [7]. Приведенное на рис. 3.5 АСМ-изображение демонстрирует цикл работы данного устройства.

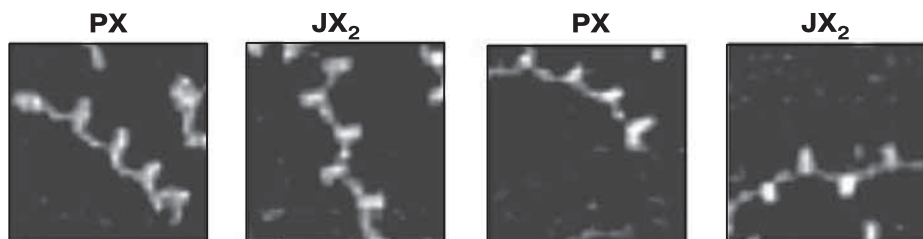


Рис. 3.5. Циклическое функционирование устройства. Показано три шага работы с одной частью цикла. Первоначально система находится в состоянии PX , затем превращается (слева направо) в состояние JX_2 , затем снова переходит в PX и после снова преобразуется в состояние JX_2 . Линейные образования PX , очевидно, находятся в *цис*-положении, а линейные структуры JX_2 — в *транс*-положении. Масштаб изображения — 200×200 нм

3.3. Наномоторы на основе одной цепи ДНК

Хотя исследователи применяли гибридизацию ДНК для конструирования ДНК-наномоторов с несколькими ДНК-молекулами, подобным образом может функционировать одна молекула ДНК. Примером служит разработка «молекулярного маяка», существенно упрощающего создание ДНК-мотора. Молекулярный маяк — одноцепочечная ДНК (оцДНК), способная образовывать

внутримолекулярные петли благодаря специально сконструированной нуклеотидной последовательности. Оба конца маяка помечены флуорофором F и гасителем флуоресценции Q соответственно. Перед гибридизацией с нужными нуклеотидами маяк приобретает структуру «стержень–петля», сводя F и Q на близкое расстояние, что приводит к незначительной флуоресценции, обусловленной статическим гашением флуорофора. После присоединения мишени петля молекулярного маяка гибридизуется с ней, создавая условия для образования стержневого дуплекса. Затем F и Q расходятся, и флуоресценция восстанавливается. Тань с коллегами использовали оцДНК и молекулярный маяк при создании аналогичного молекулярного мотора [8].

Основываясь на похожем принципе функционирования «белковых» моторов, учитывая их способность принимать различные конформации, авторы сконструировали одноцепочечный ДНК-мотор. Он может совершать переходы от сжатой к растянутой форме. Молекула ДНК в данном устройстве представляет собой 17-членный олигонуклеотид с последовательностью 5'-TGGTTGGTGTGGTTGGT-3'. Он имеет компактную и симметричную тетраплексную структуры (TE), состоящие из двух тетраэдров, построенных из гуанидина и трех петель (рис. 3.6). Сжатое состояние молекулы сводит оба конца нуклеотида вместе. Поэтому флуорофор F и гаситель люминесценции Q расположены на близком расстоянии и не флуоресцируют.

Принцип работы этого наномотора схематично изображен на рис. 3.7. В присутствии комплементарных нуклеотидов цепь α и 17-членная последовательность оснований формируют ДНК-дуплекс (DU), т. е. выпрямляющий тетраплекс, который разделяет концы мотора. Растянутая форма ДНК увеличивает интенсивность

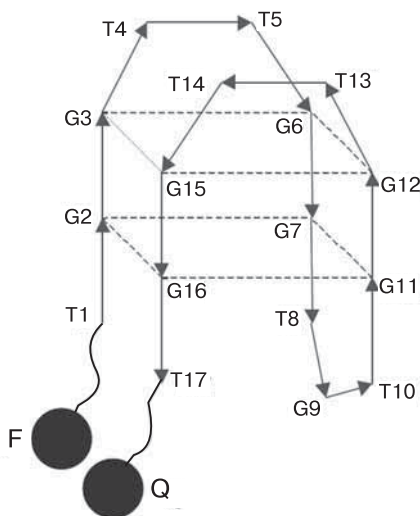


Рис. 3.6. Структурная конформация ДНК-мотора. F и Q — флуорофор и гаситель люминесценции соответственно. Прямоугольные плоскости (штриховые линии) представляют два слоя G-квартетных структур

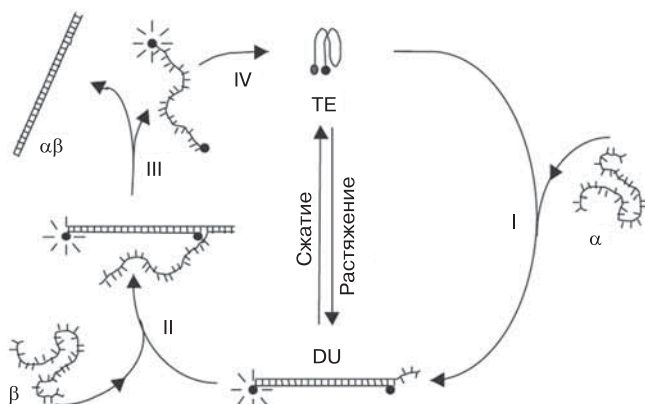


Рис. 3.7. Принцип работы ДНК-мотора. I — в присутствии α -цепи 17-членный фрагмент формирует дуплекс с α , выпрямляющий тетраплекс и разделяющий F и Q. При этом происходит изменение конформации TE в форму DU. II — добавление β -цепи запускает реакцию обмена цепи за счет спаривания липких концов ДНК и формирует более длинный дуплекс с α -цепью. III — реакция обмена цепи высвобождает 17-членный фрагмент из структуры DU. IV 17-членный фрагмент сворачивается и вновь формирует тетраплексную структуру

флуоресценции приблизительно в четыре раза. Описанное устройство называют «DUTE-мотор», поскольку он переходит от дуплексной формы (DU) к тетраплексной (TE). Исходное (сжатое) состояние DUTE-мотора наступает после реакции обмена цепей ДНК, включающей новую единичную цепь β , комплементарную с цепью α [9]. Реакция обмена цепей возникает из-за спаривания липких концов ДНК [10] и происходит через миграцию цепи [11] с образованием дуплекса $\alpha\beta$. Впоследствии 17-членный олигонуклеотид возвращается к исходной тетраплексной форме и завершает цикл «растяжение–сжатие». Добавление α -цепи запускает следующий цикл, что подтверждает полную обратимость процесса. На рис. 3.8 (см. цв. вклейку) приведены десять рабочих циклов мотора, зафиксированных цифровой фотокамерой. В каждом цикле дуплексная молекула ДНК $\alpha\beta$ высвобождает энергию во время гибридизации.

Эффективность преобразования энергии при вычислении изменения свободной энергии Гиббса в каждом цикле составляет 0,63 Дж; ее можно увеличить за счет уменьшения длины β -цепи. Под влиянием многовалентных ионов, например полиаминов, обмен цепей все еще происходит, даже если липкий конец находится на расстоянии, равном длине одного основания. В таком случае эффективность преобразования энергии может достичь 0,94 Дж.

Отметим, что обратимый циклический переход между сжатой и растянутой формами мотора DUTE дает возможность применения этой конструкции для изменения расстояния между наноэлементами в наносистемах. Например,

вычислено, что сила сжатия для данного мотора равна 2,2 пН, а растягивающая сила — 20,7 пН. Эти величины показывают, что мотор DUTE приблизительно в 10 раз мощнее белковых наномоторов, работающих на основе кинезина и миозина.

При молекулярном весе 7,8 кДа наноустройство на базе одной цепи ДНК — наименьшее среди молекулярных моторов, сконструированных из ДНК/белков. К тому же единичную молекулу ДНК легко синтезировать, и она способна работать в предсказуемом режиме. Исследователи полагают, что у данного мотора есть большие перспективы для эффективной работы с целью снабжения энергией наномасштабных устройств с удовлетворительной генерацией силы.

Хотя наномоторы с химическим топливом обладают преимуществами за счет простого синтеза и управления, образование избытка ДНК может изменить состав раствора и привести к уменьшению эффективности работы мотора. Необходимость добавки «топлива» в каждом цикле причиняет определенное неудобство и делает невозможным дистанционное управление. Химическое топливо можно заменить энергией от внешних источников, например оптических. Предполагают, что наномоторы, приводимые в действие световым излучением, могут быть весьма практичными и эффективными.

В лаборатории Токийского университета добились первого успеха, управляя гибридизацией ДНК с помощью УФ-излучения [12]. Асанума с сотрудниками встроили фотопереключаемые азобензольные группы в молекулу ДНК для обратимого образования и диссоциации соответствующего дуплекса. Перед УФ-облучением азобензольный фрагмент в составе ДНК находится в *транс*-форме. Так как *транс*-азобензол — неполярная и плоская структура, он легко взаимодействует с близлежащими основаниями ДНК, стабилизируя дуплекс. При УФ-облучении с $\lambda = 300\text{--}400$ нм азобензол приобретает полярную и неплоскую *цис*-форму, что влечет за собой раскрытие дуплекса. При воздействии света с $\lambda > 420$ нм *цис*-азобензол опять переходит в *транс*-форму (рис. 3.9).

Азобензольная группа, связанная с D-треонинолом, выбрана в качестве линкера, поскольку она вызывает изменение температуры плавления ($\Delta T_{\text{пл}} \sim 14,3$ °C) при фотоизомеризации. Еще одно преимущество управления гибридизацией ДНК действием света состоит в том, что азобензол, связанный с D-треонинолом, может быть непосредственно присоединен к цепи ДНК при синтезе (рис. 3.10). Опираясь на результаты данного эксперимента, авторы приступили к внедрению фотопереключаемой азобензольной группы в шпильку молекулярного маяка. За ходом процесса следили в режиме реального времени путем флуоресцентного обмена. Используя разницу в температурах плавления между хорошо сопряженным стержнем и стержнем с одним ошибочно спаренным основанием, сконструировали последовательность GAGXGACTGGTATCCTAAATCTC GCTC с азобензольным основанием X, находящимся в стержне. Краситель Texas Red был выбран в качестве флуорофора для молекулярного маяка вследствие большей длины волны возбуждения — 550 нм. Соединение под названием «Black Hole Quencher» применили в качестве гасителя флуоресценции на другом конце маяка. Введенный в стержень *транс*-азобензол при облучении видимым светом ста-

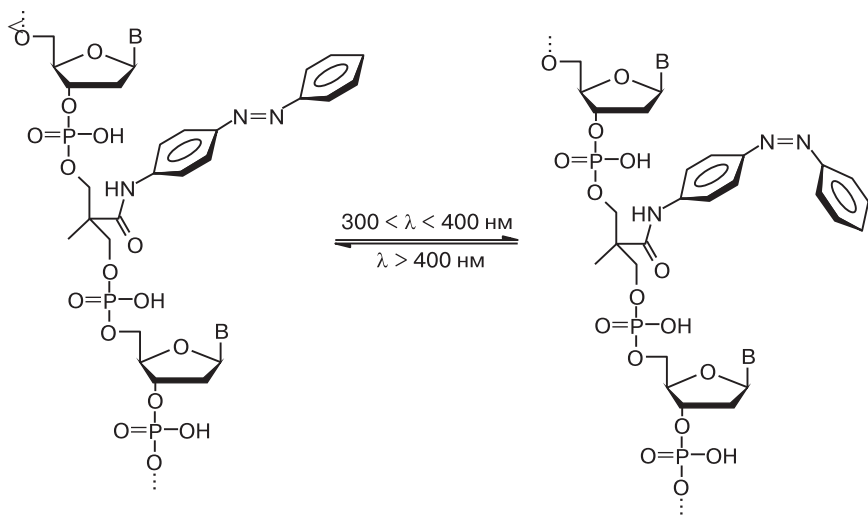


Рис. 3.9. Встраивание азобензола в цепочку ДНК. При УФ-облучении ($300 < \lambda < 400\text{ nm}$) *транс*-азобензол превращается в *цис*-форму. При облучении видимым светом ($\lambda > 400\text{ nm}$) происходит обратный переход

билизировал структуру шпильки и препятствовал флуоресценции биомеханического мотора. Под действием УФ-излучения *цис*-азобензол дестабилизировал стержень, вызывая тем самым восстановление флуоресценции (рис. 3.11). Первые результаты регистрации температуры плавления показали, что ее разница

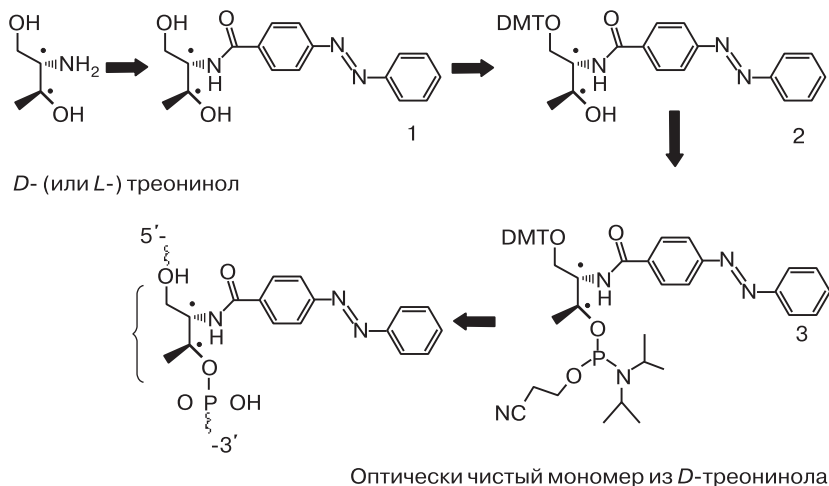


Рис. 3.10. Модифицированный олигодезоксинуклеотид, несущий азобензольную группу, присоединенную с помощью хирального диольного линкера. ДМТ — 4,4-диметокситрифенилметил

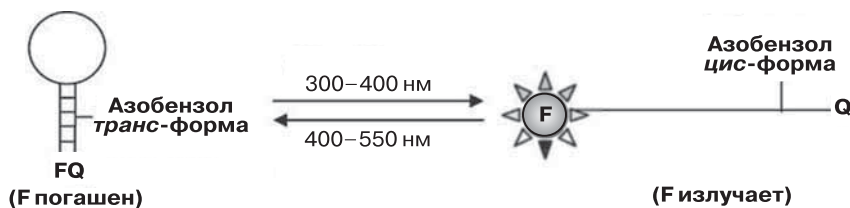


Рис. 3.11. Принцип работы молекулярного маяка, приводимого в действие световым излучением

между *транс*- и *цис*-формами азобензола составляет 20 °С. Такая разность температур приводит к различной стабильности двух структур и, как следствие, к переходу между открытой и закрытой формами биомеханического мотора при УФ- и видимом облучении. Для оценки силы открытия–закрытия и эффективности превращения энергии в наномоторе использовали атомно-силовую микроскопию. Предполагается, что присоединение двух наноэлементов на концах сконструированного наномотора обеспечит эффективное и контролируемое управление элементами в нанометровом масштабе.

Наномоторы на основе одной цепи ДНК могут преобразовывать биохимическую или оптическую энергию в механическую для создания источника энергии на молекулярном уровне. Силовые характеристики ДНК-наномоторов сравнимы или превосходят аналогичные для наномоторов на базе белков.

3.4. Заключение

При рассмотрении новой наносистемы, сконструированной на основе молекулы ДНК, был сделан акцент на ее химических свойствах, используемых для разработки наномасштабных энергетических устройств. Показано, что ДНК-наномоторы обладают потенциальными возможностями как источники механической силы для наноустройств. Встроенные в определенные участки матрицы, эти наномоторы могут применяться для управления наноэлементами с силами взаимодействия, сравнимыми по величине или даже превосходящими силы, создаваемые белковыми моторами. Хотя здесь были описаны фрагменты с комплементарным спариванием оснований, наномоторы, работающие по другим механизмам, могут также привести к созданию нового поколения наносистем, основанных на свойствах нуклеиновых кислот [13]. Эта область исследований только начинает развиваться, и возможно, в будущем возникнут новые идеи и конструкции на основе ДНК и белков.

Литература

1. Freitas R.A. Jr. Current status of nanomedicine and medical nanorobotics. *J. Comput. Theor. Nanosci* 2005; 2 (1): 1–25.
2. Vogel P.D. Nature's design of nanomotors. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 60: 267–277.
3. Astier Y., Bayley H., Howorka S. Protein components for nanodevices. *Curr. Opin Chem. Biol.* 2005; 9: 576–584.
4. Yurke B., Turberfield A.J., Mills A.P. Jr., Simmel F.C., Neumann J.L. A DNA-fuelled molecular machine made of DNA. *Nature* 2000; 406: 605–608.
5. Simmel F.C., Yurke B. Using DNA to construct and power a nanoactuator. *Phys. Rev. E* 2001; 041913.
6. Yan H., Zhang X.P., Shen Z.Y., Seeman N.C. A robust DNA mechanical device controlled by hybridization topology. *Nature* 2002; 415: 62–65.
7. Seeman N.C. From genes to machines: DNA nanomechanical devices. *Trends in Biochem. Sci.* 2005; 30: 119–125.
8. Li J.J., Tan W. A single DNA molecule nanomotor. *Nano Lett.* 2002; 2 (4): 315–318.
9. Kmiec E.B., Holloman W.K. DNA strand exchange in the absence of homologous pairing. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 10163–10168.
10. Li J.J., Tan W. Real time observation of DNA sticky end pairing by using fluorescence energy transfer. Forthcoming.
11. Thompson B.J., Camien M.N., Warner R.C. Kinetics of branch migration in double-stranded DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1976; 73: 2299–2303.
12. Asanuma H., et al. Enantioselective Incorporation of Azobenzenes into Oligodeoxyribonucleotide for Effective Photoregulation of Duplex Formation, *Angew Chem. Int. Ed.* 2001; 40 (14): 2671–2673.
13. Seeman N.C. At the crossroads of chemistry, biology, and materials: structural DNA nanotechnology. *Chem. Biol.* 2003; 10: 1151–1159.

БИОКОНЪЮГАТЫ МЯГКИХ НАНОМАТЕРИАЛОВ

Ниту Сингх, Уильям Блэкборн и Эндрю Лайон

4.1. Введение

В области физических исследований последнее десятилетие характеризуется необычайным ростом интереса к наноматериалам и их применению в биотехнологии. Превосходные оптические, электрические, магнитные и механические свойства многих наноструктур используются для создания чувствительных устройств (сенсоров), получения изображений, а также в медицинских целях. Значительная часть исследований посвящена изучению свойств «твердых» наноматериалов: углеродных наноструктур, магнитных материалов, металлов и полупроводников, поскольку именно здесь наиболее ярко и глубоко раскрываются их свойства. Исследования в этой области продолжаются, однако появляются новые, «мягкие» наноматериалы, созданные на основе традиционных полимеров. В частности, для многих биотехнологических исследований имеют перспективы использования наноструктурированные гидрогели и их конъюгаты с различными биомолекулами. В этой главе мы рассмотрим последние достижения в области биологии, связанные с применением биоконъюгатов, наноструктур и гидрогелей.

Роль наноструктуры для «мягких» материалов сильно отличается от оптически, магнитно или электрически активных материалов, поскольку большинство гидрогелей интересны, главным образом, именно из-за своей структуры или физико-химических свойств. Цель этой главы — обзор состояния современных исследований в области полимерных гидрогелей, где наноразмеры составляющих гель частиц напрямую соотносятся с размерами изучаемых биологических объектов. Полимерные частицы являются связующим звеном между традиционными объектами нанонауки и миром мягких материалов. Внимание к гидрогелям обусловлено и растущим интересом к применению гидрофильных полимеров в новых областях биотехнологии.

4.1.1. Определение гидрогелей

Дать четкое определение геля трудно, поскольку он сочетает в себе свойства твердых веществ и жидкостей — обладает определенной структурной целостностью и не растекается, будучи извлеченным из резервуара. Однако те моле-

кулы, размер которых значительно меньше диаметра пор геля, способны перемещаться в нем почти как в жидкости. Из названия следует, что гидрогели — это гели, набухающие в водных средах. Они состоят из молекул гидрофильного полимера, соединенных в единую сеть перекрестными сшивками, образующимися за счет ковалентных или нековалентных взаимодействий [1–3]. Такая структура обеспечивает необходимое постоянство геометрических параметров гелей, а высокий уровень содержания растворителя — возможность диффузии веществ, неотличимой от жидкостной. Особые физические свойства этих материалов позволяют использовать их для самых разных нужд: *in vitro*-диагностики, доставки лекарств или генов, разделении химических веществ, а также создании химических или биологических сенсоров. Помимо этого, предпринимаются попытки синтезировать более сложные полимерные структуры, часто содержащие один или несколько биологических компонентов. Подобные материалы также создаются с целью улучшения биосовместимости, обеспечения возможности биodeградации и биологического распознавания, а также для включения веществ в капсулы или регуляции высвобождения их в окружающей среде. В этом разделе будут рассмотрены методы получения и применение различных биоконъюгатов гидрогелей с наноструктурой.

4.1.2. Классификация гидрогелей

Гидрогели можно классифицировать по различным признакам. Одна из классификаций основана на природе перекрестных сшивок: перекрестные сшивки образованы с помощью химических (1) или физических (2) взаимодействий [4]. В этой главе нет подробного описания методов получения и физико-химических свойств гидрогелей. Для более детального ознакомления со свойствами нанокристаллических полимеров советуем обратиться к превосходному обзору Душека и Принса [5].

Наиболее типичной формой гидрогеля являются макроскопические гели [6–8]. Размер их частиц составляет несколько миллиметров и более. Эта глава в основном посвящена рассмотрению микрогелей, которые состоят из более мелких частиц, — коллоидных гелей с размерами частиц от десятков нанометров до микрометров [9, 10]. Вероятно, одно из первых сообщений о синтезе микрогелей появилось в работе Штаудингера в 1935 г. [11], однако интерес к подобным структурам для нужд биотехнологии возник лишь недавно. Предлагаем читателям ознакомиться со свежими обзорами, посвященными коллоидным гидрогелям [12, 13].

4.1.3. Сигнал-чувствительные полимеры

Большое число современных исследований посвящено изучению гелей, реагирующих на внешние сигналы. На основе таких материалов можно создавать настраиваемые, или триггерные, устройства. Эти «реагирующие» гели часто называют «умными» материалами [14, 15]. Однако подобное название не

отражает реального положения вещей, поскольку поведение геля можно объяснить изменением фазового состояния полимера или разделением фаз. Поэтому такие структуры не «умнее» куска плавающегося льда. Тем не менее гидрогели реагируют на самые разные изменения: температуры [7], pH [10, 16], ионной силы [17–19], света [20–24], электрического поля [25] и действие биологических молекул [26–30]. Способность гидрогелей отзываться на внешний сигнал зависит от типа полимера в основе геля и/или модификаций, проведенных после полимеризации.

Гидрогели на основе сигнал-чувствительных полимеров, в том числе биоконъюгатов, нашли интересное применение. В этом разделе мы обсудим основные свойства сигнал-чувствительных материалов, поскольку это необходимо для понимания остального текста. Один из наиболее широко используемых полимеров такого рода — поли-N-изопропилакриламид, мономерным звеном которого является N-изопропилакриламид [31]. Большая часть исследований в нашей лаборатории проводится именно с ним. В одной из первых работ, посвященных изучению свойств N-изопропилакриламида [32], было показано, что фазовый переход для этого полимера является эндотермическим и связан с изменением энтропии. Именно благодаря такому необычному поведению в воде N-изопропилакриламид стал широко использоваться для получения чувствительных гидрогелей. Как и большинство других полимеров на основе олефиновых мономеров, N-изопропилакриламид можно синтезировать разными способами: путем окислительно-восстановительной, свободнорадикальной или ионной инициации, а также под воздействием радиации [31]. Кроме того, с помощью сополимеризации или последующей полимеризации в N-изопропилакриламид вводят различные функциональные группы, что позволяет создавать многофункциональные материалы, чувствительные к различным сигналам.

Поведение любого полимера в растворе связано с равновесием между взаимодействиями растворитель–растворитель, растворитель–полимер и полимер–полимер. Для сигнал-чувствительных полимеров сольватацию можно регулировать путем усиления одного типа взаимодействий или ослабления другого. Этот процесс схематично изображен на рис. 4.1. В водной среде N-изопропилакриламид образует водородные связи с водой посредством боковых амидных групп. Однако изопропильные группы боковой цепи способствуют структурированию воды за счет гидрофобных взаимодействий. В результате изменения энтропии структурирования воды способствует гидрофобным полимер–полимерным взаимодействиям [31]. В тех условиях, когда N-изопропилакриламид

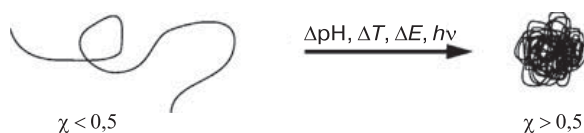


Рис. 4.1. Схематичное изображение фазового перехода сигнал-чувствительного полимера в результате изменения параметров растворителя

образует случайную спираль, воздействие растворителя на него сильнее, чем связи между молекулами полимера. При повышении температуры водородные связи разрываются, и происходит направляемое энтропией высвобождение связанной и структурированной воды, что способствует образованию глобулярной структуры. При этом взаимодействия полимер–полимер становятся сильнее взаимодействий растворитель–полимер, и происходит выделение полимерной фазы. Температура, при которой происходит этот переход, называется нижней критической температурой растворения (НКТР). Именно такое поведение N-изопропилакриламида делает его особенно привлекательным материалом для получения сигнал-чувствительных гидрогелей. Однако стоит заметить, что в переходе при НКТР следует учитывать не только вклад гидрофильных и гидрофобных групп в боковых цепях полимера. Например, полимер, образующийся из N-изопропилметакриламида (НИПМА) [33–38], отличается от N-изопропилакриламида лишь наличием метильной группы, но в воде имеет более высокое значение НКТР, т. е. обладает более выраженными гидрофильными свойствами, несмотря на повышенное содержание органических групп. По-видимому, эта «усиленная гидрофобность» не является следствием возрастания полярности полимера, а возникает в результате снижения гибкости цепи. Это изменяет вклад энтропийного фактора в значение свободной энергии смеси и тем самым повышает НКТР.

4.1.4. Микрогели и наногели

Свойства устойчивых коллоидных частиц гидрогелей, также называемых микро- или наногелями, напоминают свойства макрогелей. В частности, микрогель на основе N-изопропилакриламида характеризуется температурой фазового перехода, расположенной вблизи значения НКТР родительского полимера [13, 39] с изменением удельного объема. Кроме того, микрогели обладают и другими параметрами коллоидных дисперсий, такими как дзета-потенциал [13, 40, 41], а при приготовлении монодисперсных зольей способны образовывать упорядоченные фазы [42–45].

В некоторых исследованиях подробно изучались различия между фазовым поведением макро- и микрогелей [13, 39, 43, 46–58]. Данных такого рода много, поэтому мы рассмотрим лишь один пример, иллюстрирующий сложность подобных систем. Например, было показано, что температура фазового перехода микрогелей чуть выше значения НКТР полимерного N-изопропилакриламида (рис. 4.2), а фазовый переход происходит не так резко [46]. Причина более плавного скачка заключается в большей гетерогенности длин субцепей микрогеля по сравнению с традиционными макрогелями. При температуре выше температуры фазового перехода участки частиц с более длинными субцепями сильнее коллапсируют при более низкой температуре, чем участки с укороченными субцепями. Таким образом, наблюдаемый фазовый переход в микрогеле можно рассматривать как суммарный результат фазовых переходов различных подсетей в конкретной частице. Мы также наблюдали подобное поведение

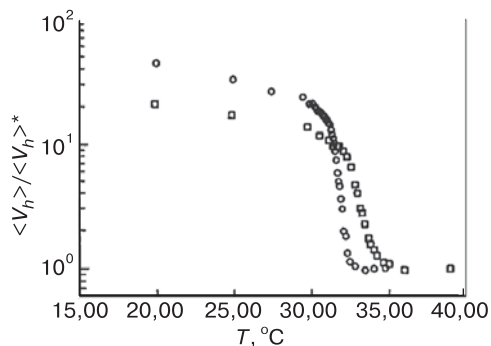


Рис. 4.2. Температурная зависимость сжатия линейных цепей поли-N-изопропилакриламида (○) и перекрестно-сшитых микрогелей (□) в воде

микрогелей со структурой типа «ядро–оболочка» при определении градиента перекрестных сшивок с помощью флуоресцентных зондов [50].

Из-за гетерогенности длин перекрестных сшивок микрогели характеризуются более плавным фазовым переходом по сравнению с фазовым переходом линейных цепей N-изопропилакриламида.

Использование микрогелей с функциональными группами позволяет не только контролировать фазовый переход и проводить последующие полимеризационные модификации, но и предоставляет возможность инициировать ответ на изменение pH, ионной силы или освещенности. Однако для создания функциональных микрогелей с помощью химических модификаций важно понимать, каким образом функциональные группы распределяются в структуре полимера. Одна из недавних работ позволяет лучше разобраться в этом вопросе [59]. Исследователи описывают два способа контроля распределения функциональных групп. В первом случае остатки акриловой кислоты (АК) включали в акриламидные/N-изопропилакриламидные микрогели путем гидролиза акриламидных блоков. Второй метод состоял в прямой сополимеризации метакриловой кислоты (МАК) с N-изопропилакриламидом. Топохимическое распределение кислотных групп в двух полученных полимерах было различным. Еще одним фактором, влияющим на распределение функциональных групп, является температура гидролиза акриламида, а именно находится ли она выше или ниже значения НКТР для микрогеля. Проведение потенциометрического и кондуктометрического титрования, а также оценка электрофоретической подвижности микрогелей показали, что при температуре ниже НКТР карбоксильные группы в основном распределены по всему объему геля, тогда как при температуре выше НКТР большинство групп сосредоточено вблизи поверхности. В микрогелях, образованных в результате сополимеризации МАК и N-изопропилакриламида, образуется структура типа «ядро–оболочка», причем молекулы МАК в основном формируют оболочку. Разное распределение карбоксильных групп в микрогелях, образованных из различных сомономеров, связано

с отличиями в кинетике полимеризации, которое, в свою очередь, объясняется разной реакционной способностью мономеров. Сополимер акриламида и N-изопропилакриламида образуется в результате случайного встраивания мономеров и, следовательно, характеризуется относительно равномерным распределением их в микрогеле. Напротив, соотношение реакционной способности МАК и N-изопропилакриламида таково, что последний более склонен к гомополимеризации, вслед за которой происходит полимеризация МАК, что приводит к образованию структуры типа «ядро–оболочка».

4.2. Материалы со структурой типа «ядро–оболочка». Мицеллы из блок-сополимеров

В литературе широко обсуждаются методы получения и поведение гидрогелевых латексов [12, 13]. В этом разделе мы поговорим о синтезе и применении частиц с более сложной организацией. В качестве примера рассмотрим материалы со структурой типа «ядро–оболочка». Такие гидрогели можно разделить на два основных класса: в одном случае ядро состоит из негидрогелевого материала, а оболочка — из гидрогеля, а во втором случае как ядро, так и оболочка построены из гидрогеля. В материалах первого класса в качестве ядра обычно выступает твердый материал, например полистирол, кремний или наночастицы золота. Методом эмульсионной полимеризации в отсутствие ПАВ было синтезировано полистирольное ядро, содержащее в качестве сополимера небольшую долю N-изопропилакриламида [60]. Частицы полистирола/N-изопропилакриламида стабилизировали сульфатными группами инициатора полимеризации. Затем эти ядра использовались в качестве затравки для полимеризации перекрестно-сшитой оболочки, состоящей из N-изопропилакриламида. Ее синтез проводили при 80 °С, в результате чего периферия ядер была сжата и обогащена N-изопропилакриламидом, и на ней в результате преципитации происходила агрегация N-изопропилакриламида из раствора. В другой работе цепи N-изопропилакриламида прививали к полистирольному ядру, в результате чего образовывались «волосатые» частицы [61]. Аналогичный подход применялся для создания структур с кремниевым [62] и золотым ядром [63].

К другому типу материалов со структурой «ядро–оболочка» относятся те, в которых как ядро, так и оболочка построены из гидрогеля. В нашей исследовательской группе был проведен синтез таких частиц методом двустадийной преципитационной полимеризации [10]. При этом полимерную оболочку, структура и функциональные особенности которой могут быть такими же, как у ядра, а могут и отличаться, присоединяют к уже сформированному ядру, что позволяет контролировать радиальное распределение функциональных групп в частице. В типичном случае уже сформированные ядра, построенные из N-изопропилакриламида, нагревали до ~70 °С, а затем добавляли раствор мономера оболочки и инициировали полимеризацию. Поскольку в таком случае температура значительно превышала температуру фазового перехода ядра, частицы находились в коллапсированном состоянии. Они гидрофобны и, следовательно,

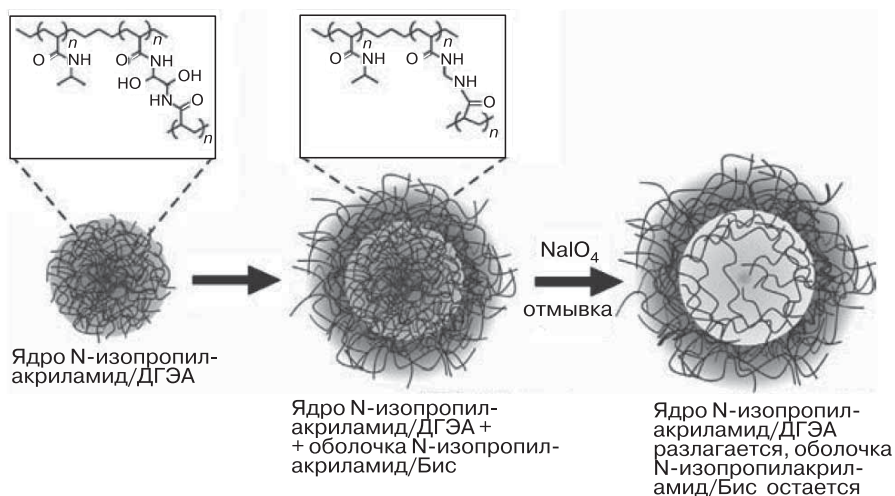


Рис. 4.3. Получение термочувствительных полых микрогелей с помощью окисления перекрестных швов ядра. Воспроизводится в соответствии с [68] с разрешения авторов. ДГЭА — N, N'-(1,2-дигидроэтилен)бисакриламид, Бис — N,N'-метилденбисакриламид

склонны притягивать к себе растущие олигомерные цепи, что способствует образованию оболочки вокруг ядра.

Приготовленные таким образом частицы со структурой «ядро–оболочка» обладают очень интересными свойствами [9, 33, 34, 50, 64–67]. Поскольку состав оболочки может отличаться от состава ядра, при изменении температуры такие частицы могут претерпевать несколько фазовых переходов [10, 33, 34]. Более того, в зависимости от плотности перекрестных швов в оболочке может наблюдаться компрессия или «упаковывание» ядра в результате действия градиента плотности перекрестных швов [64, 65, 67]. Мы также использовали такой подход для синтеза полых капсул гидрогеля (рис. 4.3) [68]. Для этого в состав ядра включали легко расщепляемые перекрестные швы, а в состав оболочки — стабильные. В качестве расщепляемых перекрестных швов использовались вицинальные диолы, разлагаемые при добавлении стехиометрического количества периодата. После расщепления ядра частицы тщательно отмывали путем центрифугирования. Для подтверждения поллой структуры использовали методы динамического светорассеяния и флуоресценции.

Берндт и Рихтеринг также синтезировали частицы типа «ядро–оболочка», используя разные полимеры для оболочки и для ядра [33]. В этом случае ядро было синтезировано из N-изопропилакриламида, а оболочка состояла из поли-N-изопропилметакриламида, для которого НКТР в воде составляет 45 °С. Как и в работе нашей группы, анализ термочувствительности этих частиц показал, что они претерпевают два перехода, соответствующие НКТР двух полимеров (рис. 4.4). В более поздних исследованиях изучали влияние толщины оболочки и плотности перекрестных швов на свойства микрогелей со

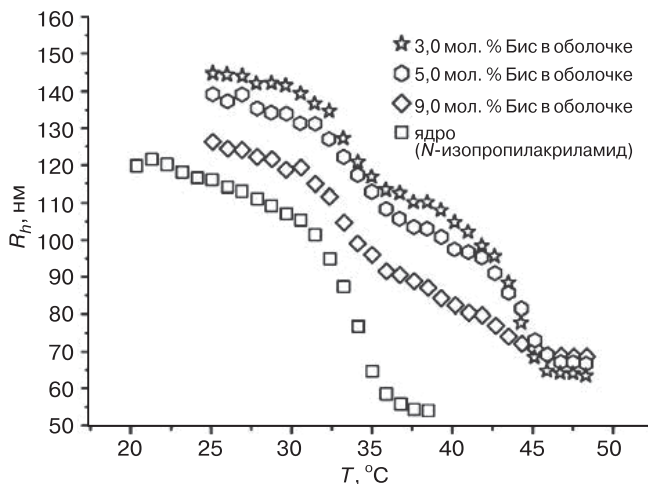


Рис. 4.4. Зависимость гидродинамического радиуса от температуры для микрогелей с ядром из N-изопропилакриламида и оболочкой из поли-N-изопропилметакриламида при различной концентрации перекрестных сшивок в оболочке. Частицы образца, содержащие 3,0 мол. % бисакриламида (Бис), претерпевают два фазовых перехода: первый соответствует НКТР для N-изопропилакриламида, а второй — НКТР для поли-N-изопропилметакриламида. Воспроизводится в соответствии с работой [33] с разрешения авторов

структурой «ядро–оболочка», обладающих двумя температурными переходами. Для анализа был применен метод малоуглового рассеяния нейтронов [69, 70]. Оказалось, что изменение плотности перекрестных сшивок в оболочке в основном влияет на размеры самой оболочки, не затрагивая ядра. Однако рост отношения массы оболочки к массе ядра приводит к увеличению ядра и увеличению поверхности контакта ядра и оболочки в диапазоне температур между двумя значениями НКТР. Это указывает на наличие силы упругости, действующей на ядро со стороны расширяющейся оболочки. При температуре ниже НКТР окруженное оболочкой ядро не способно набухать в той же степени, как свободное ядро (без оболочки). Следовательно, расширившаяся оболочка препятствует набуханию ядра. В другой работе той же группы было показано, что увеличение толщины оболочки сдвигает фазовый переход ядра в область более высоких температур, тогда как коллапс ядра может сместить фазовый переход тонкой оболочки в область более низких температур [71]. Кроме того, в микрогелях со структурой «ядро–оболочка» наблюдался еще один температурный переход, наличие которого объясняют образованием дополнительных водородных связей на границе ядра и оболочки, возникающих в результате сверхкомпенсации термодинамических сил при фазовом переходе в ядре силами упругости в оболочке.

Наночастицы гидрогеля также можно получить, используя способность блок-сополимеров образовывать мицеллы [72]. Мицеллообразующие блок-сополимеры, например поверхностно-активные вещества, имеют как гидрофобные, так и гидрофильные домены. Контролируя полярность растворителя и концентрацию полимера, можно добиться образования сферических мицелл блок-сополимеров. В гидрофильных средах гидрофобные блоки образуют ядро, а гидрофильные участки оказываются экспонированными наружу. Привлекательность этого подхода состоит в многовариантности получаемых комбинаций, подбираемых таким набором функциональных и структурных единиц наночастиц, чтобы регулировать расположение и число участков биоконъюгации.

Наночастицы, состоящие из мицелл блок-сополимеров, дополнительно укрепляют перекрестным сшиванием. Например, Жу и Наппер для создания микрогелей использовали блок-сополимер N-изопропилакриламид/полиэтиленоксид (ПЭО) [73, 74]. Сначала с помощью цериевой окислительно-восстановительной системы в азотной кислоте при 50 °С синтезировали блок-сополимер, а затем добавляли N,N'-метиленабисакриламид для образования перекрестных сшивок в микрогеле. Методом динамического светорассеяния было показано, что размер частиц микрогеля зависит от концентрации N-изопропилакриламида и ПЭО, а также от скорости нагревания системы при полимеризации.

Группа Карен Вули активно изучала мицеллы блок-сополимеров с перекрестными сшивками, которые назвали «клетками» (shell cross-linked knedels, SCK) [72, 75–88]. Размер SCK изменяется в диапазоне от 5 до 200 нм. Их готовят из амфифильных блок-сополимеров, которые самопроизвольно образуют полимерные мицеллы. Далее мицеллы стабилизируют с помощью перекрестных сшивок между функциональными группами боковых цепей в оболочке, как показано на рис. 4.5. Сначала появилось сообщение о создании SCK из блок-сополимера полистирола и поли-4-винилпиридина [75]. Для того чтобы полимер мог образовывать мицеллярные структуры, его гидрофильность повышали путем реакции азота пиридильной группы с *n*-хлорметилстиролом. При получении мицелл полимера стирольные группы в оболочке полимеризовались, образуя перекрестные сшивки. Размеры и топологию таких частиц можно контролировать путем изменения длины гидрофильных и гидрофобных блоков. Кроме того, группа Вули использовала подобный подход для приготовления гидрогелевых SCK [85, 88], а также наночастиц с легко расщепляемыми ядрами [77, 81].

Акийоши с соавторами показали, что полисахариды, частично модифицированные гидрофобными группами холестерина, в воде способны формировать наночастицы [89]. Размер таких частиц обычно составляет от 20 до 30 нм, причем монодисперсность этих систем подтверждается методами эксклюзионной хроматографии, динамического светорассеяния и просвечивающей электрон-



Рис. 4.5. Общая схема синтеза наночастиц со структурой «клетки» (SCK). Стадия деградации применяется для синтеза полых частиц. Воспроизводится в соответствии с работой [82] с разрешения авторов.

ной микроскопии. Они не являются истинными мицеллами блок-сополимеров, но родственны им, поскольку в их формировании задействованы примерно те же физические силы. Впервые о создании таких частиц сообщалось в 1993 г. Тогда в качестве полимера использовали гидрофобизированный пуллулан, содержащий 1,6 групп холестерина на 100 остатков глюкозы [89]. Молекулы такого полимера агрегировали, формируя наночастицы. Их можно рассматривать в качестве гидрогелей, в которых перекрестные сшивки образуются за счет взаимодействия гидрофобных участков. Размер частиц контролируют, меняя количество гидрофобных групп и структуру полимера. В этой же лаборатории были созданы термочувствительные пуллулановые частицы с добавками N-изопропилакриламида. Они способны захватывать и удерживать в гелевой структуре различные макромолекулы, например белки [90–93]. Процесс самопроизвольной сборки этих полимеров можно контролировать на молекулярном уровне (ассоциация гидрофобных групп), на уровне наноструктур (ассоциация гидрофобизированных полимеров), а также на макроскопическом уровне (ассоциация наночастиц). Процесс сборки полимерных частиц на основе пуллулана изображен на рис. 4.6.

Общая стратегия синтеза полимерных наночастиц на основе дипептидных и трипептидных сополимеров была предложена Вули с соавторами [94]. Они соединяли пептид тритрптин, обладающий антимикробной активностью, с макроинициаторами для естественной радикальной полимеризации на твердой резине. Далее происходила радикальная полимеризация с участием нитроксида

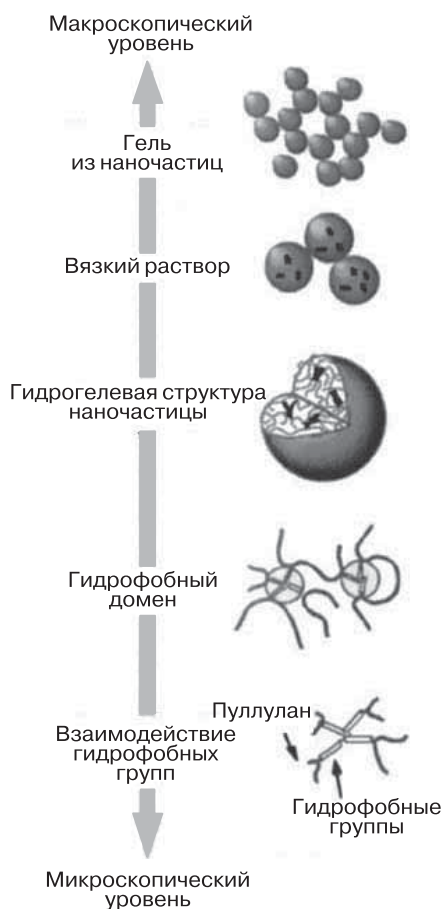
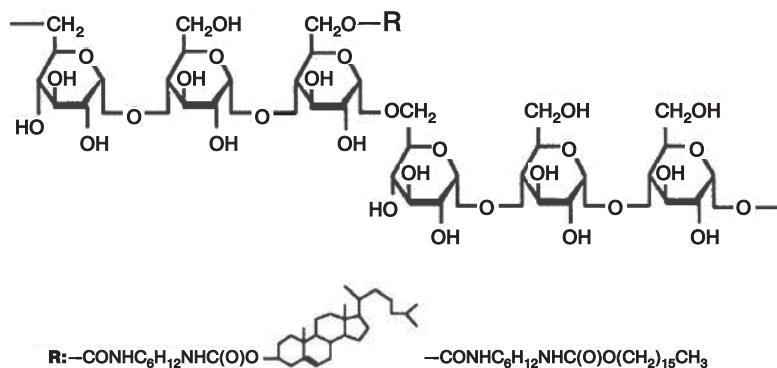


Рис. 4.6. Химическая структура и процесс самопроизвольной сборки модифицированного пуллулана. Воспроизводится в соответствии с работой [93] с разрешения авторов

и радикальная полимеризация с переносом атома, в результате чего на твердой подложке образовались полимерные акриламидные цепи с функциональными группами тритрптитина на концах. После отщепления от поверхности резины эти содержащие пептид блок-сополимеры самопроизвольно образовывали мицеллярные наночастицы. Дополнительную устойчивость таким мицеллам придавали перекрестные сшивки, вводимые с помощью карбодиимида. Мицеллы обладали антимикробным действием, что говорит о сохранении пептидом биологической активности и биодоступности после конъюгации и образования наночастиц. В той же исследовательской группе методом радикальной полимеризации с переносом атома с использованием макроинициатора, связанного с антигеном, был получен амфифильный диблок-сополимер, обладающий антигенной активностью [95].

4.3. Биоконъюгированные гидрогели в нанотехнологии

Описанные в предыдущем разделе методы синтеза позволили расширить применение гидрогелевых нано- и микрочастиц для решения сложных биотехнологических и нанотехнологических задач. Мы рассмотрим некоторые из них, уделяя особое внимание применению наносистем на основе сложных гидрогелей.

4.3.1. Доставка лекарств и генов

В последнее время активно ведется работа по созданию коллоидных носителей лекарственных препаратов. Считается, что целенаправленный перенос лекарства к определенному участку организма с помощью специфического носителя повышает терапевтическую эффективность препарата, а также снижает системное побочное действие. Идеальный носитель способен доставлять лекарство в ткань-мишень, не вызывать иммунного ответа и разлагаться, не образуя токсичных продуктов [96].

Среди носителей-частиц наиболее изученными являются липосомы и полимерные наночастицы. Липосомные носители исследуются очень широко, причем несколько их видов уже имеются в продаже, а многие готовятся к выпуску. Один из серьезных недостатков липосомных носителей — текучесть. Поскольку липосома ограничена лишь двойным липидным слоем, эффективной доставке содержимого может препятствовать пассивная диффузия вещества через эту границу [97]. Среди полимерных частиц наиболее изученными являются сополимеры молочной и гликолевой кислот (ПМГК) [98]. Преимущество этих материалов заключается в низкой токсичности продуктов деградации, которые удаляются из организма через почки. Однако такая система обладает множеством недостатков, поскольку у описываемых полимеров есть выраженные гидрофобные и иммуногенные свойства, а продукты их деградации имеют кислую реакцию. Повышение кислотности при разложении полимеров вызывает неспецифическую воспалительную реакцию, что может полностью обесценить все преимущества системы. В качестве более безопасной альтернативы вирусным

векторам были предложены невирусные системы доставки генетического материала, которые в меньшей степени индуцируют иммунный ответ. Для невирусной доставки генов использовались катионные полимеры, например полиэтиленмин, полиамидоамин и полилизин, однако ни один из них не обладал достаточной биосовместимостью, необходимой для использования в условиях *in vivo* [99]. Напротив, гидрогелевые наночастицы, возможно, окажутся пригодными для доставки лекарств и генов в организме, однако изучены такие системы гораздо хуже. Рассмотрим несколько примеров использования гидрогелевых наночастиц в качестве носителей.

С целью создания носителей из биоразлагаемых полимеров Ким с сотрудниками предложили в качестве основного компонента модифицированный глицидилметакрилатом декстран, а в качестве перекрестной сшивки — полиэтиленгликольдиметакрилат [100]. Частицы готовили методом свободнорадикальной полимеризации, а затем заполняли гидрофобным препаратом клоназепамом. Оказалось, что скорость его высвобождения зависит от pH и концентрации фермента декстраназы, расщепляющего декстран и разрушающего частицы. В другой работе На и Бае применили самоорганизующиеся гидрогелевые частицы из ацетилированного пуллулана, конъюгированного с сульфонамидом, для изучения высвобождения адриамицина [101]. В этом случае полимер оказался чувствительным к изменениям pH, что заставляло частицы сжиматься и агрегировать при $\text{pH} < 7$. Сжатие частиц вызывало выход лекарства в окружающую среду.

Пеппас с соавторами использовали гидрогели в качестве носителей для доставки инсулина. Синтез гидрогелей проводили из метакриловой кислоты и этиленгликоля методом свободнорадикальной полимеризации, инициированной ультрафиолетовым излучением [102]. Затем получали конъюгат инсулина и белка трансферрина, и вводили этот комплекс в гидрогель. Необходимость конъюгации инсулина с трансферрином объясняется способностью конъюгата проникать через кишечный эпителий. Пеппас с соавторами предложили использовать этот комплекс для перорального приема инсулина, поскольку он менее подвержен протеолитическому расщеплению. Перед конъюгацией проводили реакцию инсулина с диметилмалеиновым ангидридом, а трансферрин вводили с помощью сукцинимидил 3-(2-пиридилдитио)пропионата. Затем два продукта реакций взаимодействовали между собой, образуя конъюгат инсулина и трансферрина. Исследования показали, что эффективность переноса конъюгата инсулина в составе гидрогелевых частиц через монослой клеток Caco-2 в 22 раза превосходит эффективность переноса свободного инсулина.

Приведенные примеры иллюстрируют возможность контроля выхода препарата из гидрогелевых частиц в условиях *ex vivo*, однако уже известны случаи их применения в системах *in vivo*. Например, Хсиу с сотрудниками использовали наночастицы N-изопропилакриламида для доставки лекарств при лечении глаз [103]. Были опробованы два подхода. В одном случае применяли раствор линейного полимера, в другом — смесь линейного полимера и полимерных частиц. Изучали высвобождение адреналина в глазу кролика, а также оказываемое пре-

паратом цитотоксическое действие. Понижающий внутриглазное давление адреналин вводили в глаз с помощью двух указанных систем. Оказалось, что длительность действия системы с линейным полимером составляет около 24 ч, а смешанная система позволяет продлить действие лекарства до ~32 ч. Следовательно, подобные системы могут представлять интерес для лечения глаукомы.

Как было сказано выше, идеальный носитель не должен вызывать иммунного ответа со стороны организма хозяина. Поэтому поверхность полимерных частиц обычно делают гидрофильной, что снижает вероятность опсонизации (т. е. фагоцитоза, усиленного адгезией) макрофагами [104]. Например, Гаур с сотрудниками синтезировали гидрогелевые наночастицы (диаметром ~100 нм) из перекрестно-сшитого поливинилпирролидона [105]. Гидрофобизации поверхности частиц добивались путем присоединения полоксамеров и полоксаминов, которые представляют собой блок-сополимеры полиэтиленгликоля и полипропиленгликоля. Эксперименты на мышах *in vivo* показали, что макрофаги в печени удерживали менее 1% введенной дозы препарата, и даже через 8 ч после введения в крови циркулировало от 5 до 10% частиц. Продление времени циркуляции и отсутствие накопления в печени указывают на потенциальную возможность применения подобных частиц для доставки лекарств. Авторы статьи также указывали, что увеличение размера частиц и повышение гидрофобности усиливало их захват ретикулоэндотелиальной системой, поскольку оба фактора могут играть определенную роль в способности организма к распознаванию частиц в качестве чужеродного материала.

Важнейшим свойством носителя является обеспечение направленной доставки препарата. Активный транспорт в принципе позволяет усилить захват и удержание наночастиц в определенном участке организма. Нами были синтезированы микрогелевые частицы со структурой «ядро–оболочка», состоящие из N-изопропилакриламида с присоединенными остатками фолиевой кислоты, которые активно движутся к опухолевым клеткам [106]. Фолиевая кислота является удобным лигандом для связывания таких клеток, поскольку многие опухоли отличаются повышенным уровнем экспрессии рецепторов фолата. Мы синтезировали гидрогелевые частицы, в которых ядро из N-изопропилакриламида имело флуоресцентную метку, а оболочка из N-изопропилакриламида содержала небольшую долю сомономера, несущего первичные аминогруппы. Далее было проведено ковалентное связывание фолиевой кислоты и аминогрупп оболочки, что позволило локализовать лиганд на поверхности частиц. При их инкубации с раковыми клетками, где происходила повышенная экспрессия рецептора фолата, наблюдался эндоцитоз гидрогелевых наночастиц, опосредованный этим рецептором (рис. 4.7, см. цв. вклейку). Также выяснилось, что при температуре выше температуры фазового перехода частицы обладали цитотоксическим действием. Точная причина этого явления неясна. Возможно, происходит агрегация клеток и адсорбция белка на сжатых гидрофобных частицах N-изопропилакриламида. По-видимому, они сохраняют термочувствительность в цитозоле, поэтому их удастся использовать для направленной терморегулируемой доставки химиотерапевтических препаратов.

Еще одним примером активного транспорта может служить перенос микрогелей N-изопропилакриламида к клеткам печени [107]. В этой работе Чой с соавторами использовали микрогели из сополимера N-изопропилакриламида и акриловой кислоты, меченные флуоресцеином, связывая их через остаток галактозы, являющейся лигандом асиалогликопротеинов. Галактозилированные микрогели интернализировались клетками путем взаимодействия между лигандом и рецептором. Более того, поскольку данные частицы являются термочувствительными, был проведен анализ зависимости их захвата от температуры. Эффективность захвата повышалась с ростом температуры, что объясняли облегчением захвата мелких частиц, хотя повышение гидрофобности также могло усиливать захват. Группа под руководством Вули изучала SCK с фолиевой кислотой, интегринами и пептидами [108–110]. Было показано, что наночастицы, несущие короткий пептид, принадлежащий к домену белковой трансдукции ВИЧ, обладали способностью связываться с клетками линий СНО и HeLa*.

В работе Кумачевой с соавторами описана структура другого гидрогеля, который можно использовать для доставки препаратов к опухолевым клеткам [111]. В этом случае использовали гидрогелевые частицы из сополимера N-изопропилакриламида и акриловой кислоты с диаметром 150 нм. Частицы конъюгировали с трансферрином с помощью карбодиимида. Затем конъюгаты смешивали с клетками HeLa. Рецепторы трансферрина на поверхности таких клеток опосредовали эндоцитоз наночастиц. В одном случае частицы были заполнены родамином 6G (R6G), а в другом — доксорубицином. Анализировали захват и высвобождение препаратов. Конъюгированные с трансферрином частицы доставляли к клеткам в 100 раз больше R6G, чем обычные микрогели, а гибель клеток от доксорубицина для конъюгатов значительно превышала тот же показатель для обычных микрогелей, наполненных доксорубицином ($72,6 \pm 5,0\%$ по сравнению с $33,8 \pm 2,8\%$).

Также описаны комбинированные синтетические вирусные системы доставки. Например, Яна с соавторами готовили наночастицы из поливинилпирролидона и включали их в реконструированную оболочку вируса *Sendai*, содержащую исключительно белки слияния [112]. Эти частицы инкубировали с клетками гепатобластомы человека, что приводило к интернализации полимерных частиц, подтвержденной флуоресцентным методом. В другой работе использована способность частиц из полисахарида курдлана к самопроизвольной сборке [113]. Курдлан подвергали гидрофобной модификации путем введения остатков карбоксилированной сульфонилмочевины. Лигандом для связывания служила лактобионовая кислота, взаимодействующая с клетками HepG2. Как и ожидалось, степень ненаправленного захвата значительно уступала степени захвата частиц со специфическим лигандом для клеток HepG2.

* HeLa — клеточная линия человеческих опухолевых клеток, которая широко используется для исследований.

Для доставки генов многие исследователи пытаются использовать катионные полимеры, например, хитозан. Хитозан — природный катионный полисахарид, состоящий из *D*-глюкозамина и *N*-ацетил-*D*-глюкозамина. Он отличается биосовместимостью, низкой иммуногенностью и способностью разлагаться в условиях биологической системы, что делает его предполагаемым кандидатом на роль носителя. В присутствии полианионов хитозан может образовывать гидрогелевые наночастицы за счет комплексной коацервации*. Например, была изучена возможность применения наночастиц хитозана с ДНК для доставки генов. Мао с соавторами синтезировали наночастицы хитозана с ДНК и исследовали эффективность трансфекции [99]. Кроме того, эти частицы были конъюгированы с трансферрином, что повышало эффективность интернализации, а внутрь частиц включали лекарственные препараты, например хлорохин, и анализировали высвобождение лекарства. Митра с соавторами использовали хитозан в качестве оболочки для включения доксорубина, являющегося очень токсичным химиотерапевтическим препаратом [114]. Для образования капсул сначала производили конъюгацию доксорубина с декстраном. При смешивании с хитозаном этот конъюгат легко образовывал частицы. Эксперименты *in vivo* показали, что конъюгат хитозана с лекарством циркулировал в крови дольше, чем свободное лекарство; кроме того, под действием конъюгата размер опухоли уменьшался в большей степени, чем от свободного лекарства.

Исследуя возможность применения биоконъюгатов наночастиц из мягких полимеров для доставки лекарственных препаратов *in vivo*, Ланжер с соавторами использовали биосовместимый и биоразлагаемый блок-сополимер поли(*D,L*-молочной и гликолевой кислот) (ПМГК) с полиэтиленгликолем (ПЭГ) [115]. Сопolíмеры ПМГК и ПЭГ, имеющие концевые карбоксильные группы, образовывали наночастицы в присутствии противоракового препарата доцетаксела, в результате чего лекарство оказывалось включенным в наночастицы. Для направленного транспорта к опухолевым клеткам к концевым карбоксильным группам на поверхности наночастиц с помощью карбодиимида присоединяли олигонуклеотидные фрагменты РНК (аптамеры), специфичные по отношению к мембранному антигену простаты (PSMA), экспрессирующемуся на поверхности клеток опухоли простаты линии LNCaP. Эксперименты на животных показали, что наночастицы со связанными аптамерами приводили к полному сжатию опухоли после однократного введения в нее максимальной переносимой дозы внутривенно вводимого доцетаксела (рис. 4.8). Для синтеза наночастиц использовали разрешенные к применению материалы и технологии, что позволяет надеяться на возможность проведения клинических испытаний биоконъюгатов полимерных наночастиц для лечения раковых заболеваний. Дополнительными преимуществами для клинического использования являются малый размер частиц, легкость синтеза, относительная стабильность и иммуногенная природа лигандов.

* Коацервация (от лат. *coacervatio* — собирание, накапливание) — расслоение коллоидной системы с образованием коллоидных скоплений (коацерватов) в виде отдельных жидких слоев или капель. — *Прим. перев.*

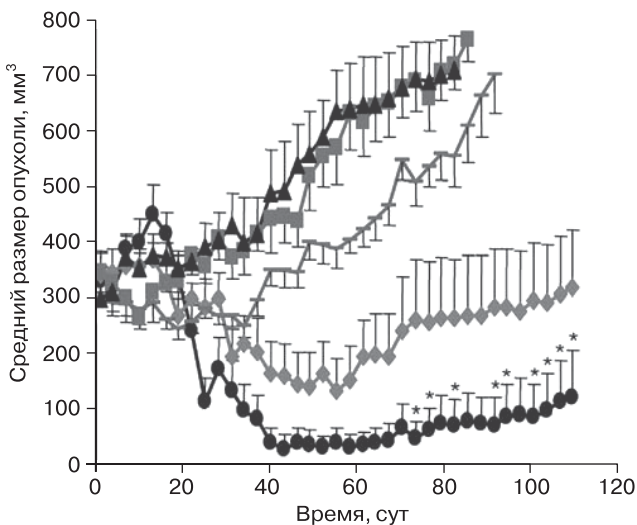


Рис. 4.8. Изменение размеров опухоли после однократного введения препарата непосредственно внутрь опухоли: солевого раствора (▲); ПМГК/ПЭГ без препарата (■); эмульсия доцетаксела (—); доцетаксел в капсулах ПМГК/ПЭГ (◆); доцетаксел в капсулах МПГК/ПЭГ с аптамерами (●). Звездочкой (*) обозначены результаты, отличие которых от остальных было статистически достоверным. Воспроизводится в соответствии с работой [115] с согласия авторов

4.3.2. Аналитическое применение

С учетом возможности создания различных чувствительных гидрогелевых структур, возникает значительный интерес к их применению в химических и биологических сенсорных системах. Одним из первых примеров применения гидрогелевых наночастиц для использования в качестве сенсоров были рН-чувствительные частицы. Простейший метод создания таких сенсоров заключается в использовании рН-чувствительной группы, например слабой кислоты, которую можно включить в полимерную сеть. При низком значении рН кислотные группы протонированы и частицы существуют в конденсированной форме, а при повышении рН, происходит депротонирование кислотных групп, частицы начинают набухать в результате кулоновского отталкивания отрицательно заряженных групп и изменения свободной энергии смешивания с водой. Аналогичным образом, заряженные микрогели реагируют на изменение ионной силы, поскольку противоположно заряженные ионы нейтрализуют заряд геля и заставляют его сжиматься. Тот же подход использовался для приготовления рН-чувствительных мицелл из блок-сополимеров с перекрестными сшивками. Кажется, что этот общий принцип пригоден и для синтеза гидрогелевых наночастиц, «чувствующих» свое окружение, впрочем, лишь небольшое количество работ было посвящено

созданию таких частиц в качестве химических сенсоров. Однако в последнее время подобные работы начинают появляться. Например, наша исследовательская группа показала, что гидрогелевые наночастицы могут реагировать на связывание белка при условии, что это взаимодействие является поливалентным и, следовательно, приводит к повышению плотности перекрестных сшивок микрогеля [30]. Такой подход был применен для создания обратимых биосенсоров, действие которых основано или на взаимодействии антигенов и антител, или на конкурентном связывании. Сначала мы инкубировали антигенсодержащие микрогели с антителами, которые реагировали с поверхностью микрогеля. Такие гели также содержали фотоаффинную метку (бензофенон), которую можно активировать светом, способствуя присоединению антител к микрогелю. Перекрестные сшивки, образующиеся в результате соединения антигенов и антител, могут быть устранены путем добавления свободного антигена, который разрушает сшивки и заставляет гель набухать. Этот метод был совмещен с технологией получения микролинз, что позволило быстро регистрировать ответ сенсорного устройства без использования метки [116].

Кроме того, микрогели использовались для выделения белков из сложных смесей. Кавагучи с соавторами сообщали о возможности разделения белков с помощью термочувствительных микрогелей [117]. Они создавали регулярные микрогели из N-изопропилакриламида и обнаружили, что при температуре выше температуры фазового перехода с частицами связано больше белка, чем при температуре ниже этого значения. Более высокое содержание белка объясняли гидрофобными взаимодействиями между белком и дегидратированным полимером. Элайссари с соавторами применили подход, основанный на кулоновском взаимодействии. Они использовали положительно заряженные микрогели на основе N-изопропилакриламида для экстракции РНК. Взаимодействие между катионными частицами и отрицательно заряженной РНК ослабевает при повышении pH, ионной силы и температуры, что указывает на ведущую роль электростатических сил [118]. Кондо с соавторами провели разделение белков, используя иммунологический подход. Они синтезировали микрогели, состоящие из стирола/N-изопропилакриламида/глицидилметакрилата. При повышении температуры и ионной силы полимеры образовывали флокулы. Через остатки глицидилметакрилата к частицам пришивали молекулы бычьего сывороточного альбумина (БСА) и затем использовали для выделения антител против БСА из сыворотки. После инкубации с сывороткой частицы отделяли, учитывая их способность к флокуляции [119]. Эта же исследовательская группа применяла для разделения и очистки полимеры, содержащие магнетит; отделение частиц происходило под действием магнитного поля [120].

Гидрогелевые наночастицы также использовались для создания молекулярно-импринтированных полимеров (МИП). Принцип действия МИП основан на распознавании формы молекул. Полимеризацию проводили в присутствии молекул-матриц, вокруг которых и происходило образование полимерных частиц. После удаления матрицы образовывалась полость такого размера и формы, в которую укладывалась именно эта молекула. С помощью подобной системы

можно связывать и определять молекулы или родственные им соединения в сложных смесях. Йе с соавторами синтезировали гидрогелевые наночастицы в присутствии теофиллина и 17β -эстрадиола. Чувствительные молекулы растворяли в смеси метакриловой кислоты и триметилпропантриметакрилата, а затем вызывали полимеризацию под действием тепла или ультрафиолетового излучения. Для определения чувствительности и селективности связывания анализируемого вещества изучали связывание лиганда с радиоактивной меткой [121]. Эксперименты в условиях конкурентного связывания выявили высокий уровень селективности по отношению к анализируемому веществу.

Донерт с соавторами показали, каким образом можно использовать биологический процесс для слежения за реакцией гидрогелей [122]. В структуру геля включали биологическую систему распознавания; в ответ на действие внешних сигналов в системе происходили конформационные изменения, которые, в свою очередь, приводили к изменению объема гидрогеля. Белок кальмодулин (КМ) претерпевает различные конформационные превращения: при связывании ионов Ca^{2+} принимает форму гантелей, а при взаимодействии с некоторыми пептидами и лекарствами, например с фенотиазинами, переходит в более сжатую форму. Кальмодулин включали в гидрогель путем создания генно-инженерного белка, с остатком цистеина на С-конце, который затем связывали с аллиламином для достижения необходимой ориентации белка в сети гидрогеля. Чтобы включить в полимерную сеть фенотиазин, синтезировали его производное, содержащее акрилатную группу. Свободнорадикальная полимеризация белка и лекарства (акриламидный мономер) с перекрестной сшивкой (бис-акриламид) приводила к образованию гидрогеля с желаемой структурой. Он обратимо сжимался и набухал в зависимости от концентрации Ca^{2+} в системе. При насыщении гидрогеля ионами Ca^{2+} в КМ происходили конформационные изменения, в результате которых участок связывания фенотиазина становился доступным для иммобилизованного лекарства; в результате взаимодействия возникали дополнительные перекрестные сшивки и гель сжимался. При удалении ионов Ca^{2+} гель вновь набухал, во-первых, потому что производное лекарства исчезало из участка взаимодействия, и, во-вторых, из-за того, что способность полимера реагировать с водой изменялась в результате модификации гидрофобной поверхности белка. Кроме этого, оказалось, что данный гидрогель откликался и на концентрацию фенотиазинов. При обработке свободным фенотиозином (хлорпромазином) гель набухал, что было вызвано конкурентным связыванием свободного лекарства, вытесняющего иммобилизованный препарат из участка взаимодействия с конъюгированным КМ. Подобные гидрогелевые биоматериалы, содержащие белки или лекарства, могут быть полезны для создания микроактуаторов и микроструйной техники.

Мията с соавторами продемонстрировали свойства гелей, реагирующих на присутствие опухолевых маркеров [123]. Гели готовили методом молекулярного импринтинга (рис. 4.9). В этом случае получали структуры, реагирующие на специфический опухолевый маркер альфа-фетопротеин (АФП) — гликопротеин, использующийся для диагностики первичного рака печени по анализу

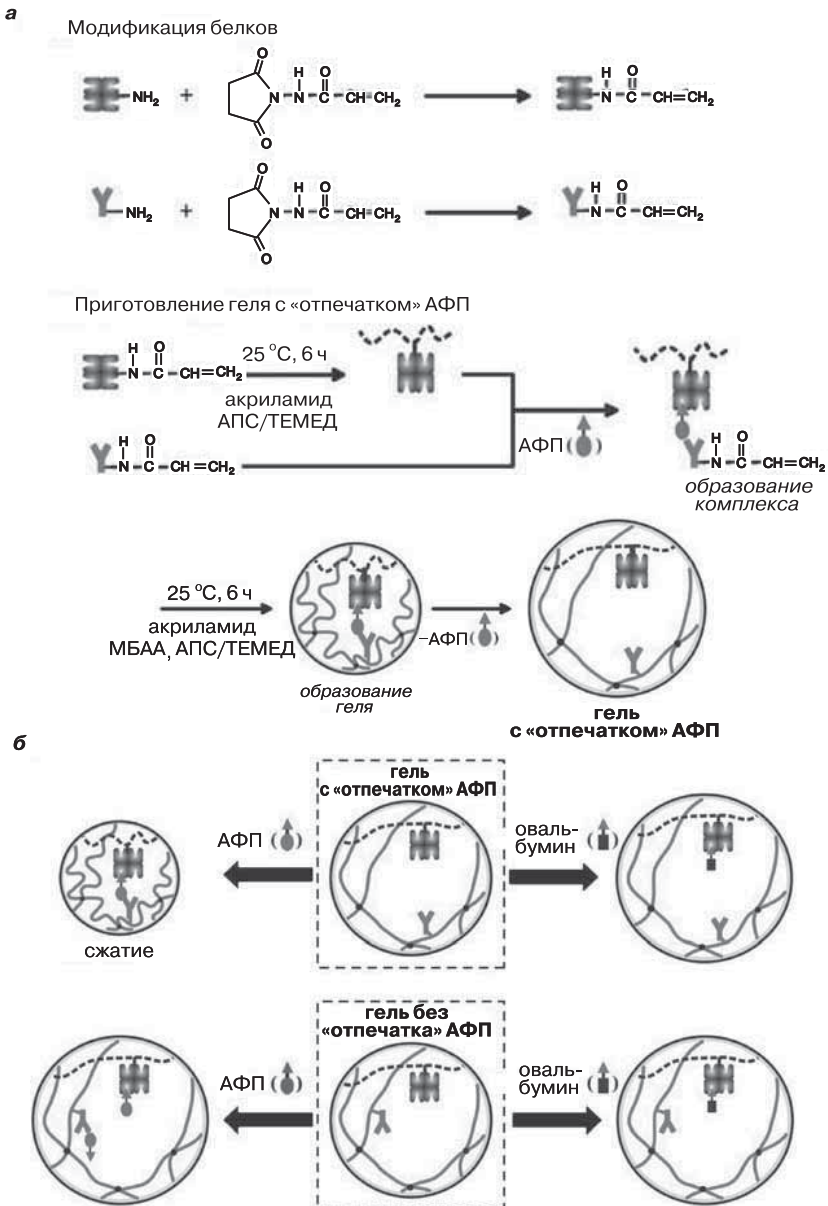


Рис. 4.9. Схема приготовления гидрогеля, реагирующего на присутствие в среде опухолевого маркера: *а* — синтез чувствительного гидрогеля; *б* — демонстрация поведения геля в присутствии опухолевого маркера. Воспроизводится в соответствии с работой [123] с разрешения авторов

сыворотки крови. Лектин (конконавалин А) и поликлональные антитела против АФП конъюгировали с N-сукцинимидилакрилатом для образования способных к полимеризации винильных групп; гель возникал за счет сополимеризации таких групп с акриламидом в присутствии матрицы АФП. В результате образовывался комплекс лектин–АФП–антитело, а после удаления АФП оставался импринтированный гель (гель с отпечатком АФП). Оказалось, что он сжимается в присутствии АФП, поскольку образование комплекса лектин–АФП–антитело приводит к образованию перекрестных сшивок. Неимпринтированные гели слабо разбухали в растворе АФП. Кроме того, было показано, что этот гель специфичен к гликопротеину: в растворе овальбумина гель не сжимался, а набухал.

4.3.3. Биоматериалы

Возможно, самое общее определение биоматериалов было сформулировано на согласительной конференции Национальных институтов здравоохранения США. В этом определении под биоматериалом понимается «любое вещество (кроме лекарства) или комбинация веществ, имеющих природное или синтетическое происхождение, которое может использоваться на протяжении любого промежутка времени в качестве целой системы или ее части, предназначенное для лечения, увеличения или замены определенной ткани, органа или функции организма» [124]. Исследования в области биоматериалов часто связаны с поиском биосовместимых систем с целью создания имплантатов или хирургических инструментов, которые бы в меньшей степени повреждали организм. Многочисленные работы посвящены синтезу гидрогелей для покрытия поверхностей имплантатов или инструментов. С появлением чувствительных гидрогелей многие исследователи начали работать над созданием «умных» биоматериалов, способных чувствовать изменения в окружающей среде и реагировать на них заданным образом. В этом разделе мы рассмотрим некоторые примеры такого применения, обращая особое внимание на гидрогелевые наночастицы.

Как упоминалось выше, Кавагучи с соавторами детально изучали взаимодействия микрогелей с белками [117, 125, 126]. Например, они исследовали влияние температуры на неспецифическую адсорбцию белков на термочувствительных микрогелях. Еще была исследована активность ферментов, ковалентно связанных с микрогелями, в частности трипсина и пероксидазы с микрогелями из N-изопропилакриламида и изучена активность ферментов как функция температуры [127]. Ферментативная активность снижалась с повышением температуры, поскольку уменьшались размеры пор геля. Это приводило к падению скорости диффузии субстрата к ферменту. В аналогичной системе использовали частицы геля с присоединенной небольшой молекулой убихинона; в этом случае наблюдалась похожая температурная зависимость. Другая исследовательская группа изучала адсорбцию белка р24, входящего в состав капсида ВИЧ-1, на полимерных частицах, чье ядро состояло из полистирола, а оболочка

ка — из N-изопропилакриламида [128]. Как и предполагалось на основании более ранних экспериментов, происходило усиление адсорбции при температуре выше температуры фазового перехода для N-изопропилакриламида; это связано с гидрофобными взаимодействиями. В аналогичном исследовании изучали фагоцитоз частиц из сополимера стирола с акриламидом как функцию гидрофобности. Выяснилось: фагоцитоз гранулоцитами усиливался с повышением содержания полистирола, что опять же связывали с усилением гидрофобных взаимодействий с гранулоцитами [129]. Кимхи и Бьянко-Пелед рассматривали зависимость адсорбции малых молекул (аспарагиновой кислоты и валина) на микрогелях N-изопропилакриламида как функцию температуры; с этой целью они использовали метод изотермической титрационной калориметрии [130]. Выяснилось, что аспарагиновая кислота прочно связывается с полимерными частицами при 25 °С за счет образования водородных связей, а валин активно взаимодействует при 37 °С за счет гидрофобных сил.

Создаются и более сложные системы, использующие преимущества биологических катализаторов. Например, Огава с соавторами синтезировали микрогели N-изопропилакриламида, содержащие в боковой цепи остатки винилимидазола, которые способны набухать и сжиматься при изменении pH [28]. Методом физической иммобилизации в гель включали уреазу, катализирующую гидролиз мочевины до аммиака и CO₂. По мере протекания гидролиза pH среды повышался. Следовательно, в присутствии мочевины полимерные частицы сжимались из-за повышения pH и депротонирования имидазольной группы. При удалении субстрата частицы набухали до исходного размера, поскольку локальное значение pH выравнивалось со значением pH в толще раствора. Для демонстрации потенциальной применимости подобной биомеханической системы авторы работы включили полимерные частицы в мембрану. В один из резервуаров вносили мочевины, и при набухании полимерных частиц проницаемость мембраны повышалась.

Важным свойством многих имплантатов на основе биоматериалов является способность клеток адсорбироваться и пролиферировать на их поверхности. Понятно, что даже материалы с низкой поверхностной энергией и, следовательно, со слабой способностью к неспецифическому связыванию белка в клеточной культуре или после имплантации с течением времени начинают загрязняться. Следовательно, необходимо проанализировать процесс заражения биоматериалов и выработать новые стратегии для контроля адсорбции клеток на синтетических поверхностях. Поэтому кроме упомянутого выше анализа адсорбции белка Кавагучи с сотрудниками также изучили связывание клеток с термочувствительными частицами [117]. Сначала они поместили микросферы N-изопропилакриламида на подложку для получения двумерного чипа, сквозь который пропускали культуральную среду. При 37 °С клетки производили больше активных соединений кислорода, чем при 25 °С. Это означало, что при повышенной температуре они находились в условиях более сильного механического стресса. Кроме того, при нагревании от 25 до 37 °С образование активных соединений кислорода происходило более успешно, чем просто при инку-

бации при 37 °С. Авторы работы объяснили это реакцией на динамический процесс сжатия. Для изучения влияния механического стресса на клетки они применили еще одну систему, основанную на взаимодействии рецепторов с лигандами [117]. В нашей группе были созданы частицы со сниженной способностью связывать белок, что достигалось с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) [131]. Мы использовали частицы с ядром и оболочкой из N-изопропилакриламида, присоединяя ПЭГ либо к ядру, либо к оболочке с помощью сополимеризации ПЭГамонометакрилата. Ослабление адсорбции белка наблюдалось при введении ПЭГ как в ядро, так и в оболочку частиц. Методом ЯМР и анализом адсорбции белка было показано, что при повышении температуры фаза цепочек ПЭГ отделяется от поверхности частиц и гидрофильность полимера ослабляет адсорбцию белка. Для частиц, содержащих ПЭГ в ядре, цепочки ПЭГ способны проникать сквозь оболочку, снижая поверхностную энергию сжатых частиц.

Создание материалов, способных взаимодействовать с клетками и белками, играет важную роль в разработке приспособлений для введения лекарственных препаратов и имитации внеклеточного матрикса. В литературе описаны гидрогели, реагирующие на присутствие протеаз. Например, Мур с коллегами создали гидрогелевые частицы, разлагаемые α -химотрипсином [132]. Техника получения конъюгатов основана на реакции переноса дисульфидных групп в кислых условиях, которая позволяет синтезировать перекрестные сшивки, содержащие пептидные последовательности. Метакриламид с чувствительной к химотрипсину последовательностью (СУКС) включали в полиакриламидные гидрогели. Гидрогели с СУКС в качестве перекрестной сшивки полностью разрушались за 20 мин в присутствии химотрипсина, тогда как гидрогели с нечувствительными к химотрипсину перекрестными сшивками (CSKC) оставались целыми (рис. 4.10). Ким и Хили также синтезировали гели N-изопропилакриламида с пептидными перекрестными сшивками. Такие гели можно использовать для имитации внеклеточного матрикса; пептид расщепляется металлопротеиназой, что постепенно приводит к эрозии геля. Схематично данный процесс представлен на рис. 4.11 [133].

В качестве еще одного примера частиц со структурой типа «ядро–оболочка», потенциально пригодных для использования в качестве биоматериала, приведем созданную нами систему, в которой оболочка служит границей между белком и раствором, а лиганд сосредоточен в ядре [134]. Мы синтезировали ядро, к которому присоединили молекулы биотина, а затем заключили все в оболочку, содержащую разлагаемые перекрестные сшивки. Сначала плотность перекрестных сшивок достаточно высока, так что размер пор геля меньше размера молекул белка авидина. По мере разложения перекрестных сшивок средний размер пор увеличивался, что позволяло авидину достичь ядра, где он связывался с биотином (рис. 4.12). Анализ зависимости проницаемости оболочки от размера молекул белка показал, что чем крупнее белок, тем большее число перекрестных сшивок должно расщепиться для связывания в ядре. Представляет интерес топология подобных систем; кроме того, они могут служить

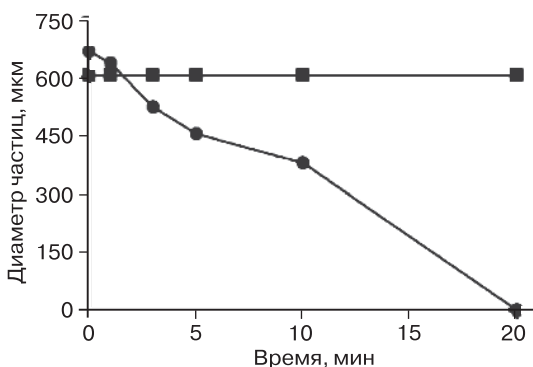


Рис. 4.10. Изменение диаметра гидрогелей с СУКС (●) и CSKC (■) в качестве перекрестных сшивок в присутствии 0,5 мг/мл α -химотрипсина. Тирозинсодержащие гидрогели разлагались за 20 мин, тогда как серинсодержащие гидрогели не разлагались. Воспроизводится в соответствии с работой [132] с разрешения авторов

моделью частиц с функциональной оболочкой, реагирующей на тот или иной биологический или химический сигнал, который разрушает стабилизирующие ее перекрестные сшивки.

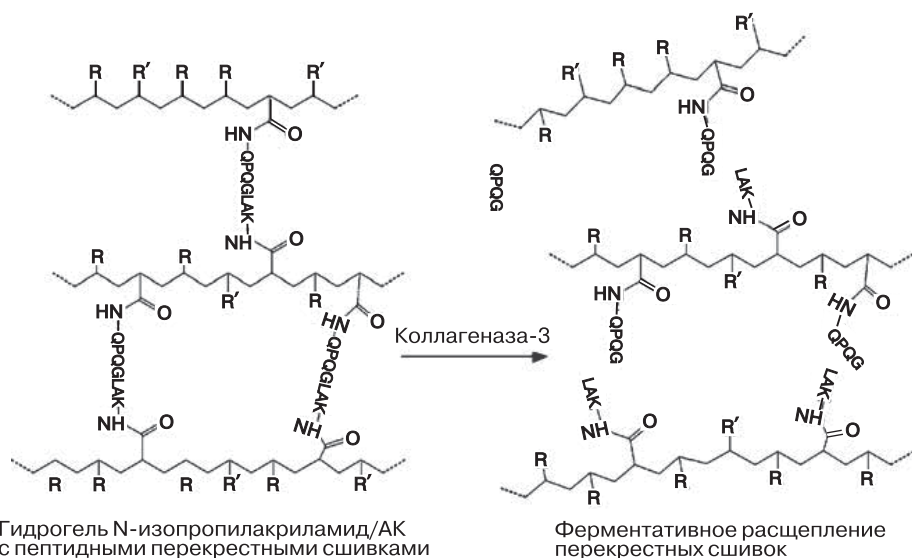


Рис. 4.11. Разрушение гидрогеля с пептидными перекрестными сшивками под действием матриксной металлопротеиназы 13 (коллагеназы-3). Аминокислоты (АК) обозначены с помощью однобуквенного кода. Воспроизводится из [133] с разрешения авторов

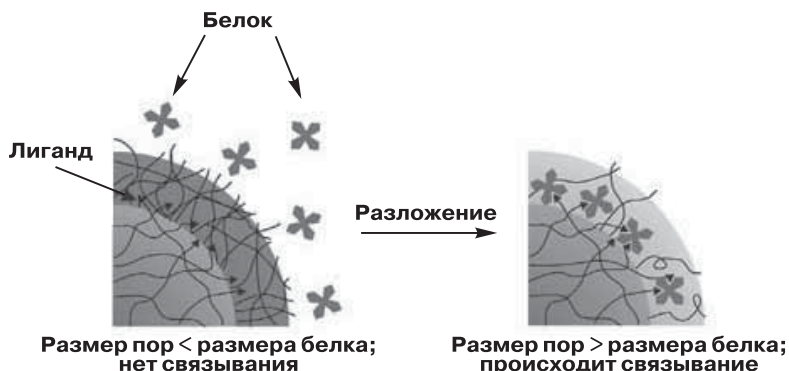


Рис. 4.12. Схема проницаемых микрогелей со структурой типа «ядро–оболочка». Проницаемость оболочки для белка зависит от плотности перекрестных сшивок. Воспроизводится в соответствии с работой [134] с разрешения авторов

4.4. Заключение

В конце XX столетия считалось, что нанотехнологии могут задействовать исключительно «твердые материалы», однако в последнее время мнение изменилось, и в этой области все шире начинают применяться полимерные материалы. В данной главе мы рассмотрели различные типы гидрогелевых наночастиц и возможности их применения. Число исследовательских работ в этой области постоянно растет, и становится ясно, что подобные материалы могут оказаться полезными как сами по себе, так и в качестве мостика, соединяющего традиционные наноструктуры с биологическими системами. Например, чувствительные к внешним сигналам гели могут найти применение в качестве биочувствительных структур, позволяющих запрограммированно управлять биологическими системами.

Над этими проблемами работает много научных групп, но нам кажется, что большая часть потенциальных ресурсов подобных систем еще не исследована. Для синтеза сложных гидрогелевых наноструктур существуют новые возможности, связанные как с синтезом коллоидных систем (например, с контролируемым размером и формой), так и с новыми методами лигирования для контролируемого синтеза биоконъюгатов. Подобные попытки рационального дизайна многофункциональных структур помогут расширить существующие возможности применения гидрогелей и открыть новые области их использования. Спектр таких потенциальных возможностей лишь начинает вырисовываться. Исследования в области взаимосвязи структуры и функции гидрогелевых частиц привели к созданию первых наноматериалов заданного назначения. Эти пионерские работы предоставляют новые данные, необходимые для планирования экспериментов по созданию материалов следующего поколения. В то же время возникает необходимость подробного изучения цитотоксичности, имму-

ногенности и фармакокинетических свойств подобных веществ с целью их применения в биотехнологии. И наконец, решение задач дизайна, синтеза и тестирования материалов для клинического использования (устройства для введения лекарств, имплантаты, биосенсоры и другие анализирующие системы, а также химиотерапевтические препараты направленного действия) потребует тесного сотрудничества химиков, биохимиков, инженеров и врачей.

Литература

1. Gehrke S.H. Synthesis, equilibrium swelling, kinetics, permeability and applications of environmentally responsive gels. *Adv. Polym. Sci.* 1993; 110: 82.
2. Hoffman A.S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 3–12.
3. Yeomans K. Hydrogels - very versatile materials. *Chem. Rev.* 2000; 10: 2–5.
4. Hennink W.E., van Nostrum C.F. Novel crosslinking methods to design hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 13–36.
5. Dusek K., Prins W. Structure and elasticity of non-crystalline polymer networks. *Fortschritte der Hochpolymeren-Forschung* 1969; 6: 1–102.
6. Li Y., Tanaka T. Study of the universality class of the gel network system. *J Chem. Phys.* 1989; 90: 5161–5166.
7. Li Y., Tanaka T. Kinetics of swelling and shrinking of gels. *J. Chem. Phys.* 1990; 92: 1365–1371.
8. Tanaka T. Kinetics of phase transition in polymer gels. *Physica A* 1986; 140A: 261–268.
9. Gan D., Lyon L.A. Tunable swelling kinetics in core-shell hydrogel nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 7511–7517.
10. Jones C.D., Lyon L.A. Synthesis and characterization of multiresponsive core-shell microgels. *Macromolecules* 2000; 33: 8301–8306.
11. Staudinger H., Husemann E. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* 1935; 68: 1618.
12. Pelton R.H. Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2000; 85: 1–33.
13. Saunders B.R., Vincent B. Microgel particles as model colloids: theory, properties and applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* 1999; 80: 1–25.
14. Tanaka T. Collapse of gels and the critical endpoint. *Phys. Rev. Lett.* 1978; 40: 820–823.
15. Dusek K., Patterson K. Transition on swollen polymer networks induced by intramolecular condensation. *Polym. Sci. Polym. Phys. Ed.* 1968; 6: 1209–1216.
16. Moselhy J., Wu X.Y., Nicholov R., Kodaria K. *In vitro* studies of the interaction of poly(NTPAM/MAA) nanoparticles with proteins and cells. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2000; 11: 123–147.
17. Duracher D., Sauzedde F., Elaissari A., Perrin A., Pichot C. Cationic amino-containing *n*-isopropylacrylamide—styrene copolymer latex particles: 1. Particle size and morphology vs. polymerization process. *Colloid Polym. Sci.* 1998; 276: 219–231.
18. Duracher D., Sauzedde F., Elaissari A., Pichot C., Nabzar L. Cationic amino-containing *n*-isopropyl-acrylamide-styrene copolymer particles: 2. Surface and colloidal characteristics. *Colloid Polym. Sci.* 1998; 276: 920–929.
19. Snowden M.J., Chowdhry B.Z., Vincent B., Morris G.E. Colloidal copolymer microgels of *n*-isopropylacrylamide and acrylic acid: pH, ionic strength and temperature effects. *J. Chem. Soc. Faraday Trans.* 1996; 92: 5013–5016.

20. Sershen S.R., Westcott S.L., Halas N.J., West J.L. Temperature-sensitive polymer-nanoshell composites for photothermally modulated drug delivery. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 51: 293–298.
21. Sershen S.R., Westcott S.L., Halas N.J., West J.L. Independent optically addressable nanoparticle-polymer optomechanical composites. *Appl. Phys. Lett.* 2002, 80: 4609–4611.
22. Sershen S.R., Westcott S.L., West J.L., Halas N.J. An opto-mechanical nanoshell-polymer composite. *Appl. Phys. B* 2001; 73: 379–381.
23. Suzuki A., Ishii T., Maruyama Y. Optical switching in polymer gels. *J. Appl. Phys.* 1996; 80: 131–136.
24. Suzuki A., Tanaka T. Phase-transition in polymer gels induced by visible-light. *Nature* 1990; 346: 345–347.
25. Tanaka T., Nishio I., Sun S.T., Ueno-Nishio S. Collapse of gels in an electric field. *Science* 1982; 218: 467–469.
26. Miyata T., Asami N., Uragami T. A reversibly antigen-responsive hydrogel. *Nature* 1999; 399: 766–769.
27. Ogawa K., Nakayama A., Kokufuta E. Preparation and characterization of thermo-sensitive polyampholyte nanogels. *Langmuir* 2003; 19: 3178–3184.
28. Ogawa K., Wang B., Kokufuta E. Enzyme-regulated microgel collapse for controlled membrane permeability. *Langmuir* 2001; 17: 4704–4707.
29. Ogawa Y., Ogawa K., Wang B., Kokufuta E. A biochemical-mechanical system consisting of polyampholyte gels with coimmobilized glucose oxidase and urease. *Langmuir* 2001; 17: 2670–2674.
30. Kim J., Nayak S., Lyon L.A. Bioresponsive hydrogel microlenses. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 9588–9592.
31. Schild H.G. Poly(*n*-isopropylacrylamide): experiment, theory and application. *Prog. Polym. Sci.* 1992; 17: 163–249.
32. Heskins M. and Guillet J.E. Solution properties of poly(*n*-isopropylacrylamide). *J. Macromol. Sci. Chem.* 1968; A2: 1441–1455.
33. Berndt I., Richtering W. Doubly temperature sensitive core-shell microgels. *Macromolecules* 2003; 36: 8780–8785.
34. Berndt I., Pedersen J.S., Richtering W. Structure of multiresponsive «intelligent» core-shell microgels. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 9372–9373.
35. Matsumoto A., Ikeda S., Harada A., Kataoka K. Glucose-responsive polymer bearing a novel phenylborate derivative as a glucose-sensing moiety operating at physiological pH conditions. *Biomacromolecules* 2003; 4: 1410–1416.
36. Duracher D., Elaissari A., Mallet F., Pichot C. Preparation of thermosensitive latexes by copolymerization of *n*-isopropylmethacrylamide with a chelating monomer. *Macromol. Symp.* 2000; 150: 297–303.
37. Duracher D., Elaissari A., Pichot C. Characterization of cross-linked poly(*n*-isopropylmethacrylamide) microgel latexes. *Colloid Polym. Sci.* 1999; 277: 905–913.
38. Duracher D., Elaissari A., Pichot C. Preparation of poly(*n*-isopropylmethacrylamide) latexes kinetic studies and characterization. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.* 1999; 37:1823–1837.
39. Pelton R. Temperature-sensitive aqueous microgels. *Adv. Colloid Interface Sci.* 2000; 85: 1–33.
40. Daly E., Saunders B.R. Temperature-dependent electrophoretic mobility and hydrodynamic radius measurements of poly(*n*-isopropylacrylamide) microgel particles: structural insights. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2000; 2: 3187–3193.

41. Ohshima H., et al. Electrophoretic mobility of latex-particles covered with temperature-sensitive hydrogel layers. *J. Colloid Interface Sci.* 1993; 159: 512–514.
42. Debord J.D., Lyon L.A. Thermoresponsive photonic crystals. *J. Phys. Chem. B* 2000; 104: 6327–6331.
43. Senff H., Richtering W. Temperature sensitive microgel suspensions colloidal phase behavior and rheology of soft spheres. *J. Chem. Phys.* 1999; 111: 1705–1711.
44. Hu Z., Lu X., Gao J. Hydrogel opals. *Adv. Mater.* 2001; 13: 1708–1712.
45. Hellweg T., Dewhurst C.D., Bruckner E., Kratz K., Eimer W. Colloidal crystals made of poly(*n*-isopropylacrylamide) microgel particles. *Colloid. Polym. Sci.* 2000; 278: 972–978.
46. Wu C., Zhou S. Volume phase transition of swollen gels: discontinuous or continuous? *Macromolecules* 1997; 30: 574–576.
47. Wu C., Zhou S. Light scattering study of spherical poly(*n*-isopropylacrylamide) microgels. *J. Macromol. Sci. Phys.* 1997; B36: 345–355.
48. Yi Y.D., Oh K.S., Bae Y.C. Phase transition of submicron sized *n*-alkylacrylamide-derivative copolymer particles: applicability of photon correlation spectroscopy. *Polymer* 1997; 38: 3471–3476.
49. Varga I., et al. Effect of cross-link density on the internal structure of poly(*n*-isopropylacrylamide) microgels. *J. Phys. Chem. B* 2001; 105: 9071–9076.
50. Gan D., Lyon L.A. Interfacial nonradiative energy transfer in responsive core-shell hydrogel nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 8203–8209.
51. Guillermo A., et al. NMR investigations into heterogeneous structures of thermosensitive microgel particles. *J. Polym. Sci Part B Polym. Phys.* 2000; 38: 889–898.
52. Saunders B.R. On the structure of poly(*n*-isopropylacrylamide) microgel particles. *Langmuir* 2004; 20: 3925–3932.
53. Woodward N.C., et al. Calorimetric investigation of the influence of cross-linker concentration on the volume phase transition of poly(*n*-isopropylacrylamide) colloidal microgels. *Langmuir* 2003; 19: 3202–3211.
54. Senff H., Richtering W. Influence of crosslink density on rheological properties of temperature-sensitive microgel suspensions. *Colloid Polym. Sci.* 2000; 278: 830–840.
55. Senff H., Richtering W., Norhausen C., Weiss A., Ballauff M. Rheology of a temperature sensitive core-shell latex. *Langmuir* 1999; 15: 102–106.
56. Meyer S., Richtering W. Influence of polymerization conditions on the structure of temperature-sensitive poly(*n*-isopropylacrylamide) microgels. *Macromolecules* 2005; 38: 1517–1519.
57. Stieger M., Richtering W., Pedersen J.S., Lindner P. Small-angle neutron scattering study of structural changes in temperature sensitive microgel colloids. *J. Chem. Phys.* 2004; 120: 6197–6206.
58. Wu X., Pelton R.H., Hamielec A.E., Woods D.R., McPhee W. The kinetics of poly(*n*-isopropylacrylamide) microgel latex formation. *Colloid Polym. Sci.* 1994; 272: 467–477.
59. Hoare T., Pelton R. Functional group distribution in carboxylic acid containing poly(*n*-isopropylacrylamide) microgels. *Langmuir* 2004; 20: 2123–2133.
60. Dingenouts N., et al. Analysis of thermosensitive core-shell colloids by small-angle neutron scattering including contrast variation. *Phys. Chem. Phys.* 2001; 3: 1169–1174.
61. Xiao X.C., Chu L.Y., Chen W.M., Wang S., Xie R. Preparation of submicrometer-sized monodispersed thermoresponsive core-shell hydrogel microspheres. *Langmuir* 2004; 20: 5247–5253.
62. Zha L., Zhang Y., Yang W., Fu S. Monodisperse temperature-sensitive micro-containers. *Adv. Mater.* 2002; 14: 1090–1092.

63. Kim J.H., Lee T.R. Thermo- and pH-responsive hydrogel-coated gold nanoparticles. *Chem. Mater.* 2004; 16: 3647–3651.
64. Jones C.D., Lyon L.A. Dependence of shell thickness on core compression in acrylic acid modified poly(*n*-isopropylacrylamide) core/shell microgels. *Langmuir* 2003; 19: 4544–4547.
65. Jones C.D., Lyon L.A. Shell-restricted swelling and core compression in poly(*n*-isopropylacrylamide) core-shell microgels. *Macromolecules* 2003; 36: 1988–1993.
66. Gan D., Lyon L.A. Fluorescence nonradiative energy transfer analysis of crosslinker heterogeneity in core-shell hydrogel nanoparticles. *Anal. Chim. Acta* 2003; 496: 53–63.
67. Jones C.D., McGrath J.G., Lyon L.A. Characterization of cyanine dye-labeled poly(*n*-isopropylacrylamide) core/shell microgels using fluorescence resonance energy transfer. *J. Phys. Chem. B* 2004; 108: 12652–12657.
68. Nayak S., Gan D., Serpe M.J., Lyon L.A. Hollow thermoresponsive microgels. *Small* 2005; 1: 416–421.
69. Berndt I., Pedersen J.S., Lindner P., Richtering W. Influence of shell thickness and cross-link density on the structure of temperature-sensitive poly-*n*-isopropylacrylamide-poly(*n*-isopropylmethacrylamide) core-shell microgels investigated by small-angle neutron scattering. *Langmuir* 2006; 22: 459–468.
70. Berndt I., Pedersen J.S., Richtering W. Temperature-sensitive core-shell microgel particles with dense shell. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006; 45: 1737–1741.
71. Berndt I., Popescu C., Wortmann F.-J., Richtering W. Mechanics versus thermodynamics: swelling in multiple-temperature-sensitive core-shell microgels. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006; 45: 1081–1085.
72. Wooley K.L. From dendrimers to knedel-like structures. *Chem. Eur. J.* 1997; 3: 1397–1399.
73. Zhu P.W., Napper D.H. Aggregation of block copolymer microgels of poly(*n*-isopropylacrylamide) and poly(ethylene glycol). *Macromolecules* 1999; 32: 2068–2070.
74. Zhu P.W., Napper D.H. Effect of heating rate on nanoparticle formation of poly(*n*-isopropylacrylamide)-poly(ethylene glycol) block copolymer microgels. *Langmuir* 2000; 16: 8543–8545.
75. Thurmond K.B., II Kowalewski T., Wooley K.L. Water-soluble knedel-like structures: the preparation of shell-cross-linked small particles. *J. Am. Chem. Soc.* 1996; 118: 7239–7240.
76. Thurmond K.B., II Kowalewski T., Wooley K.L. Shell cross-linked knedels: a synthetic study of the factors affecting the dimensions and properties of amphiphilic core-shell nanospheres. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; 119: 6656–6665.
77. Huang H., Remsen E.E., Kowalewski T., Wooley K.L. Nanocages derived from shell cross-linked micelle templates. *J. Am. Chem. Soc.* 1999; 121: 3805–3806.
78. Huang H., Wooley K.L., Remsen E.E. Amphiphilic core-shell nanospheres obtained by intracellular shell crosslinking of polymer micelles with poly(ethylene oxide) linkers. *Chem. Commun.* 1998; 1415–1416.
79. Remsen E.E., Thurmond K.B., II Wooley K.L. Solution and surface charge properties of shell cross-linked knedel nanoparticles. *Macromolecules* 1999; 32: 3685–3689.
80. Zhang Q., Clark C.G. Jr., Wang M., Remsen E.E., Wooley K.L. Thermally-induced (re)shaping of core-shell nanocrystalline particles. *Nano Lett.* 2002; 2: 1051–1054.
81. Zhang Q., Remsen E.E., Wooley K.L. Shell cross-linked nanoparticles containing hydrolytically degradable, crystalline core domains. *J. Am. Chem. Soc.* 2000; 122: 3642–3651.

82. Wooley K.L. Shell crosslinked polymer assemblies: nanoscale constructs inspired from biological systems. *J. Polym. Sci. A* 2000; 38: 1397–1407.
83. Liu J., Zhang Q., Remsen E.E., Wooley K.L. Nanostructured materials designed for cell binding and transduction. *Biomacromolecules* 2001; 2: 362–368.
84. Ma Q., Remsen E.E., Clark C.G. Jr., Kowalewski T., Wooley K.L. Chemically induced supramolecular reorganization of triblock copoly-mer assemblies: trapping of intermediate states via a shell-crosslinking methodology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 5058–5063.
85. Ma Q., Remsen E.E., Kowalewski T., Schaefer J., Wooley K.L. Environmentally-responsive, entirely hydrophilic, shell cross-linked (sck) nanoparticles. *Nano Lett.* 2001; 1: 651–655.
86. Ma Q., Remsen E.E., Kowalewski T., Wooley K.L. Two-dimensional, shell-cross-linked nanoparticle arrays. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 4627–4628.
87. Shanmugananda Murthy K., Ma Q., Clark C.G. Jr., Remsen E.E., Wooley K.L. Fundamental design aspects of amphiphilic shell-crosslinked nanoparticles for controlled release applications. *Chem. Commun.* 2001; 773–774.
88. Huang H., Kowalewski T., Remsen E.E., Gertzmann R., Wooley K.L. Hydrogel-coated glassy nanospheres: a novel method for the synthesis of shell crosslinked knedels. *J. Am. Chem. Soc.* 1997; 119: 11653–11659.
89. Akiyoshi K., Deguchi S., Moriguchi N., Yamaguchi S., Sunamoto J. Self-aggregates of hydrophobized polysaccharides in water. Formation and characteristics of nanoparticles. *Macromolecules* 1993; 26: 3062–3068.
90. Akiyoshi K., et al. Self-assembled hydrogel nanoparticle of cholesterol-bearing pullulan as a carrier of protein drugs: complexation and stabilization of insulin. *J. Control Release* 1998; 54: 313–320.
91. Akiyoshi K., Nishikawa T., Shichibe S., Sunamoto J. Stabilization of insulin upon supramolecular complexation with hydrophobized polysaccharide nanoparticle. *Chem. Lett.* 1995; 24: 707–708.
92. Akiyoshi K., Sasaki Y., Sunamoto J. Molecular chaperone-like activity of hydrogel nanoparticles of hydrophobized pullulan: thermal stabilization with refolding of carbonic anhydrase b. *Bioconjugate Chem.* 1999; 10: 321–324.
93. Kuroda K., Fujimoto K., Sunamoto J., Akiyoshi K. Hierarchical self-assembly of hydrophobically modified pullulan in water: gelation by networks of nanoparticles. *Langmuir* 2002; 18: 3780–3786.
94. Becker M.L., Liu J., Wooley K.L. Functionalized micellar assemblies prepared via block copolymers synthesized by living free radical polymerization upon peptide-loaded resins. *Biomacromolecules* 2005; 6: 220–228.
95. Joralemon M.J., Smith N.L., Holowka D., Baird B., Wooley K.L. Antigen-decorated shell crosslinked nanoparticles: synthesis, characterization, and antibody interactions. *Bioconjugate Chem.* 2005; 16: 1246–1256.
96. Marcucci F., Lefoulon F. Active targeting with particulate drug carriers in tumor therapy: fundamentals and recent progress. *Drug Discov. Today* 2004; 9: 219–228.
97. Barratt G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cell. Mol. Life Sci.* 2003; 60: 21–37.
98. Hirose S., Muller B.G., Mulligan R.C., Langer R. Plasmid DNA encapsulation and release from solvent diffusion nanospheres. *J. Control Release* 2001; 70: 231–242.
99. Mao H.Q., et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control Release* 2001; 70: 399–421.

100. Kim I.S., Jeong Y.I., Kim S.H. Self-assembled hydrogel nanoparticles composed of dextran and poly(ethylene glycol) macromer. *Int. J. Pharm.* 2000; 205: 109–116.
101. Na K., Bae Y.H. Self-assembled hydrogel nanoparticles responsive to tumor extracellular pH from pullulan derivative/sulfonamide conjugate: characterization, aggregation, and adriamycin release *in vitro*. *Pharm. Res.* 2002; 19: 681–688.
102. Kavimandan N.J., Losi E., Peppas N.A. Novel delivery system based on complexation hydrogels as delivery vehicles for insulin-transferrin conjugates. *Biomaterials* 2006; 27: 3846–3854.
103. Hsiue G.-H., Hsu S.-H., Yang C.-C., Lee S.-H., Yang I.K. Preparation of controlled release ophthalmic drops, for glaucoma therapy using thermosensitive poly-*n*-isopropylacrylamide. *Biomaterials* 2001; 23: 457–462.
104. Ghosh P.K. Hydrophilic polymeric nanoparticles as drug carriers. *Indian J. Biochem. Bio. Phys.* 2000; 37: 273–282.
105. Gaur U., et al. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int. J. Pharm.* 2000; 202: 1–10.
106. Nayak S., Lee H., Chmielewski J., Lyon L.A. Folate-mediated cell targeting and cytotoxicity using thermoresponsive microgels. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; 126: 10258–10259.
107. Choi S.H., Yoon J.J., Park T.G. Galactosylated poly(*n*-isopropylacrylamide) hydrogel submicrometer particles for specific cellular uptake within hepatocytes. *J. Colloid Interface Sci.* 2002; 251: 57–63.
108. Becker M.L., Remsen E.E., Pan D., Wooley K.L. Peptide-derivatized shell-crosslinked nanoparticles. 1. Synthesis and characterization. *Bioconjugate Chem.* 2004; 15: 699–709.
109. Becker M.L., Bailey L.O., Wooley K.L. Peptide-derivatized shell-crosslinked nanoparticles. 2. Biocompatibility evaluation. *Bioconjugate Chem.* 2004; 15: 710–717.
110. Pan D., Turner J.L., Wooley K.L. Folic acid-conjugated nanostructured materials designed for cancer cell targeting. *Chem. Commun.* 2003; 2400–2401.
111. Das M., Mardiyani S., Chan W.C.W., Kumacheva E. Biofunctionalized pH-responsive microgels for cancer cell targeting: rational design. *Adv. Mater. (Weinheim, Germany)*, 2006; 18: 80–83.
112. Jana S.S., et al. Targeted cytosolic delivery of hydrogel nanoparticles into HepG2 cells through engineered Sendai viral envelopes. *FEBS Lett.* 2002; 515: 184–188.
113. Na K., Park K.H., Kim S.W., Bae Y.H. Self-assembled hydrogel nanoparticles from curdlan derivatives: characterization, anti-cancer drug release and interaction with a hepatoma cell line (HepG2). *J. Control Release* 2000; 69: 225–236.
114. Mitra S., Gaur U., Ghosh P.C., Maitra A.N. Tumor targeted delivery of encapsulated dextran-doxorubicin conjugate using chitosan nanoparticles as carrier. *J. Control Release* 2001; 74: 317–323.
115. Farokhzad O.C., et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 6315–6320.
116. Kim J., Singh N., Lyon L.A. Label-free biosensing with hydrogel microlenses. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2006; 45: 1446–1449.
117. Kawaguchi H., et al. Versatility of thermosensitive particles. *Macromol. Symp.* 2000; 151: 591–598.
118. Elaissari A., et al. Hydrophilic and cationic latex particles for the specific extraction of nucleic acids. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1999; 10: 403–4120.
119. Kondo A., Kaneko T., Higashitani K. Development and application of thermo-sensitive immunospheres for antibody purification. *Biotechnol. Bioeng.* 1994; 44: 1–6.

120. Kondo A., Kamura H., Higashitani K. Development and application of thermosensitive magnetic immunospheres for antibody purification. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 1994; 41: 99–105.
121. Ye L., Cormack P.A.G., Mosbach K. Molecularly imprinted monodisperse microspheres for competitive radioassay. *Anal. Commun.* 1999; 36: 35–38.
122. Ehrick J.D., et al. Genetically engineered protein in hydrogels tailors stimuli-responsive characteristics. *Nat. Mater.* 2005; 4: 298–302.
123. Miyata T., Jige M., Nakaminami T., Uragami T. Tumor marker-responsive behavior of gels prepared by biomolecular imprinting. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 1190–1193.
124. Boretos J.W., Eden M. *Contemporary Biomaterials, Material and Host Response, Clinical Applications, New Technology and Legal Aspects.* Park Ridge, New Jersey: Noyes Publications; 1984. p 232.
125. Kawaguchi H. Functional polymer microspheres. *Prog. Polym. Sci.* 2000; 25: 1171–1210.
126. Kawaguchi H., Fujimoto K., Mizuhara Y. Hydrogel microspheres. 3. Temperature-dependent adsorption of proteins on poly-*n*-isopropylacrylamide hydrogel microspheres. *Colloid Polym. Sci.* 1992; 270: 53–57.
127. Shiroya T., Tamura N., Yasui M., Fujimoto K., Kawaguchi H. Enzyme immobilization on thermosensitive hydrogel microspheres. *Colloid Surface B* 1995; 4: 267–274.
128. Duracher D., Elaissari A., Mallet F., Pichot C. Adsorption of modified HIV-1 capsid p24 protein onto thermosensitive and cationic core-shell poly(styrene)-poly (*n*-isopropylacrylamide) particles. *Langmuir* 2000; 16: 9002–9008.
129. Urakami Y., Kasuya Y., Fujimoto K., Miyamoto M., Kawaguchi H. Phagocytosis of microspheres with modified surfaces. *Colloid Surface B* 1994; 3: 183–190.
130. Kimhi O., Bianco-Peled H. Microcalorimetry study of the interactions between poly(*n*-isopropylacrylamide) microgels and amino acids. *Langmuir* 2002; 18: 8587–8592.
131. Gan D., Lyon L.A. Synthesis and protein adsorption resistance of peg-modified poly(*n*-isopropylacrylamide) core/shell microgels. *Macromolecules* 2002; : 9634–9639.
132. Plunkett K.N., Berkowski K.L., Moore J.S. Chymotrypsin responsive hydrogel: application of a disulfide exchange protocol for the preparation of methacrylamide containing peptides. *Biomacromolecules* 2005; 6: 632–637.
133. Kim S., Healy K.E. Synthesis and characterization of injectable poly(*n*-isopropylacrylamide-co-acrylic acid) hydrogels with proteolytically degradable cross-links. *Biomacromolecules* 2003; 4: 1214–1223.
134. Nayak S., Lyon L.A. Ligand-functionalized core/shell microgels with permselective shells. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004; 43: 6706–6709.

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ В ОРГАНИЗМЕ

Сяоцзюнь Юй, Чандра М. Валмикинатан, Аманда Роджерс и Цзюньпин Ван

5.1. Введение

Развитие различных отраслей науки и технологии в значительной степени расширило наши знания в области биологии и медицины. Почти все без исключения компоненты биологических систем имеют размеры порядка нескольких долей микрометра, поэтому проведение анализа и различных модификаций на этом уровне может позволить воздействовать и управлять такими системами. Приставка «нано» изменила взгляд людей на окружающий мир. Нанотехнология — междисциплинарная область исследований, занимающаяся конструированием, синтезом, анализом и применением материалов и устройств, размеры которых находятся в нанометровом диапазоне [1, 2].

За несколько последних десятилетий нанотехнологии стали использоваться в организации направленной доставки лекарственных препаратов, создании биомикроэлектромеханических систем, биосенсоров, микрожидкостей, микрочипов, в получении изображений биологических объектов, а также в тканевой инженерии [3]. Разработка систем доставки лекарств, основанная на нанотехнологических методах, происходит чрезвычайно интенсивно, поскольку такие системы открывают широчайшие возможности для диагностики и лечения заболеваний. Объем инвестиций в эти исследования растет год от года, и некоторые системы доставки лекарств уже производятся коммерческими предприятиями.

Способы контролируемой и направленной доставки лекарств, созданные с применением нанотехнологических методов, вызывают повышенный интерес со стороны государственных научных центров и частных предприятий. В соответствии с опубликованными в 2002 г. статистическими данными [1] эти исследования проводят такие крупнейшие организации, как NIH, NSF и NASA*. Эта область исследований начинала развиваться как одно из подразделений

* NIH (National Health Institute) — Национальные институты здравоохранения США; NSF (National Science Foundation) — Национальный научный фонд США; NASA (National Aeronautics and Space Administration) — Национальное управление США по авиации и исследованию космического пространства.

Национальной нанотехнологической инициативы в 2001 г. с бюджетом около 116 млн долларов США; к концу 2007 г. бюджет должен был достичь 82 млрд долларов [4] и по прогнозам будет продолжать расти [5]. Кроме того, фармацевтические компании начали вкладывать средства в проекты, направленные на модификацию существующих систем доставки лекарств. В Соединенных Штатах спрос на подобные системы быстро растет, и они уже заняли определенную нишу в области инновационных технологий. В настоящее время примерно в 150 компаниях есть активно действующие исследовательские группы, работающие над созданием направленных и контролируемых систем доставки лекарств, и это число, безусловно, будет увеличиваться и в ближайшем будущем, что способствует скорейшему развитию медицины, пониманию функционирования человеческого организма и причин различных патологических состояний [6].

Традиционно под нанотехнологиями для создания систем доставки лекарств подразумевали синтез носителей с размером в нанометровом диапазоне, которые бы использовались главным образом для повышения биодоступности препаратов и ослабления их побочного действия путем удерживания молекул лекарства или его транспортировки в определенные участки организма. В последнее время стали появляться системы, предназначенные не только для терапевтических целей, но и диагностики заболеваний [7]. Кроме традиционного использования для доставки лекарств такие «наноинструменты» можно применять в медицинской диагностике, основываясь на методах визуализации при флуоресценции [8] или магнитно-резонансной томографии (МРТ) [9], а также в фототермических методах лечения онкологических заболеваний [10]. Современные исследователи все чаще обращаются к изучению полифункциональных наночастиц, используемых в терапевтических и транспортных целях, и для получения изображения тканей или органов [11–13].

5.2. Преимущества систем доставки лекарств на основе наночастиц

Существует несколько способов доставки в организм стабильных и эффективных лекарственных препаратов. Чаще всего лекарства принимают внутрь перорально, вводят через кожу (трансдермально) или через нос (капли и средства для ингаляций) [14]. Самым простым и распространенным способом приема лекарств является прием через рот, однако этот путь не лишен недостатков. В частности, он снижает биодоступность препаратов. Например, пероральный прием белков и пептидов неэффективен из-за экстремальных значений pH в пищеварительной системе и необходимости прохождения через различные органы; кроме того, большие дозы препаратов могут нарушать работу кишечника [15]. Назальный и трансдермальный пути неудобны для пациентов, к тому же они снижают эффективность действия препаратов [16]. К другим недостаткам традиционных способов приема лекарств относится невозможность точного

воспроизведения количества высвобождаемого препарата за определенный промежуток времени, плохая растворимость, а также невозможность направленной доставки препаратов к тканям-мишеням без побочного действия на здоровые ткани [6]. Поэтому системы доставки лекарств на основе наносистем имеют множество преимуществ и позволяют избежать многих проблем, связанных с традиционными методами приема препаратов.

5.2.1. Направленная доставка

Нанотехнологические системы доставки лекарств позволяют направлять препараты к специфическим участкам организма и определенным клеткам так, что расположенные поблизости здоровые клетки не подвергаются действию лекарства [17, 18]. Например, для направленной доставки противоопухолевых препаратов в составе наночастиц-переносчиков используются внешние побудительные причины (сигналы) — ультразвук или магнитное поле. Для доставки и интернализации лекарств также применяются трансферрин [19], фолат [20] или различные антитела [21]. Направленная доставка лекарственных препаратов позволяет в значительной степени снизить общую токсичность и существенно повысить эффективность действующего вещества [6].

5.2.2. Контролируемая доставка

Основанные на нанотехнологических принципах системы доставки лекарств позволяют вводить в организм токсичные лекарственные препараты и комплексы, а также ДНК и вирусные векторы в оптимальной дозировке и с определенными временными интервалами [16]. Профиль высвобождения препарата зависит от строения системы доставки. Путем подбора подходящего материала для синтеза наночастиц можно изменять профиль выхода лекарства [22]. Кроме того, нанотехнологии позволяют модифицировать свойства материалов на атомном уровне и создавать носители с контролируемой скоростью доставки [23].

5.2.3. Увеличение скорости циркуляции и объема распределения

В силу того что размер частиц влияет на скорость выведения лекарства, наноконтейнеры могут повысить время (скорость) циркуляции лекарства в организме. Крупные частицы удаляются значительно быстрее мелких. Кроме увеличения продолжительности циркуляции, наночастицы позволяют расширить область распределения препаратов по сравнению с более крупными носителями. При введении больших частиц в организм модельного животного они в большей концентрации обнаруживаются в селезенке и печени, чем в органе-мишени. Мелкие же частицы с высокой вероятностью захватываются другими клетками организма, включая и клетки-мишени [24].

5.2.4. Растворимость лекарств

Методы нанотехнологий помогают осуществлять направленную доставку всех типов лекарств. В частности, применение нанотехнологии особенно эффективно для проникновения в ткани малорастворимых веществ. Мицеллы, которые обычно формируются из амфифильных материалов, имеют гидрофобное ядро, окруженное гидрофильным внешним слоем — оболочкой. Гидрофобные молекулы легко включаются внутрь ядра, а гидрофильная оболочка облегчает прохождение наночастиц через водные среды. Это позволяет увеличивать распределение гидрофобных веществ в водных средах организма [25–27].

5.2.5. Внутриклеточные системы доставки лекарств

Способ доставки лекарства, помещенного внутрь клетки, имеет несомненное достоинство: токсическое действие препаратов снижается, а эффективность дозировки повышается [28]. Гидрофобные нанопереносчики легко проникают через клеточные мембраны [29]. Эндоцитоз частиц зависит от их размера и типа ткани. Максимальный размер частиц, способных проникать через клеточную мембрану, составляет 500 нм. Интернализация наноматериалов в клетках также зависит от способности вещества активироваться и направляться в ядро или митохондрии [30].

Наибольший интерес представляет включение в клетки гидрофобных и генетических компонентов. К типичным методам интернализации наночастиц относятся прямая диффузия сквозь клеточную мембрану за счет градиента концентрации, перенос через потенциалчувствительные каналы и опосредованный рецепторами эндоцитоз. Системы доставки препаратов на основе липидов или мицелл предоставляют различные возможности для инкапсулирования или связывания специфических гидрофильных и гидрофобных компонентов, что приводит к образованию наночастиц с модифицированной поверхностью, способствующей эндоцитозу [30].

5.2.6. Прохождение через биологические мембраны

Слабое проникновение лекарств через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ), систему желудочно-кишечного тракта и сосудистый эндотелий является серьезной проблемой. Традиционные методы доставки лекарственных препаратов — внутривенное введение, пероральный прием или трансдермальный способ введения микрочастиц — не подходят для случаев, когда лекарство должно проникнуть через ГЭБ или желудочно-кишечный тракт, что связано с физиологическими условиями (разные значения pH или ограничения по размерам частиц). Методы нанотехнологии позволяют создавать системы доставки лекарств, для которых биологические мембраны не являются препятствием. Эти разработки включают исследования наноматериалов на основе металлов, полимерных носителей лекарственных препаратов и систем доставки на основе липидов.

5.2.7. Увеличение площади поверхности

Чем мельче частицы, тем больше их удельная площадь поверхности. Это также используется для создания эффективных систем доставки лекарственных препаратов с применением наночастиц, позволяющих повысить нагрузку по препарату и эффективность его высвобождения.

5.3. Активация и направленная доставка лекарственных препаратов

5.3.1. Активация и доставка под действием физико-химических сигналов

5.3.1.1. pH-чувствительные переносчики

pH-чувствительные переносчики играют важную роль в химиотерапии, а также в доставке молекул в клетки путем эндоцитоза. Дело в том, что опухолевые клетки и эндосомы, участвующие во внутриклеточном транспорте веществ, обычно имеют более низкое значение pH, чем нормальная интерстициальная жидкость [31]. Таким образом, pH-чувствительные системы доставки идеально подходят для проникновения в клетки лекарств, генов, белков и других веществ [20, 31–36].

Действие некоторых pH-чувствительных систем зависит от взаимодействий между лекарством и материалом носителя, особенно образования связей, расщепляющихся в кислой среде. Например, Бае с соавторами сообщали о создании полимерных мицелл для доставки адриамицина [37]. Адриамицин присоединяли к полимерной матрице с помощью расщепляемой в кислой среде гидразоновой связи. Быстрое и активное высвобождение адриамицина происходило при значениях pH ниже 3,0; тогда как при pH 7,4 процесс шел значительно медленнее [37]. В аналогичных исследованиях с доксорубицином (DOX) было показано, что выход лекарства из полимерных мицелл также связан с наличием расщепляемых в кислой среде связей между полимером и лекарством. При pH 7,4 высвобождение препарата было минимальным, а при pH 5,0 оно значительно усиливалось [31, 38].

Чувствительные к изменению pH взаимодействия между молекулами вещества самого лекарства также могут играть определенную роль в регуляции его выхода из pH-чувствительных систем доставки. Так, при изучении высвобождения лекарства из содержащих доксорубицин частиц оказалось, что некоторые молекулы доксорубицина, включенные в полимерные мицеллы, образуют димеры DOX–DOX за счет азометиновой связи [38]. Выход освобожденного лекарства происходил главным образом в начальной фазе, а димер высвобождался на более поздней стадии. Кроме того, выход димера зависел от изменения pH. В кислой среде азометиновая связь в димере расщепляется, что влечет за собой появление дополнительного количества мономера. Таким образом, образо-

вание лабильной в кислой среде связи DOX–DOX может влиять на поведение рН-чувствительных полимерных мицелл, содержащих доксорубин [38].

Еще один путь создания рН-чувствительных систем доставки состоит в использовании свойств материала, из которого выполнена система, например, амфифильных и титруемых липидов.

Для синтеза рН-чувствительных липосом применяют комбинации катионных и анионных липидов, конъюгированных со слабыми основными (катионными) или слабыми кислотными (анионными) амфифильными веществами. Обычно при нейтральном значении рН липосомы несут отрицательный заряд и устойчивы в нейтральных или щелочных средах. При снижении рН амфифильный компонент двойного слоя протонируется до тех пор, пока слой не теряет свой заряд. Это нарушает электростатическую стабилизацию липосом, в результате чего они начинают агрегировать и сливаться с расположенными поблизости мембранами. Значение рН, при котором липосомы теряют устойчивость, зависит от ряда факторов, включая соотношение анионных и катионных липидов, а также pK_a титруемого компонента. Ши с соавторами объединили в одной системе рН-чувствительные липосомы и метод направленной доставки лекарств, основанный на использовании взаимодействия антиген–антитело [32]. К рН-чувствительным липосомам присоединяли лиганды, связывающиеся с рецепторами фолата. Была показана способность таких систем доставлять лекарства и гены в злокачественные клетки [32].

рН-чувствительные полимеры обычно содержат ионизируемые компоненты, способные выступать в роли доноров или акцепторов протонов. Слабые поликислоты, такие как, например, полиакриловая кислота (ПАК), при низких значениях рН являются акцепторами протонов, а при нейтральных значениях рН высвобождают их; обратная ситуация наблюдается для слабых полиоснований, например поли(4-винилпиридина) [39]. Чувствительные к изменению рН системы доставки на основе наночастиц обычно содержат слабые поликислоты или полиоснования в сочетании с гидрофобными веществами. Когда ионизируемый компонент заряжен, за счет электростатических взаимодействий наночастицы сохраняются и распределяются в растворе. При изменении рН изменяется заряд ионизируемого компонента. Это приводит к тому, что гидрофобные взаимодействия начинают играть более важную роль, чем электростатические. В результате наночастицы агрегируют и сливаются друг с другом и с мембранами соседних клеток. Деформация наночастиц приводит к высвобождению заключенного в них лекарства [33, 35, 39].

Одним из наиболее развитых направлений применения рН-чувствительных полимерных наночастиц является доставка противоопухолевых препаратов к очагам развития опухоли. В частности, Лианг с соавторами создали рН-чувствительные наночастицы, состоящие из конъюгата ацетата пуллулана и сульфонамида и содержащие 5-фторурацил [33]. Ацетат пуллулана — гидрофобный компонент, а сульфонамид — слабая кислота, растворимость которой зависит от рН. 5-Фторурацил — химиотерапевтический препарат, который часто используется для лечения онкологических больных. Свойства исходных веществ

обеспечивают возможность самопроизвольной сборки наночастиц и включение в них 5-фторурацила. Выяснилось, что наночастицы агрегируют при снижении рН от 7,5 до 6,0. Значение рН в опухолевых тканях обычно составляет около 6,8. Исследования показали, что высвобождение лекарства происходит значительно активнее при более низких величинах рН (от 6,0 до 6,8), чем при более высоких (от 7,4 до 8,2). Снижение рН приводит к деионизации сульфонида, что повышает гидрофобность частиц и вызывает их структурные изменения и агрегацию. Поэтому высвобождение 5-фторурацила происходит значительно активнее при рН 6,8 (в опухолевых клетках), чем при рН 7,4 (в здоровых клетках). Данное исследование показывает потенциальную возможность использования рН-чувствительных переносчиков для направленной доставки химиотерапевтических препаратов к опухолевым тканям [33].

В большинстве разрабатываемых в настоящее время рН-чувствительных системах высвобождение лекарственных препаратов происходит при низких значениях рН, однако некоторые системы были специально сконструированы для выхода лекарства при повышенных значениях рН. Так, Мейсснер с соавторами сообщали о создании рН-чувствительных наночастиц для доставки такролимуса — эффективного лекарственного средства для лечения синдрома раздраженного кишечника [35]. Наночастицы синтезировали из рН-чувствительного полимера Eudragit P-4135F (EP4135F). В отличие от обсуждавшихся выше частиц данные частицы были устойчивы при низких значениях рН и высвобождали препарат при более высоких рН. Это объясняется рН-зависимым разложением полимерной матрицы, которая распадалась значительно быстрее при рН 7,4, чем при рН 6,8, что позволяет использовать наночастицы для доставки такролимуса к двенадцатиперстной кишке [35].

5.3.1.2. Термочувствительные переносчики

Некоторые переносчики лекарств изготавливают путем включения в полимер термочувствительных компонентов. Такие полимеры характеризуются критической температурой растворения (КТР). При этой температуре термочувствительный полимер претерпевает фазовый переход. Полимеры, растворимые в воде ниже определенной температуры и претерпевающие расслоение фаз при более высокой температуре, характеризуются нижней критической температурой растворения (НКТР). Обратная ситуация наблюдается для полимеров с верхней критической температурой растворения. В большинстве случаев для направленной доставки лекарств применяют полимеры с НКТР. Чаще всего в качестве матрицы используют какой-либо поли(*N*-замещенный акриламид), например поли-*N*-изопропилакриламид. В воде этот полимер претерпевает обратимый фазовый переход при НКТР около 32 °С. Модификации полимера позволяют изменять значение НКТР [39].

Термочувствительные полимеры можно включать в системы доставки лекарственных препаратов по-разному. Один путь заключается в создании наночастиц со структурой типа «ядро–оболочка», внешняя поверхность которых

состоит из термочувствительного полимера. Например, были созданы полимерные мицеллы из амфифильных блок-сополимеров N-изопропилакриламида и стирола [40]. Термочувствительный N-изопропилакриламид использовали для синтеза оболочки, а из стирола формировали внутреннее гидрофобное ядро. Такие наночастицы подвергаются обратимому фазовому переходу при температуре около 32 °С. Другими словами, мицеллы остаются незатронутыми при температуре ниже НКТР, агрегируют, образуя мутный раствор при повышении температуры выше НКТР, и вновь распределяются в растворе при понижении температуры ниже НКТР. В данные мицеллы был включен противоопухолевый препарат адриамицин; при этом свойства системы практически не изменялись. Это означает, что подобные носители можно использовать для направленной доставки гидрофобных препаратов [40].

Была изучена температурная зависимость поведения привитых сополимеров N-изопропилакриламида и с другими полимерами. Значение НКТР и способность высвобождать лекарственный препарат можно варьировать путем изменения состава привитых сополимеров. В упоминавшейся выше работе [40] были описаны сополимеры N-изопропилакриламида со значениями НКТР около 26 °С и 39 °С. В другой публикации сообщалось о синтезе наночастиц из поли(N-изопропилакриламид/N,N-диметилакриламида) с молекулой холестерина на конце, а также из поли(N-изопропилакриламид/N-гидроксиметилакриламида) со вставками холестерина. Эти наночастицы использовали для доставки гидрофобных лекарственных препаратов, включая циклоспорин А и индометацин. Присутствие гидрофильных компонентов, таких как N,N-диметилакриламид и N-гидроксиметилакриламид, повышало значение НКТР полимерной системы [36]. Аналогичным образом, сополимеры N-изопропилакриламида с метакриловой кислотой (МАК) при нейтральном значении pH имели более высокое значение НКТР, чем простые полимеры N-изопропилакриламида [34]. Кроме того, в обоих исследованиях было показано, что при физиологическом значении pH высвобождение лекарственного препарата происходит активнее при температуре выше НКТР [34, 36].

Были созданы наночастицы, поведение которых регулируется двумя внешними сигналами. Например, Ло с соавторами сообщали о создании «умных» наночастиц, реагирующих на изменения как pH, так и температуры [34]. Эти частицы были синтезированы из привитых сополимеров поли(D,L-молочной кислоты) с поли(N-изопропилакриламид/метакриловой кислотой), а также полимолочной кислоты с N-изопропилакриламид/МАК путем диализа раствора против органического полимера, а не дистиллированной воды. Идея использования сополимеров N-изопропилакриламид/МАК заключалась в том, чтобы повысить значение НКТР и сделать частицы зависимыми от изменения pH. При нейтральных значениях pH молекулы МАК ионизированы, что предотвращает агрегацию наночастиц. Значение НКТР при нейтральном pH было выше 37 °С. При снижении pH происходила постепенная деионизация молекул МАК, что приводило к уменьшению НКТР и агрегации наночастиц. Данные наночастицы использовали для доставки гидрофобного и гидрофильного веществ — пирена

и 5-фторурацила соответственно. В обоих случаях высвобождение лекарства зависело от значений pH и температуры [34].

5.3.1.3. Фотохимический способ регуляции

Фотохимический метод, названный «фотохимическая интернализация», изначально был предложен для увеличения включенных в цитозоль макромолекул [41, 42]. Методика основана на использовании фотосенсибилизаторов, локализованных преимущественно в эндосомах и лизосомах клеток, которые разрушают эти структуры под действием света, что приводит к высвобождению захваченных при эндоцитозе макромолекул в цитозоль. Такая технология специально разрабатывалась для доставки в клетки лекарств и генов [43]. Под действием света, направленного в опухолевую ткань, фотосенсибилизатор усиливает захват клетками гидрофильных противоопухолевых препаратов, например блеомицина, которые легко метаболизируются [44]. Подобный подход позволяет в значительной степени повысить биодоступность лекарства и эффективность его доставки, усиливая тем самым терапевтическое действие.

Кроме того, фотосенсибилизаторы вводят в липосомы, используемые для направленного транспорта противоопухолевых препаратов [45–47], или в полимерные мицеллы [48], предназначенные для проникновения к очагам злокачественного роста. Поскольку такие препараты светочувствительны, их надо хранить в темных местах. В ходе лечения опухолевые ткани подвергают воздействию света, что заставляет фотосенсибилизатор уничтожать раковые клетки. Подобный метод лечения называют «фотодинамическая терапия».

5.3.1.4. Доставка лекарственных препаратов под действием магнитного поля

При этом способе транспорта лекарств магнитный материал, обычно магнетит (Fe_2O_3), включают в полимерную капсулу, содержащую лекарственный препарат. Магнитные частицы помогают доставить лекарство в необходимое место, а медленное разрушение полимерного носителя обеспечивает продолжительное высвобождение препарата [49]. Кроме того, разрушению опухолевой ткани способствует нагревание металлических магнитных наночастиц после их проникновения в раковые ткани или клетки [50].

5.3.1.5. Доставка лекарственных препаратов с помощью ультразвука

Ультразвук традиционно используют в медицинской диагностике, в частности как метод получения изображений. Однако относительно недавно его стали применять для направленной доставки лекарств. Этот способ, названный «сонофорез», позволяет проводить высокомолекулярные лекарственные препараты через некоторые барьеры организма, например через кожу. Данная технология была успешно применена для доставки лекарств в генной терапии, химиотерапии, а также при лечении тромбозов [51]. Суть метода состоит в использовании контрастного агента, который достигает опухоли с помощью микропузырьков. Микропузырьки образуются в результате пропускания газов через раствор.

Благодаря новым достижениям, ученые научились создавать нанопузырьки из подходящих полимеров, двойных липидных слоев или газов [52].

5.3.2. Направленная доставка лекарств

Наночастицы можно связывать со специфическими молекулами, которые обеспечивают целевую доставку частиц к нужному участку организма. Часто в роли этих молекул применяют пептиды или пептидные фрагменты. Для повышения вероятности связывания с соответствующими клеточными рецепторами на поверхности наночастиц можно разместить несколько молекул с функциями. Это используется тогда, когда клетки-мишени активно экспрессируют на своей поверхности рецепторы данных молекул. Использование молекул целевой направленности также имеет значение для внутриклеточного транспорта лекарств за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза [19, 20, 32, 40, 53–58]. Чаще всего в качестве таких молекул в системах транспорта лекарственных препаратов применяют моноклональные антитела, фолат, трансферрин и пептидные лиганды — так называемые аптамеры. В этом разделе мы рассмотрим возможности использования этих веществ для направленной доставки лекарственных препаратов.

5.3.2.1. Моноклональные антитела

В последнее десятилетие активно велась работа по созданию моноклональных антител, способных специфически связываться с рецепторами на поверхности раковых клеток. Применение антител помогает уничтожить опухоль без причинения вреда здоровым тканям [59].

В нескольких лабораториях были созданы биспецифические антитела [60]. Метод основан на слиянии двух типов независимых антител (одно антитело связывается с опухолевыми клетками, а второе — с лекарственным препаратом) посредством сульфгидрильной или малеимидной групп. Модифицированные методики позволили сконструировать специфические системы доставки лекарств, где антитело и препарат связаны со спейсером или с полимером, которые впоследствии расщепляются. Эти же системы использовали для связывания одного плеча биспецифических антител с клетками-мишенями, а другого плеча — с клетками-киллерами или Т-клетками, уничтожающими опухоль [30]. Антитела взаимодействуют со специфическими клетками организма и «тянут» за собой полимерную цепь с присоединенным лекарством [61]. Распад цепи приводит к интернализации лекарственного препарата, который разрушает опухоль.

5.3.2.2. Фолат в качестве лиганда

Рецепторы фолата связывают фолат и конъюгаты фолата с лекарствами. Далее молекулы фолата путем эндоцитоза захватываются клетками, имеющими данные рецепторы. Внутри эндосомы в клетке-мишени создается кислая среда. Для доставки к соответствующим клеткам фолат конъюгировали с целым рядом соединений. Такие системы доставки лекарственных препаратов обладают

несколькими преимуществами. Во-первых, сродство рецепторов фолата к фолатсодержащим соединениям очень высоко, что обеспечивает избирательность связывания. Во-вторых, интернализация фолатсодержащих соединений клетками-мишенями происходит без опасных для организма дополнительных воздействий [20, 32].

К настоящему времени было опробовано действие конъюгатов фолата с радиоактивными фармацевтическими агентами, контрастными соединениями для МРТ, белками, олигонуклеотидами, рибозимами, наночастицами с лекарственными препаратами и другими терапевтическими агентами. Конъюгаты фолата показали хорошие результаты в лечении онкологических заболеваний, поскольку опухолевые клетки экспрессируют большое количество рецепторов фолата [32]. Были созданы конъюгаты фолата с химиотерапевтическими препаратами: таксолом, мейганзином, нитрогетероциклическим бис(галлоэтил)фосфорамидитом, а также 5-фтор-2'-дезоксисуридин-монофосфатом [20].

5.3.2.3. Трансферрин в качестве лиганда

Трансферрин — переносящий железо гликопротеин, находящийся в сыворотке крови. Рецепторы трансферрина в большом количестве экспрессируются на эритроцитах и опухолевых клетках. После связывания с рецепторами трансферрина несущие трансферрин частицы захватываются клеткой путем эндоцитоза и хранятся в эндосомах. рН-среда в эндосомах заставляет трансферрин высвобождать связанное с ним железо [57].

Для доставки плазмидной ДНК в клетки K562 группой исследователей [57] были созданы полимерные наночастицы, содержащие полиэтиленгликоль со связанным трансферрином. Было показано, что при использовании такой системы сначала происходило резкое увеличение содержания плазмидной ДНК, за которым следовало ее контролируемое высвобождение на протяжении нескольких дней, причем за первую неделю высвобождалось от 67,1 до 81,3% инкапсулированного вещества. Захват наночастиц происходил в результате опосредованного рецепторами эндоцитоза; доказательством служило снижение эффективности связывания наночастиц, содержащих ПЭГ/трансферрин, в присутствии свободного трансферрина [57].

Трансферрин также способствует проникновению частиц через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Виссер с соавторами использовали ПЭГ-содержащие липосомы, конъюгированные с трансферрином, для доставки лекарств к эпителиальным клеткам капилляров головного мозга, несущим рецепторы трансферрина [19]. Липосомы нагружали пероксидазой хрена в качестве модельного лекарственного препарата и инкубировали с эпителиальными клетками. Сравнивали поведение липосом, содержащих ПЭГ и трансферрин, с липосомами без трансферрина при 37 и 4 °С. При 37 °С липосомы с трансферрином в 2–4 раза сильнее связывались с клетками-мишенями, чем липосомы без трансферрина. Этот результат показывает потенциальную возможность использования трансферринсодержащих липосом для доставки пептидов в эндотелиальные клетки ГЭБ [19].

5.3.2.4. Аптамеры

Аптамеры — олигонуклеотидные последовательности ДНК или РНК, использующиеся в качестве лигандов. Уникальная структура этих последовательностей обеспечивает высокую специфичность связывания с мишенью, как и для антител. Применение аптамеров в качестве лигандов имеет ряд преимуществ. Обычно их размер составляет доли микрометра, и они характеризуются хорошей биосовместимостью. Процедура SELEX (подробности см. в работе [55]) позволяет проводить синтез, селекцию, очистку и амплификацию аптамеров для широкого круга мишеней. Большинство аптамеров не вызывают иммунной реакции, циркулируют в крови длительное время и стабильны в условиях *in vivo*. Дополнительно повысить устойчивость аптамеров можно с помощью химической модификации [53, 54].

В работах [53] исследовалось поведение синтезированных конъюгатов наночастиц с аптамерами, способных связываться с клетками рака простаты. Полимерные наночастицы, содержащие меченный родамином декстран, конъюгировали с аптамерами РНК, которые взаимодействовали с мембранным простатоспецифическим антигеном, присутствующим в опухолевых клетках простаты в большем количестве, чем в здоровых клетках. Конъюгированные наночастицы интенсивнее захватывались клетками с рецепторами мембранного простатоспецифического антигена, нежели клетками без данных рецепторов. Таким образом, было показано, что биоконъюгаты наночастиц с аптамерами можно использовать для направленной доставки лекарственных препаратов в опухолевые клетки [53]. В последующих исследованиях наночастицы нагружали противоопухолевым препаратом доцетакселом и конъюгировали с аптамерами, связывающимися с мембранным простатоспецифическим антигеном. Были проведены эксперименты *in vivo* на модели опухоли простаты у мышей. Конъюгаты наночастиц, несущие противоопухолевый препарат, с большей эффективностью подавляли рост опухоли, чем неконъюгированные наночастицы с лекарством, инъекции свободного лекарства или пустые наночастицы. Таким образом, применение аптамеров для доставки лекарственных препаратов к опухолевым клеткам может значительно повысить эффективность лечения [55].

5.3.2.5. Лектины

Некоторые биологически активные молекулы, предназначенные для перорального приема, должны быть защищены от протеолиза в желудочно-кишечном тракте (ЖКТ). Один из способов защиты — включение препаратов в состав наночастиц, устойчивых к действию протеаз. Однако такие частицы могут препятствовать прохождению лекарства сквозь слой клеток кишечного эпителия, что необходимо для их проникновения в кровь. Эту проблему удастся решить путем покрытия наночастиц лектинами, способными связываться с клетками кишечного эпителия. Лектины — белки, обладающие способностью взаимодействовать с определенными сахарами. Они устойчивы в кислой среде и не подвергаются ферментативному расщеплению. Кроме того, некоторые из них, например агглютинин из проростков пшеницы, способны связываться со

слизистой оболочкой кишечника [56, 62]. Рассел-Джонс с соавторами использовали покрытые лектинами наночастицы для создания лекарственных препаратов для перорального приема [56]. Присутствие лектинов способствовало захвату наночастиц клетками эпителия. Таким образом, лектины облегчают транспорт биоразлагаемых наночастиц сквозь стенки кишечника и их проникновение в кровотоки [56, 62].

5.3.2.6. Модифицированные и искусственные пептидные лиганды

Для направленной доставки лекарств и в диагностических целях применяют и другие пептидные лиганды. Некоторые из них представляют собой модификации природных пептидов. Например, Нах с соавторами описали применение короткого пептида AWBP, связывающегося со стенками артерий, для доставки генов в клетки артериальной стенки [58]. Пептид AWBP присоединяли к синтетической пептидной цепи, которую затем конъюгировали с полимерным нановектором для транспорта к клеткам-мишеням. Выяснилось, что конъюгированные с AWBP частицы захватывались клетками-мишенями в результате опосредованного рецепторами эндоцитоза [58].

Другие лиганды, например пептидные лиганды RGD, были получены полностью синтетически. Эти молекулы, образованные замкнутыми в кольцо последовательностями Arg–Gly–Asp, специфически взаимодействуют с определенными интегринами. Лиганды RGD можно использовать для избирательного связывания интегринов, расположенных на клетках-мишенях. Например, Митра с соавторами получили комплекс полимеров с RGD для связывания интегрин $\alpha v \beta 3$ [63]. Данный интегрин присутствует на лиминальной поверхности сосудов растущей опухоли только в процессе ангиогенеза. Использование лигандов RGD помогает разрушить сосудистую сеть злокачественной ткани с помощью химиотерапевтических средств, ослабляя рост опухоли. В другой исследовательской группе были созданы синтетические пептиды, напоминающие релизинг-фактор лютеинизирующего гормона (LHRH), для доставки конъюгатов лекарств с полимерами к опухолевым клеткам яичников [64]. На этих клетках происходит избыточная экспрессия рецепторов LHRH, которых нет на клетках большинства здоровых тканей. Таким образом, синтетические лиганды LHRH можно включить в систему доставки лекарственного препарата для направленного воздействия на опухолевые клетки яичников без воздействия на здоровые клетки.

5.3.2.7. Другие лиганды

Кроме упоминавшихся выше лигандов для транспорта лекарств применяются и другие небольшие молекулы. Инсулин, пептиды NGR и NGF, а также ингибирующий желатиназу пептид STTHWGFTCL способны специфически связываться с мишенью. Эти лиганды конъюгировали с самыми разнообразными переносчиками лекарств — от липосом и полимерных наночастиц до квантовых точек; все они могут применяться для связывания со специфическими клетками и тканями в терапевтических и диагностических целях [6].

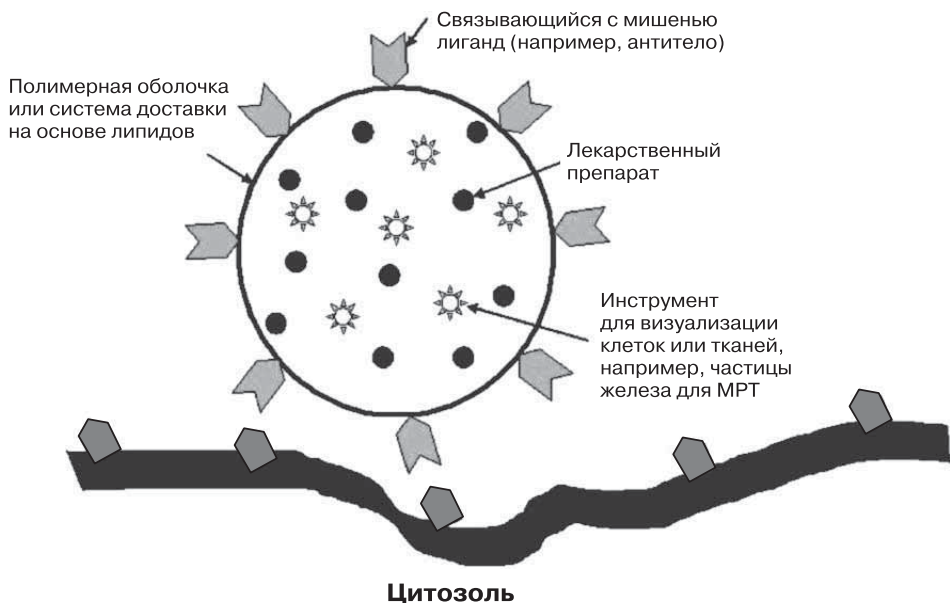


Рис. 5.1. Схематичное изображение полифункциональной наночастицы

5.4. Полифункциональные системы на основе наночастиц

Применение нанотехнологий в биомедицине не сводится только лишь к созданию систем доставки лекарств. Ученые решают задачу синтеза полифункциональных наночастиц (рис. 5.1), которые были бы способны не только переносить препарат, но и выполнять другие функции. Для создания полифункциональных наночастиц разработано несколько подходов. Наиболее распространенным методом является одновременное присоединение нескольких молекул с разными функциями, а также сочетание лекарственных препаратов с наиболее перспективными системами доставки.

5.4.1. Поливалентные носители

Некоторые системы позволяют одновременно переносить несколько соединений, что достигается путем инкапсулирования, конъюгации или сочетания обоих методов. Это относится к полимерным системам, включая конструкции на основе дендримеров и углеродных нанотрубок.

5.4.1.1. Дендримеры

Дендримеры — идеальные системы для выполнения нескольких функций, поскольку они способны включать в себя лекарственные препараты за счет ковалентных и нековалентных взаимодействий. Разветвленная структура дендримеров позволяет присоединять к ним сразу несколько веществ. Кроме того, дендримеры, которые являются одномолекулярными мицеллами, могут переносить вещества, заключая их в свое гидрофобное ядро. Таким образом, полифункциональную систему создают путем включения одного типа молекул в ядро мицеллы и присоединения другого типа молекул к ее поверхности. Так, например, были синтезированы дендримерные переносчики, содержащие контрастное вещество флуоресцеинизотиоцианат, а затем получены их конъюгаты с фолатом, что позволяет доставлять такие структуры к раковым клеткам. Далее конъюгированные дендримеры связывали с лекарственными препаратами метотрексатом и таксолом. Подобные системы на основе дендримеров выполняют две функции: позволяют обнаруживать злокачественные клетки и доставляют к ним противоопухолевый препарат. При этом используется возможность осуществления ковалентных взаимодействий и нековалентного связывания [65, 66]. Также были созданы небольшие дендримерные переносчики для доставки гадолиния — контрастного вещества для МРТ. Возможно, в будущем к поверхности таких переносчиков удастся присоединять различные химические вещества, что позволит одновременно решать задачи диагностики и лечения [6].

5.4.1.2. Полимерные нанопереносчики

Нанопереносчики, образованные из линейных полимеров, например сополимера молочной и гликолевой кислот (ПМГК) или поликапролактама (ПКЛ), также обладают способностью к поливалентным взаимодействиям. Одно вещество можно включить в гидрофобное ядро мицелл или внутрь матрицы полимерной наносферы, а другое — связать с модифицированной поверхностью этих структур. В роли таких веществ выступают лиганды для прикрепления к мишени, лекарства или другие полимеры, изменяющие способность системы высвободить заключенный в ней препарат. В результате можно создавать полимерные переносчики, соединяющие функцию визуализации с доставкой лекарства или способные одновременно переносить несколько препаратов, либо одновременно транспортировать лекарства и биологические молекулы, например пептиды или нуклеиновые кислоты. Кроме того, модификация поверхности позволяет использовать полимерные мицеллы в качестве покровных материалов для тканевой инженерии. Исследования с пиреном в виде модельного лекарства показали, что покрытие полимерных мицелл помогает контролировать высвобождение лекарственного препарата с поверхности мицеллы [27]. Таким образом, можно покрывать искусственные ткани мицеллами, нагруженными лекарствами или ростовыми факторами, для контролируемого высвобождения этих веществ, предотвращающих заражение или усиливающих регенерацию тканей.

5.4.1.3. Углеродные нанотрубки

Углеродные нанотрубки (УНТ) представляют собой свернутые графитовые листы. Они бывают однослойными или многослойными. Оба типа трубок могут иметь различную структуру и чистоту [67–69]. В обзоре Бьянко с соавторами [67] подробно обсуждаются возможности применения УНТ для доставки лекарств, пептидов и генов.

Углеродные нанотрубки модифицируют с помощью ковалентных или нековалентных взаимодействий с целью повышения их биосовместимости, растворимости и емкости по отношению к лекарственному препарату. Большинство исследований в области создания полифункциональных УНТ направлено на изучение возможностей ковалентного присоединения различных молекул. Для повышения растворимости и емкости по препарату обычно производят модификацию поверхности внешней стенки трубки, а карбоксильные группы, как правило, прикрепляют к концам УНТ. Дополнительные модификации внешней стенки трубки приводят к созданию функциональных и растворимых носителей. К таким поверхностям ковалентно можно привязывать антигены для соединения с клеткой-мишенью, флуоресцентные зонды, лекарственные препараты, пептиды и другие биологические молекулы [67–70].

Присоединение к одной трубке нескольких веществ позволяет создавать полифункциональные системы. Например, Ву с соавторами с помощью множества ковалентных взаимодействий создали УНТ, которую можно использовать как для доставки лекарственных препаратов, так и для получения изображений. К аминок группам на поверхности нанотрубок ковалентно присоединяли противогрибковый препарат амфотерицин В. Кроме того, к поверхности трубок прикрепляли молекулу флуоресцеина — флуоресцентный зонд. Для обеспечения успешного присоединения обоих заместителей использовали схему ортогональной защиты. Было показано, что связанные молекулы сохраняют свою функциональность при захвате клетками млекопитающих: флуоресцеин сохранял оптические свойства, а амфотерицин — противогрибковую активность [70].

5.4.2. Свойства исходного материала

Некоторые материалы, например металлы и керамика, обладают свойствами, позволяющими использовать их в клинической практике: многие металлы легко намагничиваются, нагреваются или флуоресцируют при наложении магнитного или электрического полей [71]. Керамика обладает интересными структурными свойствами, которые делают возможным ее использование в тканевой инженерии [72]. Такие материалы можно применять для транспортировки биологически активных молекул. Создаваемые на их основе системы доставки лекарственных препаратов полифункциональны, что продиктовано самой природой вещества нанопереносчика.

5.4.2.1. Электрические свойства

Способность металлических частиц проводить электрический ток позволяет использовать их для доставки и активации биологических молекул. Несколько исследований было посвящено функциональной модификации наночастиц золота с помощью окислительно-восстановительных ферментов. Золото усиливает перенос электронов, повышая активность ферментов. Таким образом, его частицы способны одновременно выступать в роли переносчиков ферментов и проводников электронов, необходимых для проявления ферментативной активности [71, 73]. Нанопроволоки на основе наночастиц золота и окислительно-восстановительных ферментов также могут использоваться в качестве высокоточных биосенсоров [73].

Изучению потенциала переноса электронов в блок-сополимерах было посвящено несколько исследований [74]. Полимерные мицеллы, образованные такими сополимерами, могут использоваться для доставки и активации ферментов, подобно наночастицам золота.

5.4.2.2. Оптические свойства

Оптические свойства некоторых металлов позволяют создавать системы на основе наночастиц, которые используются как для получения изображений клеток и тканей, так и для доставки лекарственных препаратов. Квантовые точки представляют собой небольшие полупроводниковые кристаллы; они применяются для получения изображений, начиная с 1980-х гг. Квантовые точки конъюгировали с множеством биологических молекул, включая пептиды, антитела и олигонуклеотиды. Такие частицы используют для получения изображений живых тканей, в том числе опухолевых клеток и генов. Кроме того, иногда к квантовым точкам присоединяют молекулы лекарственных препаратов, что позволяет создать систему, одновременно служащую для получения изображений и для доставки лекарств [75].

5.4.2.3. Магнитные свойства

Магнитные металлические наночастицы активно используются в магнитно-резонансной томографии (МРТ). Например, в качестве контрастного агента для МРТ применяют оксид железа, соединенный с декстраном. Кроме того, частицы оксида железа связывали с инсулином для ослабления интернализации токсичных магнитных частиц. Возможно, в будущем такие частицы удастся соединить с молекулами лекарственных препаратов, что позволит создать магнитные наночастицы, пригодные как для получения изображений, так и для доставки лекарств [4, 6].

5.4.2.4. Термальные свойства

Некоторые металлы можно нагревать путем передачи энергии магнитного поля или света и применять для разрушения опухолей методом гипертермии [76]. Возможно, что наночастицы золота или другого металла, содержащие противо-

опухолевые препараты, в будущем можно использовать для устранения опухоли за счет не только действия лекарства, но и тепловой обработки [76–78].

5.4.2.5. Структурные свойства

Керамические наночастицы активно применяют для воссоздания костной ткани или биосовместимых покрытий в тканевой инженерии. Однако эти частицы способны выполнять и другие функции. В частности, была изучена возможность направленной доставки ванкомицина и гентамицина с помощью нанокapsул гидроксипатита и нанокристаллов сульфата кальция. Такие системы можно использовать для обеспечения прочности костной ткани и лечения инфекции данной ткани — остеомиелита [79]. Сообщалось также о включении ростовых факторов в керамические наночастицы для использования в тканевой инженерии. В этом случае керамические частицы выполняют двойную функцию — обеспечивают прочность ткани и способствуют регенерации кости под действием факторов роста [72].

5.4.2.6. Полимерные мицеллы в качестве нанореакторов

Полимерные мицеллы способны захватывать металлические наночастицы; это свойство используют для создания контрастного агента для МРТ и других методов получения изображений. Некоторые полимеры могут присоединять соли металлов и взаимодействовать с ними с образованием хелатных комплексов. В результате мицелла служит в качестве реактора для производства металлических частиц [74]. Микросреда, создаваемая в ядре полимерной мицеллы, может быть модифицирована так, чтобы выступать в роли микрореактора для синтеза или активации биологически активных веществ, лекарств или факторов роста.

5.5. Заключение

Изменение свойств вещества на атомном уровне позволяет расширять спектр возможных применений биомедицинской инженерии, включая направленную доставку лекарственных препаратов. За последние годы появились новые возможности для синтеза наночастиц на основе дендримеров, липосом, мицелл, а также металлов и полимеров. Последние достижения в области молекулярной биологии позволяют получать новые лиганды, разрабатывать новые способы визуализации и диагностические устройства, которые являются основой успеха в создании систем доставки лекарственных препаратов. Эффективность терапевтических методов в будущем значительно повысится благодаря созданию полифункциональных нанотехнологических систем.

Применение достижений нанотехнологии в медицине привлекает внимание правительств и промышленного сектора многих стран. В 2004 г. мировой объем финансирования нанотехнологических отраслей достиг приблизительно 3 млрд долларов США, а по прогнозам на следующие десятилетия ежегодный объем финансирования возрастет в несколько раз. На рынке лекарственных

средств уже появились препараты, доставка которых в организме происходит с помощью методов нанотехнологии, некоторые из лекарств уже проходят клинические испытания. Эти вещества изменяют современные методы лечения, а подобные технологии будет и в дальнейшем привлекать внимание исследователей, государственных фондов и частных инвесторов.

Литература

1. Roco M. Nanotechnology: convergence with modern biology and medicine. *Cur. Opin. Biotechnol.* 2003; 14: 337–346.
2. National nanotechnology initiatives Advisory on nanobiotechnology. National Science Foundation (NNI); 2003; 1–108.
3. Gourley P. Brief overview of biomimetic nanotechnologies. *Biotechnol. Prog.* 2005; 21 (1): 2–10.
4. Sahoo A.K., Labhasetwar V. Nanotech approaches to drug delivery and imaging. *Drug. Discov. Today* 2003; 24: 1112–1120.
5. Sinkula M., Paul R. Investing in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* 2003; 10: 1144–1147.
6. Koo O.M., Rubinstein I., Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2005; 1: 193–212.
7. Loo C., Lowery A., Halas N., West J. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nanolett.* 2005; 5(4): 709–711.
8. Trehin R., et al. Fluorescent nanoparticle uptake for brain tumor visualization. *Neoplasia* 2006; 8(4): 302–311.
9. Cyrus T., et al. Three-dimensional molecular imaging of intramural biomarkers with targeted nanoparticles. *J. Cardiovasc. Magn. Reson.* 2006; 8(3): 535–541.
10. Zharov V., Mercer K., Galitovskaya E., Smeltzer M. Photothermal nanotherapeutics and nanodiagnostics for selective killing of bacteria targeted with gold nanoparticles. *Biophys. J.* 2006; 90(2): 619–627.
11. Sullivan D., Ferrari M. Nanotechnology, tumor imaging-seizing an opportunity. *Mol. Imaging* 2004; 3(4): 364–369.
12. Bertin P., et al. Multifunctional polymeric nanoparticles from diverse bioactive agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128(13): 4168–9.
13. Grodzinski P., Silver M., Molnar L. Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6(3): 307–318.
14. Orive G., Pedraz J.L. Drug delivery in biotechnology: present and future. *Cur. Opin. Biotechnol.* 2003; 14: 659–664.
15. Carino G., Edith M. Oral-insulin delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999; 35: 249–257.
16. McAllister D., Prausnitz M. Microfabricated microneedles for gene and drug delivery. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2000; 2: 289–313.
17. Khademhosseini A., Langer R. Nanobiotechnology for tissue engineering and drug delivery, *Chemical Engineering Program*, 2006; 102: 38–42.
18. Otilia K., Onyuksel H. Role of nanotechnology in targeted drug delivery and imaging: a concise review. *Nanomedicine* 2005; 1: 193–212.
19. Visser C.C., et al. Nanoparticles bearing polyethylene glycol-coupled transferrin as gene carriers: preparation and *in vitro* evaluation. *Int. J. Pharm.* 2005; 25: 299–305.
20. Leamon C.P., Reddy J.A. Folate-targeted chemotherapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 80: 1127–1141.

21. Alvarez V., Sanz L. Antibody engineering: facing new challenges in cancer therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* 2005; 6: 641–648.
22. Majeti R.K. Nano and micro particles as controlled drug delivery devices. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2000; 3(2): 234–258.
23. Saltzman W., Baldwin S. Materials for protein delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1998; (33): 71–86.
24. Owens D.E., III Peppas N.A. Opsonization, biodistribution, and pharmacokinetics of polymeric nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2006; 307: 93–102.
25. Kataoka K., Harada A., Nagasaki Y. Block copolymer micelles for drug delivery: design, characterization and biological significance. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 113–131.
26. Teixeira M., Alonson M.J., Pinto M.M.M., Barbosa C.M. Development and characterization of PLGA nanospheres and nanocapsules containing xanthaone and 3-methoxy-anthone. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 59: 491–500.
27. Otsuka H., Nagasaki Y., Kataoka K. PEGylated nanoparticles for biological and pharmaceutical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003; 44: 402–419.
28. Kearsey J. Strategies for intracellular drug delivery. *The Drug Delivery Companies Report*, 2004. 43–46.
29. Hoffman A. Design of smart polymers that can direct intracellular drug delivery. *Polym. Adv. Technol.* 2002; 13: 992–999.
30. Torchilin V. Recent approaches to intracellular delivery of drugs and DNA and organelle targeting. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2006; 8: 343–375.
31. Nishiyama N., Bae Y., Miyata K., Fukuchima S. Smart polymeric micelles for gene and drug delivery. *Drug Discov. Today: Technol.* 2005; 2: 21–26.
32. Shi G., Gui W., Stephenson S.M., Lee R.J. Efficient intracellular drug and gene delivery using folate receptor-targeted pH-sensitive liposomes composed of cationic/anionic lipid combinations. *J. Control. Rel.* 2002; 80: 309–319.
33. Liang L., Ping J., Ming C., Guoliang Z., Fengbao Z. 5-Fluorouracil-loaded self-assembled pH-sensitive nanoparticles as novel drug carrier for treatment of malignant tumors. *Chin. J. Chem. Eng.* 2006; 14: 377–382.
34. Lo C.L., Lin K.M., Hsiue G.H. Preparation and characterization of intelligent core—shell nanoparticles based on poly(D,L-lactide)-g-poly(*N*-isopropyl acrylamide-co-methacrylic acid). *J. Control. Rel.* 2005; 104: 477–488.
35. Meissner Y., Pellequer Y., Lamprecht A. Nanoparticles in inflammatory bowel disease: particle targeting versus pH-sensitive delivery. *Int. J. Pharma.* 2006; 316: 138–143.
36. Chaw C.S., et al. Thermally responsive core—shell nanoparticles self-assembled from cholesteryl end-capped and grafted polyacrylamides: drug incorporation and *in vitro* release. *Biomaterials* 2004; 25: 4297–4308.
37. Bae Y., Fukushima S., Harada A. Design of environment-sensitive supramolecular assemblies for intracellular drug delivery: polymeric micelles that are responsive to intracellular pH change. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2003; 42: 4640–4643.
38. Kataoka K., et al. Doxorubicin-loaded poly(ethylene glycol)—poly(6-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *J. Control. Rel.* 2000; 64: 143–153.
39. Gil E.S., Hudson S.M. Stimuli-responsive polymers and their bioconjugates. *Prog. Polym. Sci.* 2004; 29: 1173–1222.
40. Cammas S., et al. Thermo-responsive polymer nanoparticles with a core-shell micelle structure as site-specific drug carriers. *J. Control. Rel.* 1997; 48: 157–164.
41. Berg K., et al. Photochemical internalization: a novel technology for delivery of macromolecules into cytosol. *Cancer Res.*, 1999; 59(6): 1180–1183.

42. Engesaeter B., et al. PCI-enhanced adenoviral transduction employs the known uptake mechanism of adenoviral particles. *Can. Gen. Ther.* 2005; 12(5): 439–448.
43. Berg K., Selbo P., Prasmickaite L., Hogset A. Photochemical drug and gene delivery. *Curr. Opin. Mol.* 2004; 6(3): 279–287.
44. Berg K., Dietze A., Kaalhus O., Hogset A. Site-specific drug delivery by photochemical internalization enhances the antitumor effect of bleomycin. *Clin. Cane. Res.* 2005; 11(23): 8476–85.
45. Derycke A., De Witte P. Liposomes for photodynamic therapy. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56(1): 17–30.
46. Chen B., Pogue B., Hasan T. Liposomal delivery of photosensitising agents. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2005; 2(3): 477–487.
47. Konan Y., Gurny R., Allemann E. State of the art in the delivery of photosensitizers for photodynamic therapy. *J. Photochem. Photobiol. B* 2002; 66(2): 89–106.
48. Ideta R., et al. Nanotechnology-based photodynamic therapy for neovascular disease using a supramolecular nanocarrier loaded with a dendritic photosensitizer. *Nanoletters* 2005; 5(12): 2426–31.
49. Leach J. Thesis on magnetic targeted drug delivery. Virginia Polytechnic; 2003: 83.
50. Hofer K. Hyperthermia and cancer, In: Fourth International Conference on Scientific and Clinical Applications of Magnetic Carriers. 2002; 12: 78–80.
51. Ng K.-Y., Matsunaga T. Ultrasound Mediated Drug Delivery. In: Wang B., editor. *Drug Delivery: Principles and Application*. Wiley; 2005.
52. Rapaport N. Cancer therapy by micellar-encapsulated drug and ultrasound. *Int. J. Pharm.* 2004; 277: 155–162.
53. Farokhzad O.C., et al. Nanoparticle-aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Can. Res.* 2004; 64: 7668–7672.
54. Pestourie C., Tavitian B., Duconge F. Aptamers against extracellular targets for *in vivo* applications. *Biochimie* 2005; 87: 921–930.
55. Farokhzad O.C., et al. Targeted nanoparticle-aptamer bioconjugates for cancer chemotherapy *in vivo*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 6315–6320.
56. Russell-Janes G.J., Veitch H., Arthur L. Lectin-mediated transport of nanoparticles across Caco-2 and OK cells. *Int. J. Pharm.* 1999; 190: 165–174.
57. Li Y., Ogris M., Wagner E., Pelisek J., Rueffer M. Nanoparticles bearing polyethylene glycol-coupled transferrin as gene carriers: preparation and *in vitro* evaluation. *Int. J. Pharm.* 2003; 229: 93–101.
58. Nah J.W., Yu L., Han So, Ahn C.H., Kim S.W. Artery wall binding peptide-poly(ethylene glycol)-grafter- poly(L-lysine)-based gene delivery to artery wall cells. *J. Control. Rel.* 2002; 78: 273–284.
59. Malavasi F., Funaro A. Monoclonal antibodies for therapy of human cancers. *Biotechnol. Adv.* 2000; 18: 385–401.
60. Lee R., Lawrence L. Bispecific antibodies: targeting cancer and much more. *Exp. Hematol.* 2006; 34: 1–6.
61. Rong-Lu Z., Kopecek J. Design of novel bioconjugates for targeted drug delivery. *J. Control. Release* 2001; 78: 165–173.
62. Peppas N.A., Kavimandan N.J. Nanoscale analysis of protein and peptide absorption: insulin absorption using complexation and pH-sensitive hydrogels as delivery vehicles. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2006 (1): 83–87.
63. Mitra A., et al. Targeting tumor angiogenic vasculature using polymer-RGD conjugates. *J. Control. Release* 2005; 102: 191–201.

64. Dharap S.S., et al. Molecular targeting of drug delivery systems to ovarian cancer by BH3 and LHRH peptides. *J. Control. Release* 2003; 91: 61–73.
65. Gillies E.R., Frechet J.M.J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Disc. Today* 2005; 10: 35.
66. Patri A.K., Majoros I.J., Baker J.R. Dendritic polymer macromolecular carriers for drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2002; 6: 466–471.
67. Bianco A., Kostarelos K., Prato M. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005; 9: 674–679.
68. Pantarotto D., et al. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem. Biol.* 2003; 10: 961–966.
69. Klumpp C., Kostarelos K., Prato M., Bianco A. Functionalized carbon nanotubes as emerging nanovectors for the delivery of therapeutics. *Biochim. Biophys. Acta* 2006; 1758: 404–412.
70. Wu W., et al. Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 44: 6358–6362.
71. Penn S.G., He L., Natan M.J. Nanoparticles for bioanalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2003; 7: 609–615.
72. Ben N. Natural, bioceramics: from coral to bone and beyond. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2003; 7: 283–288.
73. Yeh J.I., Zimmt M.B., Zimmerman A.L. Nanowiring of a redox enzyme by metallized peptides. *Biosens. Bioelectron.* 2005; 21: 973–978.
74. Riess G. Micellization of block copolymers. *Prog. Polym. Sci.* 2003; 12: 87–91.
75. Chan W. Bionanotechnology progress and advances. *Am. Soc. Blood Marrow Transpl.* 2006; 12: 87–91.
76. Shinkai M., et al. Intracellular hyperthermia for cancer using magnetite cationic liposomes. *J. Magn. Magn. Mater.* 1999; 194: 176–184.
77. Myer L., et al. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.* 2004; 11: 169–183.
78. Yang Y.C., Hwu Y.K., Je J.H. Synchrotron X-ray synthesis of colloidal gold particles for drug delivery. *Mater. Chem. Phys.* 2006.
79. Rauschmann M.A., et al. Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections. *Biomaterials* 2005; 26: 2677–2684.

ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ И НАНОПРИСТЫЕ МЕМБРАНЫ ДЛЯ КОНТРОЛИРУЕМОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ И ГЕНОВ

Цзиньцзяо Гуань, Хуньянь Хе, Бо Юй и Л. Джеймс Ли

6.1. Введение

Традиционные лекарства представляют собой небольшие молекулы, а среди новых все чаще встречаются макромолекулы, например белки или пептиды. Конечно, в эффективном лечении важнейшую роль играют терапевтические свойства препарата, но очень важно правильно разработать систему его доставки в организм. Кроме того, в генной терапии, которая, возможно, произведет революционный переворот в современной медицине, для лечения или предотвращения заболеваний используются нуклеиновые кислоты. Однако развитие генной терапии в значительной степени сдерживается отсутствием эффективной и безопасной системы доставки генов.

В последние сорок лет ведется активная работа по созданию систем транспорта лекарств и нуклеиновых кислот. Они должны обладать хотя бы одним из перечисленных ниже качеств: повышать терапевтическое действие препарата, быть удобными для пациента и снижать стоимость лечения. Специфические задачи, которые решаются при создании нового метода доставки препарата, могут различаться, но чаще всего целью синтеза таких систем является транспорт лекарств непосредственно к пораженным органам, тканям или клеткам, снижение побочного действия (инфекция, системная токсичность или нежелательная иммунная реакция), повышение биодоступности препарата, оптимизация фармакокинетики, минимизация риска и дискомфорта при приеме, возможность самостоятельного применения препарата и уменьшение участия медицинского персонала, а также снижение стоимости лекарства [1]. Основным стимулом активного развития систем доставки лекарственных препаратов и генов является появление лекарств на основе белков, пептидов и нуклеиновых кислот. Эти вещества могут оказывать мощное действие, однако они дороги и нестабильны. Их доставка к определенным тканям или клеткам эффективным, контролируемым, безопасным и удобным для пациента способом является основной задачей исследований в этой области.

Относительно недавно ученые начали активно заниматься разработкой полимерных систем транспорта, которые обладают интересными структурными свой-

ствами и размерами в нанометровом диапазоне. Полимеры — макромолекулы, построенные из ряда идентичных или похожих повторяющихся звеньев, образующих протяженные цепи. Состав, структура и свойства полимеров чрезвычайно разнообразны. Некоторые их характеристики — биосовместимость, возможность биологического разложения, разнообразные механические свойства, а также легкость производства и модификаций, делают полимеры весьма перспективными для создания систем доставки. Кроме природы самого материала в синтезе такой структуры большую роль играет размер частиц. Живую клетку можно рассматривать как совокупность действия наномеханизмов (ионных каналов, рибосом и т. п.), и здесь важно, что размеры большинства лекарств и генов как раз находятся в нанометровом диапазоне. Кажется очевидным, что системы доставки на основе наночастиц с большой эффективностью могут взаимодействовать как с биологическими структурами, так и с лекарствами или генами.

В этой главе рассматриваются три типа полимерных наноструктур, использующихся для транспортных целей: наночастицы, мембраны с размером пор в несколько нанометров и нановолокна. Сначала мы коснемся вопросов, связанных с созданием полимерных наноструктур и возможностями их применения для доставки лекарств и генов, а затем кратко остановимся на перспективах этой быстро развивающейся новой области исследований.

6.2. Наночастицы для доставки лекарств и генов

Наночастицы достаточно активно изучаются в рамках разработки систем доставки лекарств или генов, и некоторые препараты на основе наночастиц, такие как Доксил или Абраксан, уже находят применение в клинической практике. Чрезвычайно важной характеристикой наночастиц является их размер (мы обсудим этот вопрос подробнее в следующем разделе). Но поскольку системы доставки работают в биологических жидкостях, и синтез большинства наночастиц происходит в водных средах, то еще одну важную роль в синтезе, структуре, свойствах и функционировании наночастиц играет растворимость полимеров в воде. Поэтому далее мы проанализируем классификацию наночастиц на основании растворимости в воде образующего их полимера. Иногда для получения наночастиц используют одновременно несколько типов полимеров. В таких случаях классификация производится по тому полимеру, который в большей степени определяет метод синтеза и свойства наночастиц.

6.2.1. Роль размера наночастиц в системах доставки лекарств и генов

Традиционно лекарства вводят в организм в виде свободных молекул. Это наиболее простой путь, однако для его применения существуют многочисленные ограничения, например для цитотоксических химиотерапевтических препаратов или лабильных химических веществ. В последние годы ведется активное изучение частиц, размер которых составляет несколько микрометров (микро-

частицы), для использования в качестве носителей лекарств или генов. Например, пористые микрочастицы диаметром 20 мкм использовали для доставки лекарства в легкие путем ингаляции [2], а частицы размером более 40 мкм — для эмболизационной терапии [3]. На шкале размеров между свободными молекулами лекарств и микрочастицами размещаются частицы с размерами от 10 до 1000 нм. Преимущества систем на основе частиц такого размера перед свободными препаратами и микрочастицами заключаются в лучшей защите лекарства (гена), возможности доставки малорастворимых препаратов, продолжительном времени высвобождения, длительной циркуляции, направленного действия на органы (или ткани, или клетки), проникновении внутрь клеток, а также в преодолении защитных барьеров организма. Ниже мы рассмотрим эти преимущества подробнее.

6.2.1.1. Защита лекарства (гена)

Для достижения высокой эффективности действия препарата, а также для удобства пациента обычно стремятся достичь длительного высвобождения препарата (гена) из наночастиц. Однако многие лекарства, особенно белки, пептиды и нуклеиновые кислоты, в организме подвергаются быстрому выведению или расщеплению. Таким образом, до высвобождения подобных веществ необходимо обеспечить их защиту от расщепления и нежелательных взаимодействий. Кроме того, она необходима для достижения направленного действия препаратов при внутривенном или пероральном введении, поскольку до проникновения к органу-мишени лекарствам предстоит преодолеть ряд биологических или физиологических барьеров.

6.2.1.2. Доставка малорастворимых соединений

Многие лекарства плохо растворяются в воде, что влечет за собой их низкую биодоступность или вызывает необходимость применения в форме, оказывающей серьезное побочное действие. Одним из примеров может служить паклитаксел — противоопухолевый препарат, который очень плохо растворяется в воде. В настоящее время его вводят пациентам в растворителе Cremophor EL, нередко вызывающем острую реакцию гиперчувствительности. Кроме того, многие потенциально активные терапевтические средства не проходят начальных стадий испытаний из-за низкой растворимости, что сводит на нет многочисленные усилия разработчиков [4]. В этом случае включение плохо растворимых молекул лекарственного вещества в наночастицы может оказаться довольно простым и общим решением проблемы.

6.2.1.3. Продолжительное высвобождение

Для достижения оптимального терапевтического действия и для удобства пациента во многих случаях необходимо добиваться продолжительного времени высвобождения препарата. В экспериментах с крысами-диабетиками было показано, что подкожные инъекции нагруженных инсулином полимерных наночастиц размером 85–185 нм оказывают значительно более длительное гипогли-

кемическое действие, чем свободный инсулин [5]. В другом исследовании при внутримышечном введении наночастиц сополимера полимолочной и гликолевой кислоты размером 600 нм, несущих плазмидную ДНК, удавалось достичь продолжительной экспрессии гена [6]. Хотя микрочастицы также позволяют увеличить продолжительность циркуляции лекарства, в крови в качестве депо-препаратов можно использовать только наночастицы [7].

6.2.1.4. Длительное время циркуляции

Лекарства, предназначенные для внутривенного введения, должны длительное время находиться в крови. Это является обязательным условием направленной доставки и продолжительного высвобождения. Верхний предел размера циркулирующих жестких частиц ограничивается диаметром мельчайших капилляров и составляет около 5 мкм. Частицы с размерами в несколько микрометров быстро захватываются ретикулоэндотелиальной системой в отличие от частиц, не превышающих 200 нм, которые могут циркулировать в крови более продолжительное время, благодаря соответствующим свойствам своей поверхности [7, 8].

6.2.1.5. Направленная доставка

Целевая доставка препарата — один из важнейших принципов лекарственной (генной) терапии. Направленное действие наночастиц происходит на разных уровнях — от органов и тканей до отдельных клеток и даже внутриклеточных областей. Проникновение к органам и тканям может достигаться за счет разного размера пор сосудистой системы. Например, кровеносные сосуды печени имеют поры размером от 106 до 175 нм [9]. Таким образом, направленная доставка препаратов к ним достигается за счет соответствующего размера частиц и определенных свойств их поверхности. Многие типы опухолей характеризуются крупными сосудистыми порами — от 380 до 780 нм. Поэтому циркулирующие наночастицы размером от 100 до 300 нм могут проходить через них и накапливаться в опухолевой ткани за счет эффекта усиления проницаемости и удерживания [10]. Кроме того, присоединение специфических лигандов позволяет производить доставку наночастиц практически к любому доступному типу клеток с известными клеточными рецепторами.

6.2.1.6. Усиление захвата клетками

В то время как фагоцитирующие клетки с большей эффективностью взаимодействуют с частицами размером в микрометровом диапазоне, нефагоцитирующие клетки, которые обычно являются мишенью действия лекарств, преимущественно поглощают нанометровые частицы. Было показано, что наночастицы размером 100 нм захватывались клетками линии Сасо-2 в 2,5 и 6 раз эффективнее, чем частицы размером 1 и 10 мкм соответственно [11]. Аналогичные результаты были получены в экспериментах с другой клеточной линией [12]. Анализ трансфекции генов также показал, что ДНК-содержащие частицы размером меньше 100 нм переносились в клетки COS-7 в 27 раз эффек-

тивнее, чем частицы размером более 100 нм [13]. Кроме того, величина наночастиц влияет на способ их интернализации [14], что позволяет следить за ними даже тогда, когда они находятся внутри клетки. Это особенно важно для доставки лекарств или генов, которые должны функционировать в определенном участке клетки.

6.2.1.7. Преодоление защитных барьеров организма

Малый размер наночастиц облегчает их прохождение через разные барьеры организма. Наиболее распространенным способом введения препаратов является пероральный прием, однако он не подходит для лекарств, разлагающихся в ЖКТ и плохо проникающих через кишечный эпителий. Полимерные наночастицы могут не только защитить содержащиеся в них лекарства от расщепления и продлить их пребывание в ЖКТ, но и позволяют им проникать сквозь слизистую оболочку кишечника [15]. Таким способом удалось повысить биодоступность гепарина, инсулина, пептидов и паклитаксела [5, 16–18]. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) — еще одна преграда, которую не могут преодолевать лекарства. Он образуется за счет тесного контакта между эндотелиальными клетками капилляров и защищает центральную нервную систему (ЦНС) от воздействия опасных веществ, находящихся в крови. Большинство препаратов не могут проникать в ЦНС. Таким образом, преодоление ГЭБ — важная проблема при создании лекарств для лечения опухолей головного мозга. Исследования показали, что наночастицы способны проникать сквозь ГЭБ [19], а по последним данным наночастицы с диаметром менее 100 нм преодолевают ГЭБ гораздо более эффективно, чем частицы большего размера [20].

6.2.2. Наночастицы из нерастворимых в воде полимеров

Наночастицы из нерастворимых в воде полимеров могут образовываться как из уже готовых полимеров, так и из мономеров. Полимолочная кислота (ПМК) и сополимер молочной и гликолевой кислот (ПМГК) — гидрофобные высокомолекулярные соединения, которые используются достаточно часто, поскольку являются биосовместимыми, биоразлагаемыми и допущены FDA* к применению в составе лекарственных средств. Чтобы придать поверхности наночастиц необходимые свойства, которые определяют возможность их взаимодействия с биологическими системами и позволяют использовать в качестве переносчиков лекарств или генов, в их состав обычно вводят амфифильные сополимеры. В частности, гидрофильный полимер полиэтиленгликоль (ПЭГ) сополимеризуют с различными гидрофобными полимерами, в результате чего образуются амфифильные блок-сополимеры, такие как ПЭГ–ПМК или ПЭГ–ПМГК. Обычно их используют для получения покрытых полиэтиленгликолем (пэгилированных) наночастиц. Наночастицы изготавливают и из многих

* FDA (Food and Drug Administration) — Федеральное агентство США по контролю качества продуктов питания и лекарственных средств.

других гидрофобных полимеров или их производных, например поликапролактама (ПКЛ) или полиалкилцианоакрилата. Ниже рассмотрено несколько методов получения наночастиц из гидрофобных полимеров.

6.2.2.1. Образование наночастиц путем преципитации полимера

Образование эмульсии/выпаривание растворителя

В этом методе полимер растворяют в несмешивающемся с водой органическом растворителе, дихлорметане, хлороформе или этилацетате. В нем же растворяют или диспергируют лекарственный препарат. При добавлении такого раствора к большому объему воды с последующей гомогенизацией образуются система с мелкими капельками полимера — так называемая эмульсия типа масла в воде. Для стабилизации капелек в качестве эмульгаторов обычно используют поверхностно-активные вещества, например поливиниловый спирт. После выпаривания органического растворителя остаются твердые полимерные наночастицы. Для инкапсулирования водорастворимых лекарственных препаратов их обычно растворяют в воде и эмульгируют в масляной фазе, что приводит к образованию эмульсии воды в масле. Затем эту эмульсию воды в масле вновь эмульгируют в воде, в результате чего образуется эмульсия вода–масло–вода [21]. Именно таким методом были синтезированы наночастицы из ПЭГ-сополимера молочной и гликолевой кислот размером 200 нм, содержащие белковые и пептидные препараты [7]. Для образования эмульсии с наночастицами обычно применяют ультразвук или высокоскоростную гомогенизацию. В модифицированном методе с образованием эмульсии и выпариванием растворителя к органической фазе добавляют смешиваемый с водой умеренно полярный растворитель, например ацетон. Смешивание органической фазы с водой приводит к спонтанному образованию капелек нанометрового диаметра, возможно, за счет снижения поверхностного натяжения на границе водной и органической фаз а также за счет турбулентности, возникающей при быстрой диффузии ацетона в воде. Этот метод был использован для создания наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот размером 200–300 нм, содержащих 5-фторурацил [22].

Вытеснение растворителя

В отличие от описанной выше методики в этом случае для растворения полимера и лекарственного препарата применяют смешиваемый с водой растворитель, например этанол или ацетон. Лекарственный препарат должен быть нерастворим или очень плохо растворим в воде. При вливании раствора в воду происходит быстрая диффузия органического растворителя в воде, что приводит к преципитации полимера и лекарства в виде наночастиц. Для облегчения их образования и стабилизации можно использовать поверхностно-активные вещества: полоксамер 88, триблок-сополимер полиэтиленоксид/полипропиленоксид/полиэтиленоксид или соевый лектин [23]. Одним из примеров применения такой технологии является синтез наночастиц из сополимера молочной и гликолевой кислот размером 100 нм, содержащих модельный лекарственный

препарат кумарин-6 [24]. Для увеличения емкости наночастиц по отношению к липофильным препаратам в органическую фазу добавляют растворитель масел. У образующихся при этом наночастиц есть масляное ядро, окруженное полимерной оболочкой; такие структуры называют нанокапсулами. С помощью данного метода были синтезированы нанокапсулы из полимолочной кислоты размером 180 нм, содержащие галофантрин [23].

Высаливание

При этом способе раствор полимера и лекарства в смешивающемся с водой растворителе, например ацетоне, добавляют к насыщенному водному раствору соли, в частности к хлориду или ацетату магния, содержащему поливиниловый спирт [25]. Хотя ацетон смешивается с водой, при механическом воздействии из-за эффекта высаливания органического растворителя образуется эмульсия типа масло в воде. При добавлении в систему чистой воды происходит диффузия ацетона из масляной фазы в водную и образуются твердые полимерные наночастицы. С помощью данного приема удалось получить наночастицы из полимолочной кислоты, содержащие лекарственные препараты, с диаметром от 230 до 730 нм [25]. В другом исследовании были получены наночастицы из полимолочной кислоты и сополимера молочной и гликолевой кислот со средним размером частиц менее 200 нм [26].

Метод с использованием сверхкритического жидкого CO₂

Сверхкритический диоксид углерода (скCO₂) представляет определенный интерес для создания частиц с целью доставки лекарств, поскольку он нетоксичен, негорюч, недорог и безвреден для организма и окружающей среды [27]. Сверхкритический диоксид углерода используют в качестве растворителя для одновременного растворения лекарств и полимеров. Если такую смесь распылять через форсунку в камере с низким давлением, образуются содержащие лекарственный препарат полимерные микрочастицы [28]. Этот метод привлекателен тем, что не требует применения органического растворителя, однако возможности его ограничены из-за плохой растворимости высокомолекулярных полимеров в скCO₂. Однако низкая растворимость полимеров в скCO₂ используется в технике, называемой методом сверхкритического антирастворителя. В этом случае лекарство и раствор полимера в органическом растворителе распыляют в камере с скCO₂. Быстрая экстракция органического растворителя фазой скCO₂ приводит к осаждению наночастиц, содержащих лекарственный препарат [29].

6.2.2.2. Образование наночастиц путем полимеризации мономеров

С помощью данной технологии синтезируют наночастицы из полиалкилцианоакрилата (ПАЦА) — биоразлагаемого полимера, используемого в качестве адгезивного материала в хирургии. Для приготовления наночастиц алкилцианоакрилатный мономер, например изобутилцианоакрилат или изогексилцианоакрилат, добавляют к кислому водному раствору при интенсивном перемешивании, в результате чего образуется эмульсия. Затем происходит

полимеризация. В качестве стабилизатора коллоидных частиц используют поверхностно-активные вещества, декстран 70 или полисорбаты. Образуются наночастицы с диаметром в диапазоне размеров от 70 до 350 нм [5, 20, 30]. В частицы из полиалкилцианаакрилатов были введены многие лекарства (на старте полимеризации или после ее завершения), и они показали хорошие результаты в системах доставки лекарственных препаратов. В частности, включая в такие наночастицы доксорубин, удается преодолеть проблему множественной лекарственной устойчивости при лечении опухолевых заболеваний, которая препятствует эффективной химиотерапии [30, 31]. Наночастицы ПАЦА, содержащие инсулин, оказывают более продолжительное гипокликемическое действие путем введения под кожу, а также лучше всасываются при пероральном приеме, чем свободный инсулин [5]. Противоопухолевое действие антисмысловых олигонуклеотидов также значительно возросло при их введении в организм в составе наночастиц [32].

6.2.3. Наночастицы из водорастворимых полимеров

Водорастворимые полимеры широко применяются при синтезе наночастиц для доставки лекарств или генов. Такие полимеры могут быть природного или синтетического происхождения, среди них встречаются сополимеры весьма сложного строения. Растворимость полимеров в воде позволяет проводить синтез наночастиц без использования токсичных органических растворителей, которые способны денатурировать белки. Многие гидрофильные полимеры в воде имеют заряд и могут взаимодействовать с ионными лекарственными препаратами, что позволяет контролировать их связывание и высвобождение. Многие из таких полимеров содержат химически активные группы, их можно модифицировать, присоединяя функциональные молекулы. С другой стороны, так как полимеры растворимы в воде, их цепи должны быть связаны друг с другом, чтобы удерживать отдельные наночастицы в изолированном виде. В зависимости от того, используется ли для синтеза наночастиц заранее сформированный полимер или смесь мономеров, наночастицы из водорастворимых полимеров подразделяют на три группы: преформированные полимеры с перекрестными сшивками, самособирающиеся блок-сополимеры и полимеризованные мономеры.

6.2.3.1. Образование наночастиц из перекрестно-сшитых полимеров

Метод образования перекрестных сшивок используется при синтезе наночастиц для доставки лекарственных препаратов из различных гидрофильных полимеров. Процесс обычно начинают с растворения полимера в воде, промежуточно образуются различные фазы в ходе ионного гелеобразования, эмульгации, вытеснения растворителя, комплексной коацервации или индуцированной солью десольватации. Далее в результате образования перекрестных сшивок формируются наночастицы. В некоторых случаях обходятся без промежуточной стадии, и в результате возникновения перекрестных сшивок в полимере

сразу появляются наночастицы. Перекрестные сшивки могут образовываться за счет химических связей или физических взаимодействий.

Образование перекрестных сшивок путем химического связывания использовалось для получения желатиновых и полиэтилениминовых наночастиц для доставки лекарств и генов. Желатин — белковый продукт, который обычно получают путем частичного гидролиза коллагена. Это вещество принято считать безопасным, и оно уже долго используется в пищевой и фармацевтической промышленности. Желатин — амфотерный полиэлектролит, имеющий положительный заряд в кислых средах. При синтезе наночастиц на начальном этапе часто в результате эмульгации, вытеснения растворителя, комплексной коацервации или десольватации образуется отдельная фаза. Далее следует этап перекрестного сшивания с помощью глутарового альдегида или глиоксаля. В желатиновые наночастицы включали такие противоопухолевые препараты, как доксорубин [33], паклитаксел [34], цитарабин [35] и метотрексат [36], а также офтальмологические препараты — гидрохлорид пилокарпина и гидрокортизон [37]. Было изучено распределение в организме нагруженных паклитакселом желатиновых наночастиц [34]. Кроме того, с помощью этого метода в желатиновые наночастицы включали плазмидную ДНК [38, 39]. В одном исследовании нагруженные геном наночастицы из желатина и пэгилированного желатина со средним диаметром 200 нм вводили внутривенно или внутрь опухоли подопытным мышам, у которых наблюдался высокий уровень экспрессии репортерных генов [39]. Относительно недавно были получены желатиновые наночастицы, конъюгированные с антителами, связывающимися с клетками Т-клеточного лейкоза человека и нативными Т-лимфоцитами, что указывает на потенциальную возможность использования желатиновых наночастиц для направленной доставки лекарств и генов к специфическим типам клеток [40, 41]. Наночастицы из полиэтиленimina готовили путем образования перекрестных сшивок с полиэтиленоксидом в эмульсионной системе типа вода в масле [42]. Образующиеся наночастицы, названные наногелями, имели диаметр 20–220 нм и до введения в них лекарственного препарата обладали слабым положительным зарядом при pH 7,0 [43]. Катионную природу наногелей использовали для образования комплексов с отрицательно заряженными лекарственными препаратами, ретиноевой кислотой, индометацином, олигонуклеотидами и аналогами нуклеозидов [42–45]. Для осуществления направляемой рецепторами доставки лекарственных препаратов наногели конъюгировали с фолатом, трансферрином или инсулином [44, 45]. Выяснилось, что частицы наногеля с лекарством способны проникать сквозь поляризованный монослой эпителиальных клеток кишечника человека и сквозь слой эндотелиальных клеток капилляров мозга быка. В экспериментах *in vivo* было показано, что при внутривенном введении мышам наногеля с олигонуклеотидами накопление частиц происходит значительно активнее, чем при введении в свободном виде [45]. Эти данные указывают на потенциальную возможность применения перорального способа приема наногелей для доставки малорастворимых и высокомолекулярных препаратов, а также на способность препаратов проникать через ГЭБ.

Поскольку многие водорастворимые полимеры являются полиэлектролитами, для индуцирования перекрестных сшивок часто используют ионные взаимодействия. Так, наночастицы на основе альгината получают путем образования перекрестных сшивок между анионом альгината (из альгината натрия) и катионами кальция и (или) хитозаном либо поли-*L*-лизинном. Например, наночастицы альгината диаметром около 235 нм, содержащие несколько противотуберкулезных препаратов, вводили морским свинкам через легкие [46]. При таком способе введения биодоступность и длительность действия лекарств оказались значительно выше, чем при пероральном приеме свободных препаратов. Этим же методом были получены наночастицы альгината, содержащие плазмидную ДНК и олигонуклеотиды [47–49]. Тот же прием использовали и для хитозана — недорогого, биоразлагаемого, биосовместимого и биоадгезивного полисахарида, который в водных средах с кислым значением рН имеет высокую плотность положительно заряженных первичных аминогрупп. Кальво с соавторами синтезировали наночастицы хитозана, используя для образования перекрестных сшивок анионы триполифосфата [50]. Такие наночастицы обладают большой емкостью по отношению к белкам, бычьему сывороточному альбумину [51], токсоидам столбняка и дифтерии [50, 52] или инсулину [53, 54]. С помощью данного метода в наночастицы хитозана также были включены иммуносупрессорный препарат циклоспорин А [55] и противоопухолевое средство доксорубин [56]. Использование подобных систем дало положительные результаты при назальном и внутриглазном способах введения [53, 55].

Плазмидная ДНК — полимерная молекула с высокой плотностью отрицательно заряженных групп в воде. Она может выступать как в роли терапевтического агента для доставки генов, так и в качестве перекрестной сшивки для связывания хитозана или полиэтиленimina. Леонг с соавторами провели синтез наночастиц из водных растворов хитозана и ДНК путем простого смешивания в присутствии сульфата натрия [57]. Наночастицы самопроизвольно образовывались в растворе и имели небольшое распределение по размерам в интервале от 100 до 300 нм. При пероральном введении мышам наночастиц хитозана, содержащих ген аллергена, наблюдалась более выраженная иммунизация, чем при введении незащищенной ДНК [58]. В другом исследовании наночастицы из хитозана и ДНК доставлялись в печень крыс путем вливания в желчные протоки и портальную вену. При этом наблюдался сравнительно высокий уровень экспрессии генов при низкой токсичности [59].

Возможно, наиболее интенсивно и широко изучаемым полимером для создания невирусных систем доставки генов является полиэтиленимин (ПЭИ). При нейтральных значениях рН ПЭИ несет на себе большой положительный заряд, поэтому в водных средах он связывается с ДНК, образуя комплексы ПЭИ–ДНК. Морфология комплексов в значительной степени зависит от соотношения зарядов ПЭИ и ДНК, которое, в свою очередь, определяется соотношением числа атомов азота в ПЭИ и числа фосфатных групп в ДНК (отношение N/P), как показано на рис. 6.1. Компактные наночастицы ПЭИ/ДНК, называемые полиплексами, образуются в определенном диапазоне значений N/P —

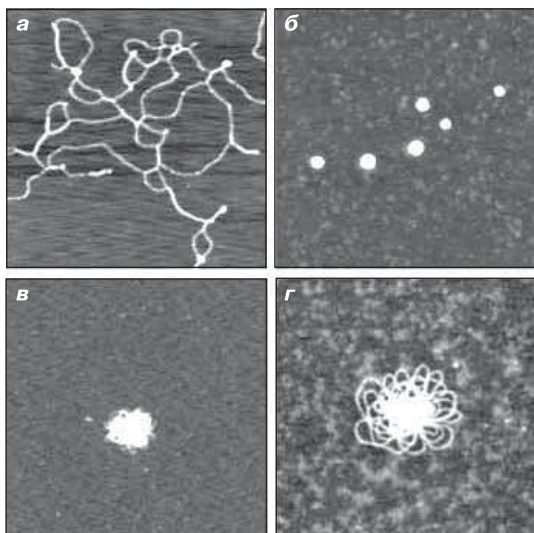


Рис. 6.1. Изображения комплексов, образованных разветвленным ПЭИ (25 кДа) и ДНК фага лямбда в воде при соотношении N/P 1 : 10 (а), 3 : 1 (б), 30 : 1 (в) и 300 : 1 (г). Компактные наночастицы ПЭИ/ДНК формируются при соотношении N/P 3 : 1. Получено методом атомно-силовой микроскопии (в полуконтактном режиме); размеры снимков: 1 мкм × 1 мкм

обычно от 3 до 20. Для переноса генов лучше использовать именно эти наночастицы. Кроме первичных аминогрупп ПЭИ также имеет большое количество вторичных и третичных аминогрупп. После захвата наночастиц внутрь клеток путем эндоцитоза эти аминогруппы, возможно, могут выступать в роли «протонной губки», приводя в конечном итоге к выходу наночастиц из эндосом и последующему их расщеплению в лизосомах [60, 61]. ПЭИ не только обладает способностью связывать ДНК и выходить из эндосом, он легко подвергается дополнительной модификации, что повышает его биосовместимость и увеличивает эффективность трансформации [62, 63]. Для доставки генов в условиях *in vivo* ПЭИ связывали с ПЭГ, что позволило повысить растворимость полимера в воде, снизить его иммуногенность и увеличить время циркуляции. Для связывания с рецепторами использовали конъюгаты ПЭИ с галактозой [64], фолатом [65], трансферрином [66] и антителами [67]. Применение наночастиц ПЭИ/ДНК дало хорошие результаты во многих исследованиях на модельных животных. В частности, был достигнут высокий уровень экспрессии генов в легких в результате введения данных наночастиц самыми разными способами, включая внутривенное введение [68], закапывание в нос [69], введение в трахею [70] и в легкие [71], что свидетельствует о высоком потенциале этой системы для борьбы с кистозным фиброзом легких. Путем внутримышечных инъекций наночастиц ПЭИ/ДНК удалось добиться экспрессии терапевтического гена

bcl-2 в нейронах ЦНС [72]. Кроме того, внутривенное введение покрытых трансферрином наночастиц ПЭИ/ДНК мышам с индуцированными опухолями приводило к преимущественной экспрессии перенесенных генов в отдаленных опухолях по сравнению с основными органами [73]. Такая же экспрессия терапевтических генов в опухолях наблюдалась после внутрибрюшинной инъекции комплексов ПЭИ/ДНК [74].

6.2.3.2. Образование наночастиц в результате самопроизвольной сборки блок-сополимеров

В водной среде блок-сополимеры могут самопроизвольно образовывать полимерные мицеллы со структурой «ядро–оболочка». Такие сополимеры должны содержать гидрофильные сегменты, образующие внешнюю оболочку. С этой целью чаще всего используются ПЭГ или полиэтиленоксид (ПЭО). При попадании этих мицелл в кровь внешняя оболочка обеспечивает стерическое отталкивание от белков плазмы и позволяет избежать быстрого выведения ретикулоэндотелиальной системой. Другие сегменты полимерной структуры должны формировать в водной среде твердое ядро. Для этого подходят многие полимеры, например ПМК, ПМГК, поликапролактан, полиглутамовая кислота, полиэтиленимин или полибензиласпартат. Формированию и стабилизации ядра способствуют электростатические и гидрофобные взаимодействия, образование химической связи и комплексов полимера с металлами [75]. Химический состав, размер молекулы, а также длина блоков, составляющих сополимер, легко изменяемы, что позволяет модифицировать структуру и свойства полимерных мицелл. Еще важнее, что к концам внешних гидрофильных сегментов возможно присоединять различные лиганды. Это обеспечивает доставку таких структур к определенным клеткам или тканям [76].

Полимерные мицеллы обычно имеют диаметр от 10 до 50 нм [77]. Это меньше, чем размер большинства других наночастиц, используемых для транспорта лекарственных препаратов, поэтому полимерные мицеллы с меньшей вероятностью распознаются и захватываются ретикулоэндотелиальной системой. Кроме того, они особенно удобны для пассивного связывания с опухолевыми тканями с малым диаметром капилляров [10]. Полимерные мицеллы отличаются узким диапазоном размеров, что важно для контроля их распределения и высвобождения лекарств. Молекулы препаратов захватываются в ядро мицелл и тем самым защищаются от гидролитического и ферментативного расщепления. Различные типы лекарств в составе полимерных мицелл проходили испытания в условиях *in vivo* и *in vitro*. Для нескольких противоопухолевых средств, включая доксорубин [76], цисплатин [75], паклитаксел [78] и камптотecin [79], наблюдалось повышение противоопухолевой активности по сравнению с действием свободных препаратов. Кроме того, полимерные мицеллы способны проникать через кишечный эпителий и высвобождать плохо растворимые в воде лекарства на протяжении длительного времени [80]. Положительные результаты также были получены при использовании полимерных мицелл для доставки олигонуклеотидов [81].

6.2.3.3. Образование наночастиц путем полимеризации мономеров

Пеппас с соавторами разработали метод свободнорадикальной преципитации (дисперсии) для синтеза гидрогелевых наночастиц из перекрестно-сшитой полиметакриловой кислоты (ПМАК) с привитым полиэтиленгликолем (ПЭГ). Поскольку полиметакриловая и полиакриловая кислоты (ПАК) представляют собой рН-чувствительные полимеры, наночастицы из привитых сополимеров ПМАК/ПЭГ и ПАК/ПЭГ обладают способностью сильно изменяться в размере при изменении рН: от 200 нм при рН 2,0 до 2 мкм при рН 6,0 [82, 83]. Была изучена способность гидрогелевых наночастиц из ПМАК/ПЭГ доставлять инсулин при пероральном приеме. Инсулин помещали внутрь наночастиц за счет набухания полимера при увеличении рН. В желудке из-за низкого значения рН желудочного сока наночастицы сжимались, и инсулин оказывался физически включенным внутрь наночастиц и защищенным от действия кислоты. При выходе наночастиц в кишечник (а именно там происходит наиболее активное всасывание лекарств и питательных веществ), где значение рН около 8, наночастицы набухали и высвобождали инсулин. При пероральном введении инсулинсодержащих наночастиц крысам-диабетикам наблюдалось значительное снижение уровня глюкозы в сыворотке крови по сравнению с контрольными животными [83].

6.3. Нанопористые мембраны для доставки лекарств

6.3.1. Общий обзор устройств на основе нанопористых структур для длительного высвобождения лекарств

В последнее время отмечается большой интерес к использованию депо-систем для длительного высвобождения лекарственных препаратов в организме. В клинической практике находят применение такие противоопухолевые препараты на основе полимеров, как Lupron depot и Gliadel wafer. Интересным примером служат многолуночные чипы, предназначенные для контролируемого высвобождения сразу нескольких препаратов [84, 85]. Еще один подход к решению этой задачи — использование нанопористых структур. С помощью новейших микротехнологий удалось создать силиконовые мембраны с рядами одинаковых нанопор, имеющих форму каналов [86, 87]. Размер пор абсолютно одинаков на всем протяжении мембраны, точно контролируется и составляет всего 7 нм. Из таких мембран создают капсулы, способные заключать в себя лекарство, причем кинетику высвобождения инкапсулированного препарата можно контролировать изменением размера пор. Силиконовые нанопористые мембраны также используют для создания биокапсул, изолирующих островковые клетки, пересаженные для лечения диабета [88]. Регулирование величины пор позволяет свободно проходить небольшим молекулам: воде, кислороду, питательным веществам и инсулину, образуемому инкапсулированными клетками, и при этом не пропускать более крупные и опасные частицы, например

антитела хозяина или другие компоненты иммунной системы. Были изучены иммунозащитные свойства нанопористых мембран из оксида алюминия с частыми порами диаметром 46–75 нм, образованными методом анодирования [89]. Предполагается, что имплантированные в организм больного инкапсулированные клетки будут производить инсулин в зависимости от уровня глюкозы в крови, причем без необходимости применения иммуносупрессоров.

Оба описанных выше метода позволяют создавать химически инертные и прочные нанопористые мембраны с одинаковой и точно определяемой структурой пор, однако ни силикон, ни оксид алюминия не разлагаются в биологических системах. После имплантации и использования их необходимо хирургически удалять. Напротив, такие полимеры, как ПМГК, могут быть полностью биоразлагаемыми и биосовместимыми. По сравнению с силиконовыми материалами, производимыми с помощью микро- или нанотехнологических подходов, полимерные материалы дешевы, а для создания полимерных микро- или нанопористых структур, включая нанопористые мембраны, разработано множество недорогих методов. Ниже мы рассмотрим способы производства полимерных нанопористых мембран, включая новейшие разработки, а также обсудим возможности их применения для доставки лекарственных препаратов. В заключение мы остановимся на способах изготовления таких систем.

6.3.2. Полимерные нанопористые мембраны для доставки лекарственных препаратов

Травление — хорошо отработанный способ создания нанопор в полимерной пленке путем быстрого ее бомбардирования тяжелыми ионами с последующим селективным травлением для удаления полимера из латентных отпечатков [90]. Сначала для образования нанопор таким способом использовали поликарбонат и полиэтилентерефталат, однако затем стали применять и другие полимеры, включая полипропилен, поливинилдиенфторид и полиимиды. Диаметр образующихся нанопор составляет от десятка до сотен нанометров, а плотность их расположения — от 1 до $10^{10}/\text{см}^2$. По сравнению с методом инверсии фаз, этот метод позволяет получать поры почти одинакового диаметра в широком диапазоне размеров. Было отмечено продолжительное высвобождение лекарственного препарата через поликарбонатные мембраны с порами размером 200–300 нм [91].

Создание нанопор путем инверсии фаз основано на диффузии жидкости между обогащенной и обедненной полимером фазами [92]. Внутри мембраны обогащенная полимером фаза образует твердую матрицу, а обедненная фаза формирует поры. Средний размер пор и распределение по размерам можно контролировать путем изменения экспериментальных условий. Метод инверсии фаз прост и дешев. Однако его недостатком является довольно большой разброс диаметра пор. Эта технология применялась при изготовлении пористых мембран для контролируемой доставки лекарственных препаратов [93, 94].

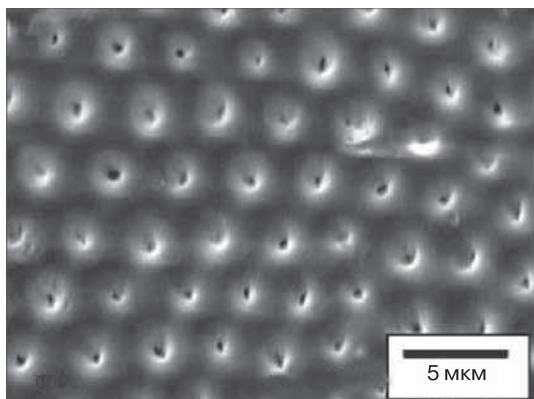


Рис. 6.2. Электронная микрофотография нанорешетки из сополимера молочной и гликолевой кислот. Размер пор 250 нм

Несколько лет назад для создания полимерной нанорешетки был применен новый способ импринтинга защищенной матрицы [95]. Сначала провели травление пучка оптических волокон для синтеза чипа с рядами конусов с очень тонкими острями. Далее такой наночип использовали как образец для создания негативной полидиметилсилоксановой матрицы путем нанопечати. На следующей стадии получали наночип из поливинилового спирта. Наконец, на последнем этапе наночип из поливинилового спирта покрывали пленкой из ПМГК с помощью центрифугирования. Скорость центрифугирования и концентрацию полимера тщательно контролировали, чтобы острья чипа минимально продырявливали пленку. В результате растворения матрицы из поливинилового спирта в воде получили пленку из ПМГК с рядами конических выпуклостей с нанопорами (рис. 6.2). Геометрию пор можно контролировать разными способами. Например, диаметр поры уменьшается от 3 мкм до 200 нм и менее путем вытягивания оптических волокон. Это позволяет создавать пленки с высокой плотностью пор. Угол острья конуса зависит от разницы скорости травления волокна и окружающего его материала оболочки. Диаметр тонкого конца конуса определяют форма конуса и глубина импринтинга. Диаметр основания конуса зависит от формы конуса и толщины слоя полимера. Для точного воспроизведения такой нанорешетки требуется полное смачивание поверхности раздела между образцом и наносимым полимером (т. е. между оптическим волокном и полидиметилсилоксаном, между застывшим полидиметилсилоксаном и раствором поливинилового спирта в воде и между высохшим поливиниловым спиртом и раствором ПМГК). По сравнению с другими методами создания полимерных нанопористых материалов этот способ позволяет достигать очень высоких значений плотности пор и хорошую однородность пор по размеру, причем не только из биоразлагаемого полимера, но и из многих других полимеров. В настоящее время ведутся работы по включению таких нанопористых мембран в функциональные системы.

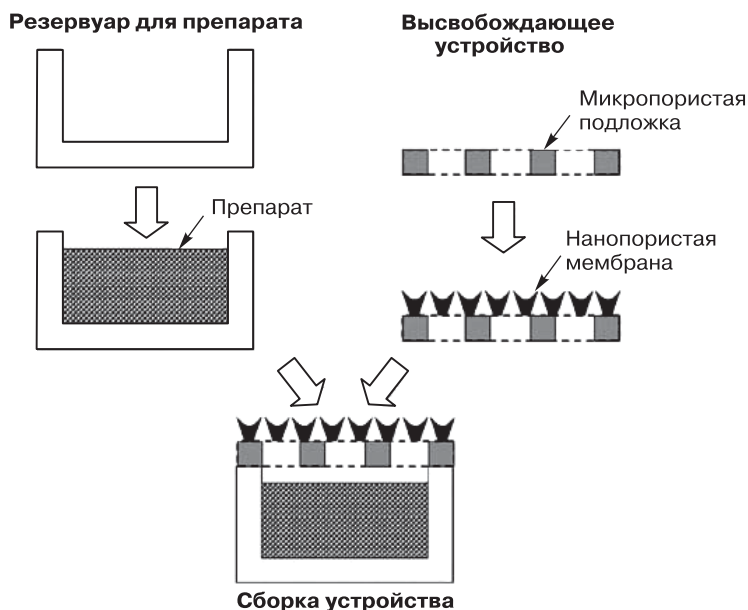


Рис. 6.3. Схема сборки микроустройства с нанопористой мембраной для контролируемого высвобождения лекарственного препарата

Чтобы включить нанопористую мембрану в систему доставки лекарственных препаратов, была предпринята попытка создания микроустройства, напоминающего капсулу, как показано на рис. 6.3. Устройство состоит из двух частей: резервуара с лекарством и полимерной нанопористой мембраны. Процесс изготовления устройства включает в себя три этапа: 1) микропроизводство резервуара для лекарства и загрузка лекарства; 2) производство нанорешетки и ее установка на микропористой мембране; 3) сборка двух частей в единое целое. Все устройство, включая резервуар для лекарства, микропористую подложку и нанорешетку, изготовлено из биосовместимых и биоразлагаемых полимеров. Таким образом, подобная конструкция может использоваться для имплантации. С целью связывания различных молекул с полимерами, включая ПМГК, была создана безвредная для биологических систем и окружающей среды технология, основанная на использовании CO_2 [96]. Процесс можно проводить при комнатной температуре, кроме того, нет необходимости в использовании органических растворителей. Ферменты и даже целые клетки выдерживают связывание с полимером и остаются активными после завершения процедуры [97]. Возможно создать устройство любой величины — от нескольких микрометров до нескольких сантиметров — в зависимости от конкретной задачи. Кроме того, размер пор нанорешетки также варьируется, что позволяет контролировать скорость высвобождения лекарства. Для повышения механической прочности нанопористой мембраны к ПМГК добавляли наноглину [98]. Одним из

предполагаемых применений такого устройства является продолжительное высвобождение α -интерферона в опухолевых тканях.

6.4. Электроспиннинг как метод получения полимерных нановолокон для доставки лекарственных препаратов

Кроме наночастиц и нанопористых мембран существует еще один класс полимерных наноструктур, привлечших внимание исследователей, занимающихся разработкой систем доставки лекарственных препаратов. Это нановолокна (более подробно они обсуждаются в следующей главе). В настоящее время для получения нановолокон чаще всего используют метод электропрядения (электроспиннинг). Он состоит в приложении высокого напряжения (несколько тысяч вольт на сантиметр) к капилляру, заполненному жидким полимером (раствором или расплавом), который выталкивается в направлении противоположного электрода, играющего роль коллектора. Струя жидкости искривляется и закручивается по спирали. Закручивание, испарение растворителя, а также значительное утоньшение за счет ускорения струи полимера под действием электрических сил приводят к образованию полимерных волокон нанометровой толщины [99]. Этот метод достаточно универсален и позволяет включать в одно волокно множество ингредиентов путем их диспергирования в исходном растворе или суспензии. Для производства содержащих белки нановолокон со структурой «стержень–оболочка» был применен метод коаксиального электроспиннинга [100]. Так удалось получить нановолокна из целого ряда полимеров, включая ПЭО/ПЭГ [101], ПМГК [102–104], поликапролактама [105], хитозана [106], поливинилового спирта [107] и желатина [108], которые широко применяются для создания систем доставки лекарств. По сравнению с другими способами получения нановолокон, например самосборкой и синтезом матрицы, электроспиннинг — простой и экономичный метод, пригодный для производства очень длинных волокон из различных полимеров.

Из полученных таким путем нановолокон можно создавать нетканый материал (рис. 6.4), который по своей морфологии напоминает внеклеточный матрикс природных тканей организма. Внеклеточный матрикс характеризуется большой пористостью, большим распределением пор по размерам и широким спектром механических свойств. Эти характеристики оказывают важное влияние на структуру и функции тканей и органов. Нановолокна могут служить прекрасной основой для роста клеток и формирования тканей. По этой причине подобные нановолокна активно изучаются с целью создания структурных элементов для тканевой инженерии [109] и для заживления ран [102, 104, 105]. Кроме того, в нановолокна обычно включают биологически и терапевтически активные вещества: антибиотики [102, 104, 110], противогрибковые препараты [110], гепарин для предотвращения пролиферации гладкомышечных клеток сосудов [105], белки [100, 107] и плазмидную ДНК [103]. В настоящее время

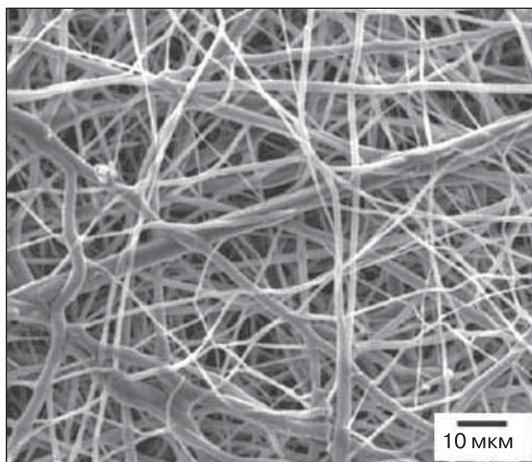


Рис. 6.4. Электронная микрофотография поликапролактамовых нановолокон, полученных методом электроспиннинга. Печатается с любезного разрешения Джона Ланнугги из департамента материаловедения и инженерии Университета штата Огайо

исследования в области создания нановолокон для доставки лекарственных препаратов направлены на демонстрацию возможности связывания лекарств, изучение влияния иммобилизованных препаратов на свойства нановолокон, а также на исследование процесса высвобождения лекарств из них. Уже получены некоторые интересные результаты, которые указывают на потенциальную возможность использования нановолокон в качестве носителей для доставки лекарственных препаратов.

6.5. Заключение

Поскольку люди продолжают страдать от серьезных болезней: рака, диабета, болезни Альцгеймера и сердечно-сосудистых заболеваний, активизируется поиск новых препаратов, действие которых основано на последних достижениях геномики и протеомики. Однако для полного раскрытия потенциала современных терапевтических средств необходимы новые подходы к решению проблемы направленной доставки лекарств и генов. В настоящее время активно развиваются нанотехнологии с применением полимеров. Возможность использования нанополимеров для доставки лекарств и генов стимулировала создание широчайшего спектра полимерных наноструктур. Среди них в ближайшие годы наиболее интенсивно изучаемыми объектами, по-видимому, останутся полифункциональные наночастицы. Кроме терапевтического действия они должны выполнять функции защиты лекарственного средства, направленной доставки, контролируемого высвобождения препарата, реагировать на сигналы, проникать через различные барьеры организма, способствовать визуализации клеток или тканей

in vivo. Основным структурным материалом наночастиц, вероятно, останутся полимеры, которые могут использоваться в сочетании со многими функциональными материалами, например магнитными частицами, квантовыми точками и биомолекулами с дополнительными возможностями. Однако простого смешивания многочисленных компонентов внутри частицы, размер которой находится в нанодиапазоне, недостаточно для достижения необходимой функциональности. Важно осуществить правильную организацию взаимодействия компонентов внутри продуманно сконструированной структуры. Примером подобной конструкции служит вирус, который можно рассматривать в качестве наномеханизма, задуманного, созданного и оптимизированного природой специально для доставки генетического материала. Вирус состоит из белков, нуклеиновых кислот и других компонентов, которые определенным образом упорядочены в организованной пространственной структуре, необходимой для реализации ряда последовательных действий. Для доставки генов были созданы вирусные векторы, однако их применимость ограничена из-за высокой токсичности и иммуногенности. В качестве векторов следующего поколения можно рассматривать «искусственные вирусы». Они напоминают вирусы, но созданы из синтетических материалов и способны переносить генетическую информацию, не оказывая токсического и иммуногенного действия. Конструирование функционального искусственного вируса — чрезвычайно интересная задача. Традиционный метод восходящего проектирования, проводимый в объеме раствора для получения наночастиц, не позволяет создать структуру со всеми необходимыми свойствами. По-видимому, для синтеза искусственных вирусов придется обратиться к наноинженерным технологиям, позволяющим производить манипуляции с единичными молекулами. С большой вероятностью, кроме наночастиц будут возникать и другие полифункциональные системы доставки лекарств и генов, размер которых находится в нанометровом диапазоне. Элементами таких систем могут быть нанопоры (для контролируемого высвобождения препаратов), микро- или наносенсоры (для диагностики заболеваний), лиганды (для направленной доставки препаратов), а также функциональные наночастицы (для получения изображений и внешней активации). Эффективность подобных систем будет зависеть от глубины понимания сути заболеваний, а также от комплексного использования достижений инженерии, науки и медицины.

Литература

1. Langer R. Drug delivery and targeting. *Nature* 1998; 392: 5–10.
2. Edwards D.A., et al. Large porous particles for pulmonary drug delivery. *Science* 1997; 276: 1868–1871.
3. Bastian P., Bartkowski R., Koehler H., Kissel T. Chemo-embolization of experimental liver metastases. Part 1. Distribution of biodegradable microspheres of different sizes in an animal model for the locoregional therapy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1998; 46: 243–254.
4. Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.L. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 46: 3–26.

5. Mesiha M.S., Sidhom M.B., Fasipe B. Oral and subcutaneous absorption of insulin poly(isobutylcyanoacrylate) nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2005; 288: 289–293.
6. Cohen H., et al. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* 2000; 7: 1896–1905.
7. Li Y.P., et al. PEGylated PLGA nanoparticles as protein carriers: synthesis, preparation and biodistribution in rats. *J. Control Release* 2001; 71: 203–211.
8. Moghimi S.M., Hunter A.C., Murray J.C. Long-circulating and target-specific nanoparticles: theory to practice. *Pharmacol. Rev.* 2001; 53: 283–318.
9. Ballet F. Hepatic circulation: potential for therapeutic intervention. *Pharmacol. Ther.* 1990; 47: 281–328.
10. Hobbs S.K., et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 4607–4612.
11. Desai M.P., Labhasetwar V., Walter E., Levy R.J., Amidon G.L. The mechanism of uptake of biodegradable microparticles in Caco-2 cells is size dependent. *Pharm. Res.* 1997; 14: 1568–1573.
12. Zauner W., Farrow N.A., Haines A.M.R. *In vitro* uptake of polystyrene microspheres: effect of particle size, cell line and cell density. *J. Control Release* 2001; 71: 39–51.
13. Prabha S., Zhou W.-Z., Panyam J., Labhasetwar V. Size-dependency of nanoparticle-mediated gene transfection: studies with fractionated nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2002; 244: 105–115.
14. Rejman J., Oberle V., Zuhorn I.S., Hoekstra D. Size-dependent internalization of particles via the pathways of clathrin- and caveolae-mediated endocytosis. *Biochem. J.* 2004; 377: 159–169.
15. Desai M.P., Labhasetwar V., Amidon G.L., Levy R.J. Gastrointestinal uptake of biodegradable microparticles: effect of particle size. *Pharm. Res.* 1996; 13: 1838–1845.
16. Jiao Y., et al. *In vitro* and *in vivo* evaluation of oral heparin-loaded polymeric nanoparticles in rabbits. *Circulation* 2002; 105: 230–235.
17. Feng S.-S. Nanoparticles of biodegradable polymers for new-concept chemotherapy. *Expert Rev. Med. Devices* 2004; 1: 115–125.
18. Takeuchi H., Yamamoto H., Kawashima Y. Mucoadhesive nanoparticulate systems for peptide drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 39–54.
19. Olivier J.-C. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *NeuroRx* 2005; 2: 108–119.
20. Gao K., Jiang X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2006; 310: 213–219.
21. Zambaux M.F., et al. Influence of experimental parameters on the characteristics of poly(lactic acid) nanoparticles prepared by a double emulsion method. *J. Control Release* 1998; 50: 31–40.
22. Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Kunou N., Kawashima Y. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with DL-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J. Control Release* 1993; 25: 89–98.
23. Mosqueira V.C.F., et al. Efficacy and pharmacokinetics of intravenous nanocapsule formulations of halofantrine in *Plasmodium berghei*-infected mice. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2004; 48: 1222–1228.
24. Dailey L.A., et al. Nebulization of biodegradable nanoparticles: impact of nebulizer technology and nanoparticle characteristics on aerosol features. *J. Control Release* 2003; 86: 131–144.

25. Allemann E., Leroux J.C., Gurny R., Doelker E. *In vitro* extended-release properties of drug-loaded poly(DL-lactic acid) nanoparticles produced by a salting-out procedure. *Pharm. Res.* 1993; 10: 1732–1737.
26. Konan Y.N., Gurny R., Allemann E. Preparation and characterization of sterile and freeze-dried sub-200 nm nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2002; 233: 239–252.
27. Subramaniam B., Rajewski R.A., Snavely K. Pharmaceutical processing with supercritical carbon dioxide. *J. Pharm. Sci.* 1997; 86: 885–890.
28. Mishima K., et al. Microencapsulation of proteins by rapid expansion of supercritical solution with a nonsolvent. *AIChE J.* 2000; 46: 857–865.
29. Randolph T.W., Randolph A.D., Mebes M., Yeung S. Sub-micrometer-sized biodegradable particles of poly(L-lactic acid) via the gas antisolvent spray precipitation process. *Biotechnol. Prog.* 1993; 9: 429–435.
30. Soma C.E., Dubernet C., Bentolila D., Benita S., Couvreur P. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles. *Biomaterials* 1999; 21: 1–7.
31. Barraud L., et al. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *J. Hepatol.* 2005; 42: 736–743.
32. Schwab G., et al. Antisense oligonucleotides adsorbed to polyalkylcyanoacrylate nanoparticles specifically inhibit mutated Ha-ras-mediated cell proliferation and tumorigenicity in nude mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91: 10460–10464.
33. Leo E., Angela Vandelli M., Cameroni R., Forni F. Doxorubicin-loaded gelatin nanoparticles stabilized by glutaraldehyde: involvement of the drug in the crosslinking process. *Int. J. Pharm.* 1997; 155: 75–82.
34. Yeh T.K., Lu Z., Wientjes M.G. Au J.L.S. Formulating paclitaxel in nanoparticles alters its disposition. *Pharm. Res.* 2005; 22: 867–874.
35. Bajpai A.K., Choubey J. *In vitro* release dynamics of an anticancer drug from swellable gelatin nanoparticles. *J. Appl. Polym. Sci.* 2006; 101: 2320–2332.
36. Cascone M.G., Lazzeri L., Carmignani C., Zhu Z. Gelatin nanoparticles produced by a simple W/O emulsion as delivery system for methotrexate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2002; 13: 523–526.
37. Vandervoort J., Ludwig A. Preparation and evaluation of drug-loaded gelatin nanoparticles for topical ophthalmic use. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004; 57: 251–261.
38. Truong-Le V.L., et al. Gene transfer by DNA—gelatin nanospheres. *Arch. Biochem. Biophys.* 1999; 361: 47–56.
39. Kaul G., Amiji M. Tumor-targeted gene delivery using poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharm. Res.* 2005; 22: 951–961.
40. Balthasar S., et al. Preparation and characterization of antibody modified gelatin nanoparticles as drug carrier system for uptake in lymphocytes. *Biomaterials* 2005; 26: 2723–2732.
41. Dinauer N., et al. Selective targeting of antibody-conjugated nanoparticles to leukemic cells and primary T-lymphocytes. *Biomaterials* 2005; 26: 5898–5906.
42. Vinogradov S., Batrakova E., Kabanov A. Poly(ethylene glycol)—polyethylenimine NanoGel particles: novel drug delivery systems for antisense oligonucleotides. *Colloid Surf. B* 1999; 16: 291–304.
43. Vinogradov S.V., Bronich T.K., Kabanov A.V. Nanosized cationic hydrogels for drug delivery: preparation, properties and interactions with cells. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 135–147.

44. Vinogradov S.V., Zeman A.D., Batrakova E.V., Kabanov A.V. Polyplex nanogel formulations for drug delivery of cytotoxic nucleoside analogs. *J. Control Release* 2005; 107: 143–157.
45. Vinogradov S.V., Batrakova E.V., Kabanov A.V. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug. Chem.* 2004; 15: 50–60.
46. Zahoor A., Sharma S., Khuller G.K. Inhalable alginate nanoparticles as anti-tubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2005; 26: 298–303.
47. You J.-O., Peng C.-A. Calcium-alginate nanoparticles formed by reverse microemulsion as gene carriers. *Macromol. Symp.* 2004; 219: 147–153.
48. Gonzalez Ferreira M., Tillman L., Hardee G., Bodmeier R. Characterization of alginate/poly-L-lysine particles as antisense oligonucleotide carriers. *Int. J. Pharm.* 2002; 239: 47–59.
49. Aynie I., Vauthier C., Chacun H., Fattal E., Couvreur P. Spongelike alginate nanoparticles as a new potential system for the delivery of antisense oligonucleotides. *Antisense Nucleic Acid. Drug Dev.* 1999; 9: 301–312.
50. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. Novel hydrophilic chitosan—polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997; 63: 125–132.
51. Zhang H., Oh M., Allen C., Kumacheva E. Monodisperse chitosan nanoparticles for mucosal drug delivery. *Biomacromolecules* 2004; 5: 2461–2468.
52. Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. Chitosan and chitosan/ethylene oxide—propylene oxide block copolymer nanoparticles as novel carriers for proteins and vaccines. *Pharm. Res.* 1997; 14: 1431–1436.
53. Fernandez-Urrusuno R., Calvo P., Remunan-Lopez C., Vila-Jato J.L., Alonso M.J. Enhancement of nasal absorption of insulin using chitosan nanoparticles. *Pharm. Res.* 1999; 16: 1576–1581.
54. Grenha A., Seijo B., Remunan-Lopez C. Microencapsulated chitosan nanoparticles for lung protein delivery. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2005; 25: 427–437.
55. De Campos A.M., Sanchez A., Alonso M.J. Chitosan nanoparticles: a new vehicle for the improvement of the delivery of drugs to the ocular surface. Application to cyclosporin A. *Int. J. Pharm.* 2001; 224: 159–168.
56. Janes K.A., Fresneau M.P., Marazuela A., Fabra A., Alonso M.J. Chitosan nanoparticles as delivery systems for doxorubicin. *J. Control Release* 2001; 73: 255–267.
57. Leong K.W., et al. DNA—polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J. Control Release* 1998; 53: 183–193.
58. Roy K., Mao H.-Q., Huang S.K., Leong K.W. Oral gene delivery with chitosan—DNA nanoparticles generates immunological protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.* 1999; 5: 387–391.
59. Jiang X., et al. Chitosan-g-PEG/DNA complexes deliver gene to the rat liver via intrabiliary and intraportal infusions. *J. Gene Med.* 2006; 8: 477–487.
60. Bousif O., et al. A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and *in vivo*: polyethylenimine. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 7297–7301.
61. Akinc A., Thomas M., Klibanov A.M., Langer R. Exploring polyethylenimine-mediated DNA transfection and the proton sponge hypothesis. *J. Gene Med.* 2005; 7: 657–663.
62. Lungwitz U., Breunig M., Blunk T., Goepferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 60: 247–266.
63. Neu M., Fischer D., Kissel T. Recent advances in rational gene transfer vector design based on poly(ethyleneimine) and its derivatives. *J. Gene Med.* 2005; 7: 992–1009.

64. Kunath K., von Harpe A., Fischer D., Kissel T. Galactose—PEI—DNA complexes for targeted gene delivery: degree of substitution affects complex size and transfection efficiency. *J. Control Release* 2003; 88: 159–172.
65. Bennis J.M., Mahato R.I., Kim S.W. Optimization of factors influencing the transfection efficiency of folate-PEG-folate-graft-polyethylenimine. *J. Control Release* 2002; 79: 255–269.
66. Kircheis R., Blessing T., Brunner S., Wightman L., Wagner E. Tumor targeting with surface-shielded ligand-polycation DNA complexes. *J. Control Release* 2001; 72: 165–170.
67. Chiu S.-J., Ueno N.T., Lee R.J. Tumor-targeted gene delivery via anti-HER2 antibody (trastuzumab, Herceptin) conjugated polyethylenimine. *J. Control Release* 2004; 97: 357–369.
68. Dif F., Djediat C., Alegria O., Demeneix B., Levi G. Transfection of multiple pulmonary cell types following intravenous injection of PEI—DNA in normal and CFTR mutant mice. *J. Gene Med.* 2006; 8: 82–89.
69. Kichler A., Chillon M., Leborgne C., Danos O., Frisch B. Intranasal gene delivery with a polyethylenimine—PEG conjugate. *J. Control Release* 2002; 81: 379–388.
70. Kleemann E., et al. Nano-carriers for DNA delivery to the lung based upon a TAT-derived peptide covalently coupled to PEG—PEI. *J. Control Release* 2005; 109: 299–316.
71. Gautam A., Densmore C.L., Golunski E., Xu B., Waldrep J.C. Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol. Ther.* 2001; 3: 551–556.
72. Wang S., Ma N., Gao S.J., Yu H., Leong K.W. Transgene expression in the brain stem effected by intramuscular injection of polyethylenimine/DNA complexes. *Mol. Ther.* 2001; 3: 658–664.
73. Kircheis R., et al. Polyethylenimine/DNA complexes shielded by transferrin target gene expression to tumors after systemic application. *Gene Ther.* 2001; 8: 28–40.
74. Aoki K., et al. Polyethylenimine-mediated gene transfer into pancreatic tumor dissemination in the murine peritoneal cavity. *Gene Ther.* 2001; 8: 508–514.
75. Uchino H., et al. Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br. J. Cancer.* 2005; 93: 678–687.
76. Yoo H.S., Park T.G. Folate receptor targeted biodegradable polymeric doxorubicin micelles. *J. Control Release* 2004; 96: 273–283.
77. Lavasanifar A., Samuel J., Kwon G.S. Poly(ethylene oxide)-block-poly(L-amino acid) micelles for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 169–190.
78. Le Garrec D., et al. Poly(N-vinylpyrrolidone)-block-poly(DL-lactide) as a new polymeric solubilizer for hydrophobic anticancer drugs: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *J. Control Release* 2004; 99: 83–101.
79. Kawano K., et al. Enhanced antitumor effect of camptothecin loaded in long-circulating polymeric micelles. *J. Control Release* 2006; 112: 329–332.
80. Mathot F., Van Beijsterveldt L., Preat V., Brewster M., Arien A. Intestinal uptake and biodistribution of novel polymeric micelles after oral administration. *J. Control Release* 2006; 111: 47–55.
81. Vinogradov S., Batrakova E., Li S., Kabanov A. Polyion complex micelles with protein-modified corona for receptor-mediated delivery of oligonucleotides into cells. *Bioconjug. Chem.* 1999; 10: 851–860.
82. Robinson D.N., Peppas N.A. Preparation and characterization of pH-responsive poly(methacrylic acid-g-ethylene glycol) nanospheres. *Macromolecules* 2002; 35: 3668–3674.

83. Foss A.C., Goto T., Morishita M., Peppas N. A. Development of acrylic-based copolymers for oral insulin delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004; 57: 163–169.
84. Santini J.T. Jr., Cima M.J., Langer R. A controlled-release microchip. *Nature* 1999; 397: 335–338.
85. Grayson A.C.R., et al. Multi-pulse drug delivery from a resorbable polymeric microchip device. *Nat. Mater.* 2003; 2: 767–772.
86. Martin F., et al. Tailoring width of microfabricated nanochannels to solute size can be used to control diffusion kinetics. *J. Control Release* 2005; 102: 123–133.
87. Walczak R.J., et al. Long-term biocompatibility of NanoGATE drug delivery implant. *Nanobiotechnology* 2005; 1: 35–42.
88. Desai T.A., et al. Nanopore technology for biomedical applications. *Biomed. Micro-devices* 1999; 2: 11–40.
89. La Flamme K.E., et al. Nanoporous alumina capsules for cellular macroencapsulation: transport and biocompatibility. *Diabetes Technol. Ther.* 2005; 7: 684–694.
90. Fleischer R.L., Price P.B., Walker R.M. *Nuclear Tracks in Solids: Principles and Applications*. Berkeley-University of California Press; 1975; 3–118.
91. Rao V., Amar J.V., Avasthi D.K., Narayana Charyulu R. Etched ion track polymer membranes for sustained drug delivery. *Radiat. Meas.* 2003; 36: 585–589.
92. Kim S.Y., Kanamori T., Noumi Y., Wang P.-C., Shinbo T. Preparation of porous poly(D,L-lactide) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) membranes by a phase inversion process and investigation of their morphological changes as cell culture scaffolds. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004; 92: 2082–2092.
93. Thombre A.G., Cardinal J.R., DeNoto A.R., Herbig S.M., Smith K.L. Asymmetric membrane capsules for osmotic drug delivery. I. Development of a manufacturing process. *J. Control Release* 1999; 57: 55–64.
94. Thombre A.G., Cardinal J.R., DeNoto A.R., Gibbes D.C. Asymmetric membrane capsules for osmotic drug delivery II. *In vitro* and *in vivo* drug release performance. *J. Control Release* 1999; 57: 65–73.
95. Wang S., et al. Polymeric nanonozzle array fabricated by sacrificial template imprinting. *Adv. Mater.* 2005; 17: 1182–1186.
96. Yang Y., Zeng C., Lee L.J. Three-dimensional assembly of polymer microstructures at low temperatures. *Adv. Mater.* 2004; 16: 560–564.
97. Yang Y., Xie Y., Kang X., Lee L.J, Kniss D. Assembly of three-Dimensional polymeric constructs containing cells/biomolecules using carbon dioxide. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 14040–14041.
98. He H., Yen C., Ho W., Lee L.J. Preparation of nanoporous PLGA membranes by phase inversion and investigation of their morphological changes for drug delivery. В печати.
99. Frenot A. and Chronakis I.S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr. Opin. Colloid. Interface Sci.* 2003; 8: 64–75.
100. Jiang H., et al. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J. Control Release* 2005; 108: 237–243.
101. Son W.K., Youk J.H., Lee T.S., Park W.H. The effects of solution properties and polyelectrolyte on electrospinning of ultrafine poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer* 2004; 45: 2959–2966.
102. Kim K., et al. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J. Control Release* 2004; 98: 47–56.

103. Luu Y.K., Kim K., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J. Control Release* 2003; 89: 341–353.
104. Katti D.S., Robinson K.W., Ko F.K., Laurencin C.T. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2004; 70B: 286–296.
105. Luong-Van E., et al. Controlled release of heparin from poly(ϵ -caprolactone) electrospun fibers. *Biomaterials* 2006; 27: 2042–2050.
106. Bhattarai N., Edmondson D., Veisoh O., Matsen F.A., Zhang M. Electrospun chitosan-based nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 2005; 26: 6176–6184.
107. Zeng J., et al. Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings. *Biomacromolecules* 2005; 6: 1484–1488.
108. Zhang Y., Ouyang H., Lim C.T., Ramakrishna S., Huang Z.-M. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2005; 72B: 156–165.
109. Venugopal J., Ramakrishna S. Applications of polymer nanofibers in bio-medicine and biotechnology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2005; 125: 147–157.
110. Verreck G., et al. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J. Control Release* 2003; 92: 349–360.

РАЗРАБОТКА НАНОСИСТЕМ ДЛЯ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВ В ОРГАНИЗМЕ

Никхил Дубе, Джойдип Дутта и Дхирендра С. Катти

7.1. Введение

Наиболее распространенные способы введения лекарственных препаратов, пероральное и внутривенное, не всегда эффективны. Недостатками этих традиционных методов являются низкая биодоступность препарата в участке-мишени, токсическое воздействие на здоровые ткани, а также его преждевременный распад в организме [1]. После введения лекарства обычным путем его концентрация в крови быстро увеличивается, затем в результате метаболизма снижается, и через какое-то время терапевтическое действие препарата заканчивается [2]. Однако важнейшим условием лечения любым препаратом является соблюдение интервала между максимально допустимой концентрацией, определяемой токсичностью, и минимальной концентрацией, ниже которой терапевтическое действие отсутствует. Этот диапазон часто называют терапевтическим интервалом [3]. В контролируемых системах доставки лекарств, предназначенных для длительного лечения, уровень активного компонента в крови практически не изменяется и долгое время находится в терапевтическом интервале. Но активные компоненты — лекарства, белки, нуклеиновые кислоты, вводимые перорально или внутривенно, могут быть преждевременно метаболизированы или расщеплены кислотой или ферментами в желудочно-кишечном тракте. Время циркуляции таких молекул можно повысить, заключив их в оболочки подходящих высокомолекулярных соединений. Гидрофобные лекарства не растворяются в крови и не достигают органа-мишени, что снижает их терапевтическое действие. Для повышения эффективности воздействия данных веществ их обычно заключают в капсулы, образованные гидрофильным носителем [4]. Системы доставки должны обеспечивать такое распределение лекарства в организме, при котором основная фракция препарата взаимодействует исключительно с тканью-мишенью на клеточном или субклеточном уровне и, кроме того, определенное время обеспечивается необходимая фармакокинетика. Таким образом, системы направленной доставки лекарств позволяют частично или полностью преодолеть ограниченную растворимость, неоптимальное биораспределение, низкую селективность, неблагоприятную фармакокинетику и повреждение здоровых тканей. Лекарства в этих системах находят

ся в инкапсулированной форме: в виде нано- или микроструктур или макроскопических высвобождающих лекарство имплантатов. Это позволяет контролировать выход препарата, повышает эффективность терапевтического действия и снижает побочные эффекты. В настоящее время создано множество систем, позволяющих включать и высвобождать лекарственные препараты — от классических малых молекул до крупных фрагментов ДНК и белков.

Основное преимущество систем доставки лекарств — способность изменять фармакокинетику и биораспределение в организме [5]. Скорость высвобождения препарата из системы определяет его терапевтическое действие. Она зависит от свойств носителя, свойств самого лекарства и устройства системы доставки. Помимо этого, на скорость выхода активного компонента влияют и внешние факторы: pH, ионная сила, температура, магнитные свойства среды и ультразвук. Воздействие последнего фактора зависит от типа системы доставки. Основу механизма высвобождения препарата могут составлять: диффузия препарата, расщепление материала носителя, набухание носителя с последующей диффузией лекарства или сочетание перечисленных выше процессов [3].

Направленная доставка позволяет активному компоненту достигать участка-мишени, не влияя на здоровые ткани и органы. Биораспределение лекарства можно улучшить путем активного или пассивного связывания с мишенью. Примером пассивного связывания является естественная тенденция к концентрированию нагруженных лекарством частиц в системе мононуклеарных фагоцитов, в частности в макрофагах печени и селезенки, и повышенная проницаемость и удерживание лекарств (EPR-эффект) в солидных опухолях [5]. При активной доставке, определяемой влиянием специфических лигандов, локализованное действие препаратов достигается за счет специфического связывания с антигенами клеточной поверхности или с рецепторами. Лекарства комбинируют с антителами или лигандами, обладающими сродством к определенному типу клеток, которые обеспечивают активный перенос препарата. Например, многие опухолевые клетки при раке печени, почек и молочной железы отличаются повышенным уровнем экспрессии рецепторов фолиевой кислоты [6]. Следовательно, к поверхности частиц, несущих лекарственный препарат, можно привить остатки фолиевой кислоты, что приведет к более активному накоплению лекарства в злокачественных клетках по сравнению с нормальными. Системы направленной доставки фармацевтических препаратов весьма полезны для лечения ряда заболеваний [7–9].

Развитие нанотехнологий произвело революционные изменения в разработке этих систем. В «наномире» оперируют объектами, размер которых находится в диапазоне от 0,1 до 100 нм, и понимание структуры материалов и их поведения в масштабе нановеличин может значительно ускорить развитие систем доставки лекарств [10]. Усовершенствование биомедицинских устройств позволит найти прежде неизвестные методы борьбы с раком и сердечно-сосудистыми заболеваниями. Благодаря особым свойствам нано- и микропереносчики заняли особую нишу в технологиях создания лекарственных препаратов. Какие же свойства обеспечивают уникальность наносистем для доставки лекарств?

7.2. Наносистемы для доставки лекарств

Системы доставки лекарств значительно повысили эффективность многих существующих препаратов и способствовали появлению новых технологий. Размер частиц, использующихся в таких системах, может находиться в макро- (> 1 мм), микро- или нанодиапазонах. Множество исследований было посвящено разработке макроскопических имплантатов и систем доставки лекарств [11, 12]. В литературе широко обсуждаются различные микротехнологии для создания данных систем, а также возможности совмещения систем доставки лекарств с макросенсорами и имплантатами [11, 12]. По сравнению с микро- и макросистемами, наносистемы обладают целым рядом преимуществ. Благодаря малому размеру наноструктуры легко поглощаются различными клетками организма путем эндоцитоза и, таким образом, свободно проникают сквозь клеточную мембрану. Средний диаметр человеческих клеток составляет 10–20 мкм, а размер клеточных органелл не превышает нескольких сотен нанометров. Уникальность наноустройств состоит в возможности взаимодействия с биомолекулами на поверхности и внутри клеток без отрицательного влияния на их свойства и поведение [13]. Переносчики более крупного размера не всегда могут достичь тканей и органов-мишеней, в частности преодолеть гематоэнцефалический барьер, разветвленную сеть легочных альвеол или слой плотно прилегающих клеток кожного эпителия [14]. Напротив, наноструктуры, имеющие размеры клеточных органелл, могут проходить сквозь фенестрированный эпителий кровеносных сосудов, накапливаться в интерстициальном пространстве и захватываться клетками при эндоцитозе [15]. Следовательно, нанопереносчики могут с высокой эффективностью доставлять молекулы лекарственного вещества к тем клеткам и тканям, куда не проникают более крупные частицы.

С помощью нанопереносчиков удастся доставлять множество терапевтических агентов, включая гидрофильные и гидрофобные лекарственные препараты, пептиды, нуклеиновые кислоты, вакцины и другие биологические макромолекулы [16–40]. Подобно микропереносчикам, нанопереносчики вводят в организм через рот, кожу, нос, глаза, вены или непосредственно в опухолевую ткань.

В этой главе обсуждаются синтез, свойства и применение различных наносистем доставки лекарственных препаратов: наночастиц, нановолокон, дендримеров, липосом, нанотрубок, фуллеренов, наногелей, нанокристаллов, вирусных векторов и вирусоподобных частиц.

7.3. Полимерные наночастицы

Полимерные наночастицы заинтересовали исследователей благодаря возможности их использования для контролируемой и направленной доставки лекарственных препаратов. Наночастицы обычно изготавливают из кремния [16, 17], углерода [18], металлов (например, золота [19] или платины [20]), а также из полимеров [21]. Среди перечисленных материалов полимеры заметно выде-

ляются по своим структурным и функциональным характеристикам. Они предоставляют более широкие возможности по методам синтеза и типам биологически активных агентов, которые предполагается инкапсулировать. Некоторые полимерные носители обладают биосовместимостью, способностью к биологическому разложению и рассасыванию и другими свойствами, необходимыми для переносчиков лекарств, а также возможностью их простой функциональной модификации [3]. Инкапсулирование лекарства в полимерный носитель позволяет лучше контролировать фармакокинетику препарата [21]. Доступность широкого спектра таких соединений, а также возможность изменять скорость высвобождения лекарств делает полимерные наночастицы кандидатами на роль терапевтических агентов для лечения многих заболеваний. Этот раздел посвящен рассмотрению свойств полимерных наночастиц и возможности их применения в системах доставки. Данные наночастицы получают из различных синтетических полимеров: полимолочной кислоты (ПМК) [22], полигликолевой кислоты (ПГК) [23], сополимера молочной и гликолевой кислот (ПМГК) [24], полиакрилатов [25], поликапролактама (ПКЛ) [26] и полиэтиленоксида (ПЭО) [27], а также природных полимеров, например альбумина [28], желатина [29], альгината [30], коллагена [31] и хитозана [6].

Есть несколько методов синтеза полимерных наночастиц. Среди эмульсионных технологий можно назвать метод простой эмульсии или эмульсии типа масло в воде [24–26, 32–34], двойной эмульсии (вода в масле в воде) [35–35], а также эмульгирование методом диффузии растворителя [38–40]. Кроме того, для приготовления наночастиц для доставки лекарств иногда применяют самопроизвольную сборку сополимеров с образованием полимерных мицелл [41–43], распылительную сушку [44] и высаливание [45, 46]. Полимерные наночастицы также могут образовываться в результате полимеризации мономеров. В этом случае наиболее распространенный способ синтеза — эмульсионная полимеризация, в ходе которой наночастицы равномерно распределяются в водной фазе и стабилизируются молекулами эмульгатора [47, 48]. Выбор метода синтеза наночастиц, содержащих терапевтический препарат, зависит от многих факторов, включая тип полимера, свойства лекарства, взаимодействие между лекарством и полимером, а также от целей эксперимента [49]. В этой главе не рассматриваются все существующие методы синтеза наночастиц. За получением дополнительной информации советуем обратиться к многочисленным статьям и обзорам по данной теме.

7.3.1. Структура и свойства

Наиболее важными характеристиками наночастиц, определяющими их активное использование в системах доставки лекарственных препаратов, служат размер, эффективность инкапсулирования и дзета-потенциал.

Размер и форма. Размер наночастиц чрезвычайно важен для их успешного использования в системах доставки. Для быстрого растворения в организме и проникновения в артериальную кровь нужны очень маленькие частицы

[50, 51]. С другой стороны, более крупные частицы медленнее растворяются и лучше связываются с системой мононуклеарных фагоцитов [34]. Размер полимерных частиц зависит от концентрации и молекулярной массы полимера, а также от концентрации поверхностно-активного вещества (ПАВ) [37, 52]. Форма наночастиц определяет механизм высвобождения лекарственного препарата. В его основе могут быть разложение полимерной матрицы, диффузия препарата или сочетание обоих процессов [3]. В компактных частицах выход лекарства контролируется расщеплением полимерной матрицы, а для частиц с порами и каналами в большей степени определяется диффузией [53].

Инкапсулирование лекарств. Эффективность включения лекарства в полимерный наноконтейнер в значительной степени определяют метод синтеза полимера, физико-химические свойства препарата, природа полимера и ПАВ, а также взаимодействия между полимером, лекарством и ПАВ [32–34]. Для включения терапевтического агента в наночастицы в основном используют два приема. Первый — включение в процессе приготовления частиц; второй — инкубация с ранее сформированными частицами [54]. В первом случае лекарство оказывается соединенным с полимерной матрицей химической связью или включенным в полимер за счет физических сил; во втором происходит физическая адсорбция молекул лекарства на поверхности наночастиц. Количество включенного препарата обычно больше при его введении в реакционную смесь в ходе формирования частиц, однако в этом случае нельзя исключить изменение его свойств под воздействием компонентов реакционной среды [54].

Дзета-потенциал. Еще одной важнейшей характеристикой наночастиц служит дзета-потенциал. Он является мерой стабильности частиц. Частицы, дзета-потенциал которых выше +30 мВ или ниже –30 мВ, обычно считают устойчивыми [55]. У заряженных частиц по мере повышения дзета-потенциала усиливается взаимное отталкивание, что приводит к образованию устойчивых частиц с более узким распределением по размерам. Нестабильность частиц, как правило, вызывает их агрегацию. Для контроля дзета-потенциала и, следовательно, улучшения стабильности наночастиц часто используют модификацию поверхности [56].

7.3.2. Применение наночастиц для создания систем доставки лекарств

Терапевтическую эффективность системы доставки лекарственных препаратов оценивают по выходу препарата из наночастиц. Высвобождение лекарства можно регулировать путем изменения свойств полимеров и лекарственных веществ, а также изменением внешних условий: pH, температуры и магнитной напряженности. Большие возможности варьирования факторов, влияющих на профиль высвобождения лекарства, позволили применять подобные системы в различных биомедицинских областях. Рассмотрим несколько ярких примеров терапевтического применения наночастиц.

Химиотерапия при онкологических заболеваниях. Проведение химиотерапии часто ограничивается токсичностью лекарственных препаратов. Она связана с недостаточной избирательностью действия лекарства на опухолевые клетки по сравнению с нормальными клетками, что приводит к побочным эффектам. Полимерные наночастицы, используемые в качестве носителей противоопухолевых агентов, повышают терапевтическое действие и снижают токсичность препаратов. Для направленного влияния на раковые клетки чаще всего применяется пассивное [57, 58] или активное нацеливание [59, 60]. Один из методов активного нацеливания состоит в использовании наночастиц-невидимок, или стелс-наночастиц (от англ. *stealth* — хитрый, замаскированный), которые не опсонизируются и не распознаются макрофагами [61]. Для получения частиц-невидимок поверхности наночастиц придают гидрофильные свойства. Гидрофильное покрытие препятствует связыванию белков, активации комплемента и захвату ретикулоэндотелиальной системой за счет стерического отталкивания [62]. В целях увеличения времени циркуляции наночастиц в крови и их преимущественного накопления в опухолевых тканях, в качестве оболочки чаще всего используют ПЭГ [63–65] и ПЭО [66–68].

Доставка лекарств в головной мозг. Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) преодолить для большинства антибиотиков, противоопухолевых агентов и многих препаратов, действующих на центральную нервную систему. ГЭБ образуют эндотелиальные клетки капилляров мозга. Он служит основной поверхностью раздела между кровью и мозгом [69]. Эндотелиальные клетки кровеносных сосудов головного мозга характеризуются плотными межклеточными контактами, препятствующими любому параклеточному транспорту. Наличие данных контактов и отсутствие межклеточного транспорта значительно ограничивают перенос полярных соединений через эндотелий сосудов мозга. Диффузия лекарств из крови в головной мозг очень сильно зависит от способности биологически активных молекул проникать сквозь липидные мембраны [70].

Полимерные наночастицы обладают рядом преимуществ перед свободными лекарствами. Во-первых, прочная матрица носителя защищает препарат от расщепления, что повышает вероятность его проникновения в мозг [71]. Во-вторых, природа полимера может способствовать направленному и контролируемому переносу лекарства в мозг [71, 72]. Для активного транспорта через эндотелиальные клетки капилляров головного мозга применялись лектины [73], полисорбат-80 [74], апополипротеин Е [75], трансферрин [76] и пептиды [79]. Оказалось, что они облегчают проникновение лекарственных препаратов через ГЭБ. Свойства поверхности наночастиц можно изменять так, чтобы они не распознавались макрофагами ретикулоэндотелиальной системы и, следовательно, с большой вероятностью проникали в головной мозг [71]. Полагают, что транспорт заключенных в наночастицы лекарств через ГЭБ происходит путем эндоцитоза эндотелиальными клетками, выстилающими капилляры кровеносных сосудов головного мозга [80].

Доставка генов. Для эффективной доставки генов необходимо ввести в клетку-мишень плазмидную ДНК, добиться ее транскрипции и трансляции

информации в соответствующий белок. В генной терапии используют два основных типа векторов — основанных на вирусных и невирусных системах соответственно. Вирусные системы характеризуются высокой эффективностью трансфекции, но обладают онкогенным потенциалом и иммуногенностью [81]. Поэтому все чаще начинают применяться невирусные системы доставки, преимуществами которых являются простота синтеза, направленный транспорт, пониженная иммуногенность и неограниченный размер вектора [82]. Например, для создания невирусных систем доставки генов используют катионные полимеры. Обычно комплексы поликатионов с ДНК очень устойчивы [81, 82]. Скажем, хитозан [83–85] и полиэтиленимин [86, 87] широко применяют при синтезе наночастиц с целью инкапсулирования ДНК и в дальнейшем используют как векторы для доставки генов. Катионные полиэлектролиты взаимодействуют с отрицательно заряженной ДНК и образуют полиэлектролитные комплексы [86]. В составе данных комплексов ДНК лучше защищена от расщепления нуклеазами, что способствует эффективной трансфекции. Применение полимерных наночастиц для безопасной и направленной доставки генов определяется химической структурой поликатионов, размером и составом комплексов, свойствами нацеливающих лигандов, количеством плазмидной ДНК и рН трансфекционной среды.

7.4. Нановолокна

Волокна с диаметром менее 1 мкм принято называть нановолокнами. Однако в большинстве исследований по применению нановолокон для доставки лекарств используются волокна с диаметром от нескольких нанометров до сотен нанометров [89]. При этом длина нановолокна может достигать тысячи метров. Нановолокна изготавливают из углерода [90], металлоорганических соединений [91], неорганических соединений [92, 93] и органических полимеров [94]. Преимущества использования нановолокон для доставки активных веществ в организм связаны с большой удельной площадью поверхности, контролируемым размером пор и возможностью управления кинетикой высвобождения инкапсулированных препаратов путем изменения состава и структуры волокон [95]. Свойства многих полимеров — возможность биоразложения, биосовместимость и легкость обработки — объясняют их широкое использование в системах доставки лекарств [96]. Поэтому в следующих разделах будут описаны методы синтеза и возможности применения именно полимерных нановолокон.

7.4.1. Синтез

Есть несколько методов синтеза нановолокон: вытягивание [97, 98], матричный синтез [99–102], самопроизвольная сборка [103–107], разделение фаз [108] и электроспиннинг [109–112]. Среди перечисленных способов наиболее удобным для использования в системах доставки лекарств оказался электроспиннинг, поэтому ниже будет рассмотрен именно этот метод. Для изучения деталей других методов синтеза советуем читателю обратиться к прекрасным обзорам [96, 113, 114].

Электроспиннинг — сравнительно гибкий, простой, недорогой и быстрый метод [110]. Свойства инкапсулируемого активного агента, небольшой молекулы лекарства или макромолекулы, например белка или нуклеиновой кислоты, определяют выбор синтетического или природного полимера [109]. Кроме того, электроспиннинг, по-видимому, — единственный метод, который удастся масштабировать для промышленного производства нановолокон [113].

Для проведения синтеза раствор полимера помещают в шприц с присоединенной иглой [109]. Обычно к раствору полимера прикладывается высокое напряжение, в результате на молекулах полимера возникает заряд. Положительный выход источника напряжения соединяют с иглой шприца, наполненного полимерным раствором, а отрицательный — заземляют. В ходе процесса конец иглы также находится под напряжением. Выходящие из шприца капли раствора заряжаются, а взаимное отталкивание молекул полимера в каплях создает силу, противоположно направленную действию поверхностного натяжения на острие иглы. При некотором критическом напряжении электрического поля капли начинают удлиняться, образуя на конце иглы так называемые конусы Тейлора [110]. При превышении некоторого критического напряжения электрические силы в жидкости превосходят силы поверхностного натяжения, и вместо конуса образуется тонкая струя полимера. Эта струя направляется к заземленному коллектору, причем ее направление от конца иглы к коллектору не соответствует прямой — струя изгибается и искривляется, в результате ее диаметр постепенно уменьшается [109]. Поскольку струя движется в воздухе, происходит испарение растворителя, и образующиеся нити полимера собираются в коллекторе подобно нетканым волокнам. Главную роль в процессе образования нановолокна из струи полимера играет вязкость раствора (или расплава) [112]. Если растворы обладают низкой вязкостью, струя полимера распадается на капли. Такой процесс называют электрораспылением [115]. Для получения длинных волокон требуются вязкие полимеры и длинноцепочечные молекулы [113]. Влияющие на электроспиннинг факторы разделяют на три категории. К первой относятся свойства раствора: вязкость, проводимость/полярность и поверхностное натяжение; ко второй — параметры процесса: приложенное напряжение, расстояние от конца иглы до коллектора, диаметр конца иглы, скорость подачи полимера и гидростатическое давление на раствор полимера; к третьей — внешние параметры: температура, скорость движения воздуха и влажность в камере электроспиннинга [116].

Подробнее с процессом электроспиннинга и влиянием различных параметров на свойства полимерных нановолокон можно ознакомиться в работах [109, 116 и 117].

7.4.2. Применение нановолокон

Полимерные нановолокна применяются достаточно широко, в том числе для фильтрации воздуха на промышленных предприятиях [118], создания защитной одежды с определенным размером пор [119], в тканевой инженерии [96]

и для доставки лекарств и генов [98, 111]. Нетканые полимерные волокна можно использовать в тканевой инженерии в качестве матрицы, к которой прикрепляются клетки, образующие новые ткани. «Идеальная» матрица имитирует внеклеточный матрикс (ВКМ), окружающий клетки в естественных условиях. В этом случае структура и форма нетканых волокон должны быть максимально похожи на ВКМ [96]. Исследования показали, что при наличии полноценной культуральной среды клетки, высеваемые на биоразлагаемые полимерные нановолокна, способны прикрепляться, пролиферировать и сохранять свой фенотип [120]. Матрицы из нановолокон, полученные методом электроспиннинга, используются как носители гидрофобных и гидрофильных лекарственных препаратов, а также крупных молекул, например ДНК и белков, и их высвобождение можно контролировать путем изменения структуры, пористости и состава матрицы [113]. Благодаря малому диаметру, нановолокна характеризуются большой удельной площадью поверхности. Преимуществом доставки активных веществ с помощью полимерных нановолокон является увеличение скорости растворения биопрепарата с возрастанием удельной площади поверхности носителя [117]. Кроме того, большая удельная площадь поверхности позволяет модифицировать нановолокна с помощью специфических лигандов и антител. Таким образом, нановолокна с инкапсулированными биологически активными компонентами можно использовать в терапевтических целях для активного транспорта к клеткам и тканям-мишеням [121]. Рассмотрим подробнее вопросы, связанные с применением полимерных нановолокон для доставки лекарств, которые поделены на две части в соответствии с типом терапевтического агента: низкомолекулярных лекарств или макромолекул.

Нановолокна для доставки лекарств. Кенави с сотрудниками синтезировали нановолокна из полимолочной кислоты (ПМК) и сополимера полиэтилена с поливинилацетатом (ПЭВА) методом электроспиннинга и использовали их в качестве носителей в системах доставки лекарств [120]. В качестве модельного препарата они выбрали тетрациклин. Оказалось, что скорость высвобождения лекарства в буфере «Tris» выше для волокон из ПЭВА, чем для волокон из ПМК/ПЭВА (50 : 50) или просто из ПМК. Это связано с определенной кристаллической структурой ПМК, затрудняющей диффузию лекарства. В аналогичном исследовании Зенг с коллегами получали нановолокна из ПМК, содержащие противотуберкулезный препарат рифампин [121]. Свойства нановолокон и кинетику высвобождения препарата изучали в буфере «Tris» в присутствии различных ионных и неионных ПАВ. Лекарство хорошо включалось в волокна, и его резкого выброса не происходило. Высвобождение препарата объясняли, главным образом, расщеплением ПМК в присутствии протеиназы К, воздействующей на полимер, а не диффузией препарата. Зонг с сотрудниками сообщали о создании пучков нановолокон ПМК, содержащих гидрофильный антибиотик мефоксин, часто применяемый для предотвращения инфекции после хирургического вмешательства [114]. Лекарство полностью высвобождалось из матрицы за 48 ч. Наиболее активно данный процесс протекал первые три часа. В аналогичном исследовании Ким с соавторами синтезировали наново-

локна ПМГК, содержащие мефоксин [122]. Из-за ограниченного физического взаимодействия между мефоксином и матрицей ПМГК большая часть препарата концентрировалась на поверхности нановолокон. Поэтому молекулы лекарства легко смывались с поверхности в водном растворе, что приводило к быстрому выходу практически всего препарата в самом начале эксперимента. Для достижения пролонгированного высвобождения лекарства к смеси мефоксина и полимера добавляли амфифильный блок-сополимер ПЭГ/ПМК. В этом случае некоторые молекулы лекарства включались в гидрофильный блок ПЭГ/ПМК, что предотвращало быстрый выброс препарата. Фармакологическую активность выходящего мефоксина оценивали по его действию на клетки *Staphylococcus aureus*. Высвобождавшийся из нановолокон антибиотик эффективно ингибировал рост бактерий. Куи с коллегами исследовали влияние диаметра волокон и исходного содержания лекарства на профиль его высвобождения из нановолокон ПМК, полученных электроспиннингом [123]. В качестве модельного препарата использовался анальгетик парацетамол. Оказалось, что профиль высвобождения лекарства из пучков нановолокон имеет две характерные области: за активным начальным выбросом препарата следовал период высвобождения с постоянной скоростью. Поры, образующиеся в результате диффузии молекул парацетамола из внешнего слоя волокон, способствовали последующему равномерному выходу лекарства из внутренних слоев. Первоначальный активный выброс препарата усиливался с увеличением исходного содержания парацетамола в волокнах. При низкой концентрации лекарства в волокнах образовывалось меньше пор, формируемых при начальной диффузии препарата, что впоследствии приводило к замедлению его высвобождения. Это исследование подтвердило возможность изменения кинетики выхода лекарства из нановолокон. Катти с соавторами [124] включали антибиотик широкого спектра действия цефазолин в нановолокна ПМГК. При этом изучалось влияние параметров процесса электроформования волокон на их форму и диаметр.

Веррек с коллегами синтезировали полиуретановые нановолокна методом электроспиннинга и помещали в них нерастворимые в воде лекарственные препараты в аморфном состоянии [125]. Модельными препаратами были итраконазол и кетансерин. Изучалась взаимосвязь между соотношением лекарство/полимер и концентрации полимера со строением волокна. Оказалось, что диаметр волокна уменьшается при увеличении соотношения лекарство/полимер и снижении концентрации полимера. Высвобождение итраконазола происходило равномерно — без резкого начального выброса. Длительность выхода лекарства увеличивалась с повышением его исходной концентрации, а механизм высвобождения определялся диффузией из полимерной матрицы. Выход кетансерина был неравномерным: наблюдалась высокая начальная скорость выхода препарата по сравнению с таковой у итраконазола. Различие в поведении обоих препаратов объясняется различной растворимостью и скоростью диффузии в матрице. Роузен с сотрудниками исследовали образование эродируемых нановолокон, содержащих стероид из полибис(карбоксифеноксид)метана (ПКФМ) методом разделения фаз [126]. В профиле высвобождения стероида наблюдался индукцион-

ный период, когда эрозии не происходило, затем следовал почти линейный выход препарата. Оказалось, что в физиологических условиях ПКФМ полностью разлагается до мономеров, и лекарство высвобождается со скоростью, подходящей для терапевтических целей. Таким образом, ПКФМ может служить прототипом полиангидрида для использования в системах доставки лекарств, основанных на биологической эрозии матрицы. Другая исследовательская группа методом электроспиннинга синтезировала нановолокна из ПВА [127]. Были использованы четыре модельных лекарства с различной растворимостью. Свойства препаратов определяли структуру нановолокон и кинетику высвобождения включенных в них соединений. Выяснилось, что скорость выхода и количество свободного препарата в основном определяются его молекулярной массой, причем оба параметра уменьшались с возрастанием молекулярной массы.

Хуанг с соавторами предложили модифицировать метод электроспиннинга для синтеза нановолокон ПКЛ с коаксиальной структурой типа «ядро–оболочка» [128]. В этом случае ядро содержало раствор лекарства, а оболочка — раствор полимера. В качестве моделей использовали антиоксидант ресвератрол и антибиотик гентамицин. Строение образующихся волокон зависело от концентрации включенных препаратов и их взаимодействия с полимером. Высвобождение лекарств было постепенным, без активного выброса, что указывает на успешное внедрение препаратов в матрицу. Кинетика выхода лекарственных средств определялась, главным образом, разложением матрицы ПКЛ, а не диффузией препаратов. Таким образом, данное исследование показало возможность синтеза нановолокон со структурой «ядро–оболочка» методом электроспиннинга, а также перспективность использования подобных систем для доставки лекарственных препаратов.

Жианг с коллегами провели электроформование привитого сополимера хитозана с полиэтиленгликолем (ПЭГ/ХЗ и ПМГК) с целью создания нановолоконных матриц и выяснили возможность использования этих систем для доставки лекарственных препаратов [130]. В качестве модели был выбран ибупрофен. Изучали кинетику высвобождения препарата и сопоставляли данные с анализом взаимодействия лекарства и полимера. Ибупрофен связывали с полимером двумя способами — за счет ковалентного взаимодействия с ПЭГ/ХЗ или за счет электростатических сил между заряженными карбоксильными группами ибупрофена и аминогруппами хитозана. Из волокон ПМГК препарат высвобождался с активным выбросом в начале, а из волокон ПЭГ/ХЗ/ПМГК он выходил более медленно и равномерно. Причиной этого, по-видимому, служит наличие электростатических или ковалентных взаимодействий между лекарством и полимером внутри нановолокон из ПЭГ/ХЗ/ПМГК, ограничивающих диффузию лекарства из матрицы.

Нановолокна для доставки макромолекул. Большая удельная площадь поверхности и высокая проницаемость пористых нановолокон позволяют рассматривать их как кандидатов на роль носителей для направленной и пролонгированной доставки в организм белков, ферментов, факторов роста и нуклеиновых кислот. При синтезе нановолокон для использования в качестве матрицы

при доставке макромолекул необходимо учитывать структурную устойчивость и биохимические свойства активного вещества. Пучки нановолокон должны обеспечивать контролируемый направленный транспорт биологических макромолекул длительное время [119]. Кроме того, матрица служит защитой активного компонента от действия биологической системы до его высвобождения. Во многих исследованиях показана возможность применения метода электроспиннинга для создания полимерных нановолокон для этой цели [131–138]. Установлено, что биологическая активность макромолекул и их способность проникать в клетки после высвобождения из полимерного носителя сохраняются. Некоторые аналогичные исследования обсуждаются ниже.

Луу с соавторами получили матрицу из нановолокон, состоящую из ПМГК и триблок-сополимера ПМК/ПЭГ/ПМК, и изучили возможность включения в нее молекул ДНК [131]. Оказалось, что повышение концентрации амфифильного сополимера приводит к утолщению нановолокон и, следовательно, к замедлению высвобождения ДНК. После электроформования волокон структурная целостность включенной в матрицу ДНК полностью сохранялась. Способность ДНК, высвобождаемой из матрицы, проникать внутрь клеток оценивали с помощью преостеобластов. Результаты исследования показали, что выходящая из волокон плазида рСМV β проникала в клетки, где ген β -галактозидазы успешно экспрессировался и транскрибировался. В похожем исследовании Лианг с коллегами включали плазмиду рСМV β в волокна со структурой «ядро–оболочка» [132]. ДНК конденсировали в диметилформамиде, а затем включали образующиеся плотные глобулы в триблок-сополимер ПМК/ПЭГ/ПМК; оболочкой служила ПМГК. Смесь инкапсулированной ДНК и ПМГК подвергали электроформованию, в результате образовывалась матрица из нановолокна. Оболочка полимолочной кислоты защищала ДНК от расщепления во время электроформования. Биологически активная плазмидная ДНК контролируемо высвобождалась из матрицы и сохраняла способность проникать в клетки преостеобластов *in vitro*.

В исследовании Зенга с соавторами была изучена кинетика выхода бычьего сывороточного альбумина (БСА) из нановолокон ПВА [133]. Образованные посредством электроспиннинга волокна покрывали гидрофобной оболочкой из поли-*n*-ксилена (ППК) для контроля выхода белка из волокон. Покрытые ППК нановолокна обеспечивали более медленное высвобождение БСА (скорость выхода зависела от толщины покрытия), чем нановолокна из ПВА без покрытия. В этом же исследовании оценивали активность модельного фермента люциферазы, после его высвобождения из волокон. Фермент выходил из матрицы медленно, и его структура по данным гель-электрофореза не изменилась. Жианг с коллегами создали нановолокна типа «ядро–оболочка», где оболочка состояла из ПКЛ, а ядро — из ПЭГ; в ядро также заключали БСА и лизоцим. Нановолокна синтезировали методом электроспиннинга, при этом два полимера формовались одновременно. Это позволило синтезировать коаксиальные волокна. Толщина слоя ядра и оболочки, а также скорость высвобождения белка контролировали с помощью изменения скорости подачи растворенного полимера. Электроформование не повлияло на структуру и стабильность белков.

Та же исследовательская группа изучала возможность доставки макромолекул с использованием нановолокон из декстрана [135]. Данные волокна одинаковой толщины синтезировали, применяя различные растворители: воду, диметилсульфоксид и диметилформамид. После электроформования волокон структура и активность включенных в них БСА и лизоцима сохранялись. Таким образом, показана принципиальная возможность включения растворимых в воде макромолекул в нановолокна с целью их использования в системах доставки лекарств.

Одним из важнейших биохимических компонентов для тканевой инженерии являются факторы роста. Они необходимы для контроля роста и пролиферации клеток, а также для стимулирования образования тканей. Факторы роста можно доставлять в исходном виде или индуцировать их экспрессию с помощью соответствующих генов. У данных соединений небольшое время полужизни, они быстро разлагаются или выводятся, что снижает их биологическое действие [136]. Во многих исследованиях предпринимались попытки создания нановолокон-матриц для включения факторов роста; результаты таких экспериментов показали потенциальную возможность применения подобных систем доставки с сохранением биологической активности включенного компонента [137–149]. Для изучения возможностей транспортировки факторов роста с целью терапевтического использования при заболеваниях нервной системы применяли созданные электроспиннингом нановолокна из сополимера капролактона и этилэтиленфосфата [137]. В волокна включали человеческий фактор роста нервов (ФРН); продолжительное высвобождение активного вещества путем диффузии продолжалось три месяца. Результаты исследования показали, что выходящий ФРН стимулировал рост нейронов *in vitro*. Подобные системы, обеспечивающие длительное высвобождение ФРН, могут оказаться весьма полезными, поскольку *in vivo* ФРН обладает коротким временем полужизни [137]. В аналогичной работе изучалось высвобождение ФРН из нановолокон ПЭВА [138]. Динамику высвобождения и активность ФРН анализировали на клетках млекопитающих. Исследования *in vitro* показали, что выходящий ФРН стимулировал рост нейронов. Еще в одном эксперименте проверяли возможность использования фибрина в качестве матрицы для доставки ФРН [139, 140]. Результаты показали, что фибриновые матрицы могут усиливать регенерацию периферических нервов и, следовательно, пригодны как системы доставки ФРН при болезнях Альцгеймера и Паркинсона [141]. Также изучали способы доставки факторов роста, необходимых для репарации и регенерации костной ткани [142–148]. Для регенерации нужны β -трансформирующий фактор роста (β -ТФР), тромбоцитарный фактор роста (ТрФР) и фактор роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ) [142]. Результаты исследований по применению полимерных нановолокон для доставки β -ТФР [143, 144], ТрФР [145–147] и ФРСЭ [148, 149], продемонстрировали контролируемое высвобождение ростовых факторов из матрицы и, следовательно, возможность использования подобных систем для транспортировки факторов, необходимых для роста и регенерации костей.

Таким образом, представленные выше результаты изучения нановолокон в качестве носителей для доставки биологических молекул весьма перспективны и предполагают последующие исследования в области создания систем доставки лекарственных препаратов.

7.5. Дендримеры

Дендримеры — разветвленные глобулярные молекулы с трехмерной структурой [150, 151]. Слово «дендример» происходит от греческих слов *dendron* и *mers*, где первое означает *дерево*, а второе — *часть*. Таким образом, дендримером называют часть дерева, что отражает симметричную древоподобную структуру данных полимеров (рис. 7.1). Технически дендример — это полимер, состоящий из множества соединенных между собой мелких химических звеньев. Для синтеза дендримеров существуют два основных способа. Первый, предложенный Томалиа, представляет собой дивергентный метод, где дерево «произрастает» из центрального ядра. Иными словами, происходит сборка мономерных модулей в радиальном направлении, ветка от ветки [152]. Второй метод, разработанный Хоукером и Фречетом, называется конвергентным [153].

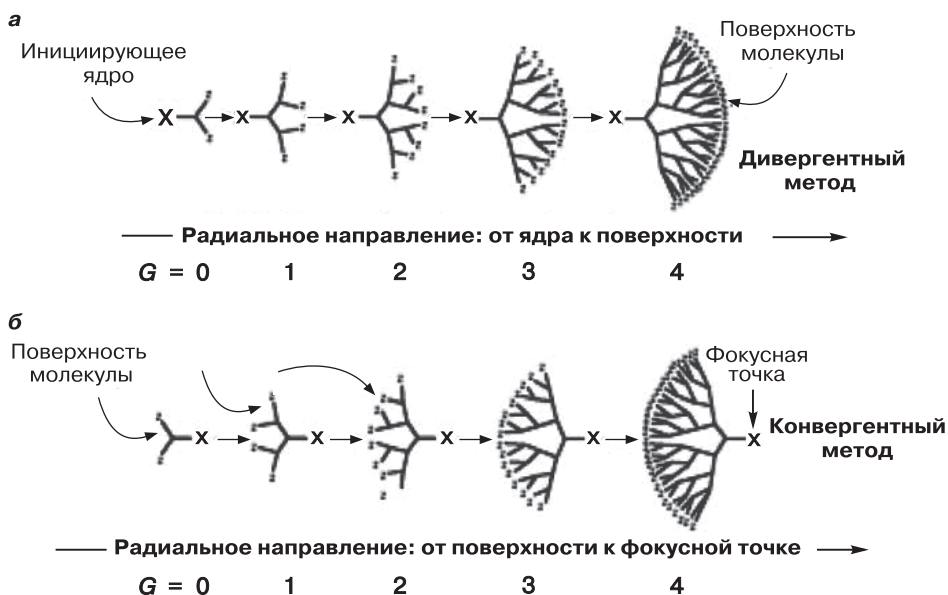


Рис. 7.1. Схематическое изображение двух методов синтеза дендритных макромолекул (дендронов): *а* — дивергентный метод, где синтез начинается от полифункционального ядра и продолжается в радиальных направлениях за счет последовательных стадий активации и конденсации; *б* — конвергентный метод, где синтез начинается с тех ветвей, которые образуют периферию окончательно сформированной молекулы, и продолжается в направлении к фокусной точке. Воспроизводится в соответствии с работой [154] с разрешения Elsevier

Он реализуется путем соединения звеньев, от будущей поверхности дендримера к фокусной точке, в результате чего также образуется дерево. Этот подход очень удобен для создания дендримеров, которые затем используются в качестве строительных блоков более крупных наноструктур. Конвергентная модель обеспечивает доступ к «клиньям» дендримера с различной реактивностью в фокусной точке и на концах цепей (см. рис. 7.1, где схематично изображены оба подхода) [154]. Дендримеры можно синтезировать поэтапно, что позволяет контролировать их размер путем изменения концентрации мономеров [150]. Таким образом, можно создавать дендримеры определенного размера — от 70 до 300 нм [151–154].

7.5.1. Свойства дендримеров

Дендримеры имеют уникальные особенности: высокую степень разветвленности, поливалентность, глобулярное строение и установленную молекулярную массу [155, 156]. Разумное использование этих свойств помогает с высокой воспроизводимостью создавать эффективные системы доставки лекарств [157, 158]. Ступенчатый синтез дендримеров позволяет получать молекулы с регулярным ветвлением, низким индексом полидисперсности и строго определенным числом периферических групп. Таким образом, дендримеры, образующиеся путем поэтапного синтеза, выгодно отличаются идеальным характером ветвления от более распространенных глобулярных молекул, получаемых полимеризацией, поскольку последние характеризуются излишней и нерегулярной разветвленностью. Архитектура дендримеров также интересна [159]. Полости и каналы в ядре и в ветвях могут обладать гидрофильной или гидрофобной природой в зависимости от химических свойств мономеров. Кроме того, в процессе синтеза в молекулу удается включать участки связывания требуемых лигандов. Следовательно, выбор метода синтеза дендримеров и исходных мономеров позволяет определять форму, размер, плотность, полярность, реакционную способность и растворимость молекул.

7.5.2. Применение дендримеров для доставки лекарств

Дендримеры играют немаловажную роль в развитии нанотехнологий, так как представляют собой строительные блоки с контролируемыми параметрами. Они используются в мономолекулярных устройствах, нанореакторах, биологических сенсорах для медицины и направленной доставке лекарств и генов [155, 160, 161]. Широкий спектр возможностей применения дендримеров связан с их радиальным строением, наличием полифункциональной поверхности и внутренних полостей. Перечисленные выше особенности делают дендримеры идеальными носителями для доставки лекарств и переноса генов. Биологически активные вещества либо включают внутрь молекулы, либо химически или физически связывают с поверхностью. Поверхность, внутреннее пространство и ядро носителя можно модифицировать в зависимости от свойств активного вещества и в соответствии с поставленной задачей.

В настоящее время известно свыше 50 семейств дендримеров [162], причем каждое из них отличается от других по ряду свойств. Первое семейство, синтезированное, охарактеризованное и выпускающееся в промышленных масштабах, составляют дендримеры на основе полиамидоамина (ПАМАМ) [154]. Внутренние третичные аминогруппы ПАМАМ доступны для кислотно-основных реакций, образования водородных связей и других нековалентных взаимодействий с инкапсулированными молекулами, что позволяет использовать этот полимер как носитель многих лекарственных препаратов [163]. Патри с коллегами исследовали возможность применения дендримеров на основе ПАМАМ в качестве систем доставки лекарств с целью снижения их токсичности и повышения растворимости в воде [164]. Поверхность полимера модифицировали введением гидроксильных групп, что значительно повышало его растворимость. Также к дендримеру ковалентно присоединяли метотрексат. Помимо этого, изучали нековалентный комплекс терапевтического агента с дендримером, в котором лекарство располагалось внутри полимера. Исследование кинетики высвобождения метотрексата показало, что из нековалентного комплекса лекарство выходило сразу, однако конъюгаты метотрексата с дендримером были устойчивы в воде и в фосфатно-солевом буфере. Таким образом, экспериментально доказано, что расщепляемый ковалентный конъюгат лекарства с дендримером пригоден для доставки, поскольку преждевременный выход препарата в биологических условиях не происходит.

Простейшим способом получения конъюгатов лекарств с дендримерами является присоединение молекул терапевтического агента непосредственно к поверхности. Поскольку она может иметь полифункциональные свойства, к одной молекуле дендримера присоединяют много молекул лекарства. Их число можно изменять путем выбора условий проведения реакции присоединения. Ковалентное связывание препарата с поверхностью дендримера описано в нескольких работах [165, 166]. Например, Малик с соавторами изучали противоопухолевую активность конъюгата дендримера на основе ПАМАМ с солью платиновой кислоты и обнаружили противоопухолевую активность по отношению ко всем модельным опухолям, включая модель, устойчивую к препаратам платины [165]. Жуо с коллегами синтезировали дендримеры ПАМАМ и конъюгировали их с 5-фторурацилом [166]. Гидролиз конъюгатов в фосфатном буфере приводил к высвобождению 5-фторурацила.

Нестероидные противовоспалительные препараты (НСПВП) относятся к ряду наиболее часто применяемых лекарств, особенно при остеоартрите и других хронических скелетно-мышечных заболеваниях [167]. Из фармакологических средств данного типа, как правило, используют кетопрофен, ибупрофен, дифлунизал и напроксен. Однако применение НСПВП связано с рядом побочных эффектов, включая нарушение работы почек, желудочно-кишечные кровотечения и реакции гиперчувствительности [168]. Многие исследователи изучали возможность конъюгации НСПВП с дендримерами, транспорт полученных конъюгатов в клетки и их терапевтическую активность [169–171]. Денис с коллегами провели растворимость в воде кетопрофена, ибупрофена, дифлунизала и напроксена

в присутствии дендримеров ПАМАМ с этилендиамином во внутренней полости дендримера [168]. Оказалось, что дендримеры в значительной степени повышают растворимость НСПВП. Более того, в растворе дендримера она росла почти линейно с увеличением концентрации полимера. Авторы работы [168] также показали возрастание биодоступности препаратов с увеличением их растворимости. Причиной повышения растворимости лекарств, по-видимому, являются электростатические взаимодействия и образование водородных связей между поверхностными аминогруппами дендримера и карбоксильными группами НСПВП. В другом исследовании был проведен синтез конъюгатов гидроксильированного дендримера ПАМАМ с ибупрофеном. Конъюгат содержал большое количество лекарства для лучшего проникновения препарата в клетки и снижения системного побочного действия [169]. Конъюгаты дендримера с ибупрофеном незамедлительно попадали в клетки легочного эпителия и преимущественно локализовались в цитоплазме. Наносистемы на основе дендримеров с высоким содержанием лекарственного препарата позволяют быстро достичь необходимого фармакологического действия. В будущем следует оценить фармакокинетические и фармакодинамические параметры подобных систем на животных. Еще одним исследовательским коллективом была изучена возможность использования дендримеров на основе ПАМАМ для доставки кетопрофена [172]. Оказалось, что *in vitro* время полужизни кетопрофена в комплексе с дендримером значительно повышалось по сравнению со свободным кетопрофеном. Изучение циркуляции препарата на мышах показало более длительное пребывание в крови комплекса препарата с дендримером по сравнению с контрольным образцом. Таким образом, дендримеры на основе ПАМАМ можно рассматривать как потенциальные переносчики лекарственных препаратов, обеспечивающие более длительную циркуляцию и снижение побочных эффектов.

Дендримеры также можно использовать для доставки генов сквозь клеточную мембрану в ядро. Концевые аминогруппы молекулы дендримера ПАМАМ взаимодействуют с фосфатными группами нуклеиновых кислот. Это обеспечивает образование трансфекционных комплексов [173–175]. В настоящее время уже налажен промышленный выпуск реагента для трансфекции «SuperFect», состоящего из активированных дендримеров. Они способны переносить больше генетического материала, нежели вирусы. Комплексы «SuperFect» с ДНК устойчивы и обеспечивают эффективный транспорт ДНК в ядро. Высокая способность к трансфекции связана не только с определенной формой дендримеров, но, вероятно, и с низкими значениями pK_a аминов (3,9 и 6,9). Данное значение pK_a позволяет дендримеру нивелировать изменение pH в эндосомах [176]. Точно определенные размеры соединений этого класса полимеров в пределах нанодиапазона и множество участков связывания различных лигандов и биологически активных соединений делают дендримеры подходящими кандидатами для генной терапии. К их поверхности можно присоединять вещества, способствующие проникновению дендримеров в ядро клетки. Все вышеперечисленное позволяет предположить будущее использование дендримеров в качестве реагентов для переноса генетической информации на клеточном и системном уровне [177].

В результате сочетания дивергентного и конвергентного синтеза удалось создать новые дендримеры на основе сополимеров простых и сложных эфиров, содержащие гидрофильное ядро [178]. Для этого внутрь дендримеров помещали полиэтиленоксид (ПЭО). Дендримеры могут включать в свой состав гидрофильные и гидрофобные модельные соединения в значительных количествах. Помещение лекарства внутрь дендримеров происходило путем физического захвата и (или) образования водородных связей с ПЭО как внутри молекулы дендримера, так и снаружи. Выход гидрофильных и гидрофобных препаратов в фосфатном буфере был медленным и равномерным; за 170 ч высвобождалось около 90% вещества. Следовательно, такие дендримеры можно рассматривать в качестве потенциальных систем доставки лекарств. Бхадра с соавторами описали синтез пептидных дендримеров для доставки противомаларийного препарата артемизинин [179]. Был синтезирован пептидный дендример с ПЭГ в качестве ядра и *L*-лизинном как повторяющимся звеном. Артемизинин образовывал комплекс с внутренней поверхностью дендримера за счет водородных связей и гидрофобных взаимодействий. В эту же систему вводили хондроитинсульфат А (ХСА), что повышало степень связывания противомаларийного препарата. Помимо этого, конъюгация с ХСА приводила к ослаблению гемолиза и токсического воздействия макрофагов. Данные соединения эффективно удаляли *in vitro* кольцевые и трофозоитные формы *Plasmodium falciparum*. Изучение таких комплексов *in vivo* на мышах показало продолжительное высвобождение артемизинина (до 13 ч после внутримышечного введения) как в системах с ХСА, так и без него. Это исследование подтверждает потенциальную возможность применения дендримеров для контролируемой доставки противомаларийных препаратов.

Таким образом, дендримеры предоставляют возможность для присоединения и высвобождения лекарств по нескольким механизмам. Описанные выше свойства имеют большое значение для рассмотрения дендримеров как потенциальных носителей в системах доставки.

7.6. Липосомы и липидные наночастицы

Липосомы — микроскопические сферические частицы, мембраны которых построены из двойного фосфолипидного слоя. Их используют для доставки лекарств, вакцин или генетического материала в клетки [180, 181]. В зависимости от числа двойных слоев мембраны липосомы подразделяют на мультислойные, многослойные везикулы (МЛВ); малые однослойные, однослойные везикулы (МОВ) и крупные однослойные везикулы (КОВ) [182]. Диаметр липосом варьируется в пределах от 25 нм до 10 мкм. Размер и морфология этих частиц зависят от метода синтеза и от концентрации растворов. Впервые Бэнгхэм и Хорн описали липосомы в качестве перспективных парентеральных переносчиков лекарств в 1960-х гг., а на практике они стали использоваться в 1970-е гг. [183]. Широкое применение липосом в этом качестве связано с легкостью их сборки, что позволяет создавать системы различного назначения. Кроме того, липосомы обладают биосовместимостью, способны переносить

гидрофильные и гидрофобные соединения, включая малые молекулы и крупные макромолекулы, например ДНК. Кроме того, липосомы способны присоединять к поверхности различные лиганды или определенные молекулы. К недостаткам данных частиц относятся ограниченная физическая стабильность липидных дисперсий, утечка инкапсулированных препаратов, низкая терапевтическая эффективность, связанная с отсутствием направленной доставки к клеткам или тканям, неспецифическое выведение системой мононуклеарных фагоцитов, а также сложность масштабирования производственного процесса [184–187].

Для постепенного выхода лекарств применяют полимерные наночастицы, разлагаемые и неразлагаемые *in vivo* [188]. Однако цитотоксичность полимеров после их интернализации клетками — немаловажный аспект, которому уделяют недостаточно внимания [189]. Поскольку в настоящее время крупномасштабных производств полимерных наночастиц нет, и коммерческое производство систем доставки лекарств на их основе практически не развивается. Поэтому исследователи обратили внимание на твердые липидные наночастицы (ТЛН) и наноструктурные липидные переносчики (НЛП) [190]. В матрицу ТЛН и НЛП включают биосовместимые и разлагаемые *in vivo* липиды или липидоподобные вещества, находящиеся в твердом состоянии при комнатной температуре и в физиологических условиях [191]. ТЛН на основе триглицеридов или смол способны инкапсулировать ограниченное количество лекарственного препарата, что связано с растворением лекарства в липиде, в результате которого может происходить выталкивание молекул препарата из кристаллической решетки при полиморфных переходах [192]. Описанные выше недостатки ТЛН преодолены в НЛП. Их готовят из смеси твердых и жидких липидов, масел; в результате образуется матрица с неупорядоченной структурой. За счет неупорядоченности матрица НЛП способна включать в себя отдельные молекулы лекарства или аморфные кластеры [193]. К преимуществам ТЛН и НЛП по сравнению с липосомами, микроэмульсиями и полимерными наночастицами можно отнести простоту синтеза, не требующую применения органических растворителей, долгосрочную физическую стабильность и защиту химически лабильных групп внутри частиц [190–198]. Уже созданы системы доставки лекарств на основе ТЛН для парентерального, перорального, трансдермального, внутриглазного, внутрилегочного и ректального введения [199–210].

7.6.1. Синтез липосом и липидных наночастиц

Липосомы образуются путем самопроизвольной сборки фосфолипидов в воде. Методами синтеза липосом являются экструзия [211], обращенно-фазовое упорядочивание [212] и реакции с участием детергентов [213]. Для детального ознакомления с данными методами советуем обратиться к обзору [214]. Как и при синтезе липосом, для создания тонких дисперсий липидных наночастиц был разработан ряд препаративных методов. Ниже кратко обсуждаются некоторые из них, особое внимание уделяется возможности масштабирования процесса, так как это является необходимым условием получения коммерческого продукта.

7.6.1.1. Гомогенизация под высоким давлением

Гомогенизация под высоким давлением (ГВД) — удобный метод синтеза ТЛН и НЛП, она может происходить при высокой температуре (горячая ГВД) или низкой (холодная ГВД) [215–217]. Размер частиц, получаемых данными способами, уменьшается за счет кавитации и турбулентности. При горячей ГВД липид и лекарство расплавляют при температуре примерно на 5 °С выше температуры плавления липида и соединяют с водным раствором ПАВ при той же температуре. В процессе интенсивного перемешивания образуется первичная эмульсия, которую переносят в гомогенизатор высокого давления с контролем температуры. Для получения наноэмульсии обычно достаточно трех циклов гомогенизации при давлении 500 Бар. При охлаждении до комнатной температуры наноэмульсия кристаллизуется, образуя ТЛН или НЛП. ГВД при низкой температуре подходит для включения термочувствительных или гидрофильных лекарственных препаратов. В этом процессе липид и лекарство расплавляют совместно, затем быстро измельчают в жидком азоте, в результате формируются твердые липидные наночастицы. Пресуспензия возникает при интенсивном перемешивании частиц в холодном водном растворе ПАВ. Затем ее гомогенизируют при пониженной температуре для образования ТЛН и НЛП. Обычно проводят пять циклов гомогенизации при 500 Бар. Оба метода ГВД применимы для работы при концентрации липида до 40% и позволяют получать частицы в очень узком диапазоне размеров (индекс полидисперсности < 0,2) [218–219]. Есть работы, в которых высказывается мнение о возможности масштабирования метода ГВД для производства ТЛН [220–221].

7.6.1.2. Метод микроэмульсии

При использовании этого метода сначала готовят теплую микроэмульсию, перемешивая раствор, обычно содержащий 10% расплавленного твердого липида, 15% ПАВ и 10% ко-ПАВ [220, 222]. Затем микроэмульсию диспергируют с помощью термостатируемого шприца при перемешивании в избытке холодной воды в соотношении 1 : 50. Лишнюю воду удаляют ультрафильтрацией или лиофилизацией для повышения концентрации частиц. Недостатками метода являются необходимость избавления от избытка воды из дисперсии ТЛН, высокие концентрации ПАВ и ко-ПАВ, повышающие стоимость процесса и усложняющие его масштабирование.

7.6.1.3. Высокоскоростное перемешивание и ультразвуковая обработка

Для производства ТЛН из липидных микрочастиц также используют высокоскоростное перемешивание или обработку ультразвуком [223]. Преимущество этой технологии состоит в простоте проведения процесса и доступности оборудования. Недостаток высокоскоростного перемешивания — сравнительно широкое распределение частиц по размерам, которое является причиной физической нестабильности, например увеличения размеров частиц при хранении.

Данную проблему преодолевают, используя более высокую концентрацию ПАВ, однако это может привести к повышению токсичности системы. Еще один недостаток — возможность загрязнения частиц металлом в ходе ультразвуковой обработки. Для решения перечисленных проблем высокоскоростное перемешивание и ультразвуковую обработку объединили, создав технологию, позволяющую получать физически стабильные частицы с узким распределением по размерам [224, 225].

Для приготовления ТЛН и НЛП, содержащих лекарственные препараты, используют и другие методы, например метод двойной эмульсии типа вода в масле в воде [226] и с помощью растворителя [227, 228].

7.6.2. Применение липосом для доставки лекарственных препаратов

Активное изучение липосом в качестве потенциальных систем доставки лекарственных препаратов объясняется большим разнообразием их структур и композиций [184]. Липосомы способны заключать водорастворимые лекарственные препараты во внутреннее пространство, а жирорастворимые препараты — в мембрану [180]. Высвобождение содержимого из этих частиц при контакте с клетками происходит по одному из четырех механизмов: адсорбции, эндоцитоза, липидного обмена или слияния [186]. Липосомы могут доставлять лекарства как пассивным, так и активным способом. Макрофаги ретикулоэндотелиальной системы (РЭС) быстро выводят из кровотока нативные липосомы. Это свойство в сочетании с легкостью изменения размеров липосом позволило использовать их для пассивного направленного транспорта ряда лекарственных препаратов. Была изучена способность липосом взаимодействовать с РЭС и включать в себя препараты с токсическим побочным эффектом [229]. Так, применение антибиотика амфотерицина В для лечения системных грибковых инфекций сопряжено с токсическим действием на почки [229]. Липосомальный препарат амфотерицина В, амбизом, стал первым применяться в клинической практике [230]. За счет пассивного связывания клетками печени и селезенки амбизом снижает токсическое действие на почки в обычных дозах, однако при введении высоких доз его токсическое действие вновь проявляется [231]. Амбизомом также лечат лейшманиоз — паразитарную инфекцию, затрагивающую РЭС [232]. Липосомы используются в качестве иммуноадьювантов, усилителей иммунного ответа, повышающих клеточный и гуморальный иммунитет [233]. В липосомальные вакцины можно включать цитокины [233], микроорганизмы [234], растворимые антигены [235] или ДНК [236]. В некоторых исследованиях было показано, что липосомы с помещенными в них антигенами стимулируют иммунный ответ на антиген. Еще одним преимуществом такого типа вакцин является возможность их хранения в сухом месте при пониженной температуре вплоть до одного года без потери активности [237].

Кроме того, липосомы используют в качестве носителей для доставки ДНК [238, 239]. Данные носители синтезируют из фосфолипидов с гидрофильными

головками, содержащими аминогруппы. Аминогруппы липосом взаимодействуют с фосфатными группами ДНК с образованием так называемых катионных липосом, поскольку при физиологическом значении pH их поверхность положительно заряжена. Применение катионных липосом как систем доставки генов началось в конце 1980-х гг., когда было показано, что образование комплексов между генами и липосомами способствует захвату генов клетками *in vitro* [240]. Данный тип липосом — удобный инструмент для доставки генов к определенным клеткам организма [241–244]. Несмотря на то что экспериментальные данные подтверждают способность катионных липосом облегчать доставку ДНК в клетки млекопитающих, существует множество проблем, которые следует решить для проведения успешного переноса генов. К ним относятся слишком быстрое выведение катионных липосом из организма, неспецифичность доставки, необходимость переноса генетического материала в клеточное ядро, а также обеспечение долгосрочной экспрессии генов. На клеточном уровне эти проблемы преодолевают с помощью опосредованного рецепторами связывания соответствующих лигандов, использования механизмов, позволяющих липосомам избежать выведения путем эндоцитоза, осуществления более эффективной транслокации ДНК в ядро и диссоциации липосомального комплекса перед вхождением свободной ДНК в ядро [245].

7.6.3. Применение липидных наночастиц для доставки лекарственных препаратов

Интерес к липидным наночастицам значительно вырос за последнее десятилетие. В нескольких исследованиях изучали возможность использования ТЛН в качестве носителей для контролируемой доставки лекарств и снижения побочного токсического эффекта [202, 246, 247]. Кавалли с соавторами синтезировали обычные ТЛН и ТЛН из трипальмитина, содержащие паклитаксел для создания альтернативы парентеральному препарату Палитаксел [246]. Коммерческое средство Таксол представляет собой токсичный мицеллярный препарат лекарства в полимерной матрице Stetorphor EL. Показано, что из ТЛН в среду (фосфатный буфер, pH 7,4) за 120 мин высвобождается лишь 0,1% паклитаксела. Ранее та же научная группа зафиксировала аналогичный пролонгированный профиль выведения доксорубина и идарубина *in vitro* (0,1% за 120 мин) по сравнению с активным выбросом лекарств в контрольных образцах [202]. Подобным образом выводится циклоспорин А из ТЛН на основе стеариновой кислоты. Его выход *in vitro* не превышает 4% за 2 ч по сравнению с 60% при использовании раствора препарата [247]. Клиническое применение противогрибкового средства кетоконазола ограничено из-за побочного действия на взрослых здоровых людей; он вызывает местное сильное раздражение и жжение. В целях минимизации побочных эффектов и обеспечения контролируемого высвобождения препарата другим коллективом была изучена стабильность кетоконазола в дисперсиях ТЛН и НЛП [248]. В качестве твердого липида для синтеза наночастиц выбрали Compritol 888 АТО. Для синтеза НЛП как жидкого

липидного компонента подобрали природный антиоксидант α -токоферол. Емкость ТЛН и НЛП по отношению к кетоконазолу оказалась одинакова (около 5% от массы частиц). Результаты показали, что ТЛН сохраняли физическую стабильность в суспензии не менее трех месяцев, однако матрица ТЛН не обеспечивала защиту химически лабильного кетоконазола от расщепления под действием света. Напротив, НЛП стабилизировали препарат.

Для изучения доставки активных компонентов в головной мозг с помощью систем ТЛН Янг с соавторами исследовали механизм высвобождения камптотецина из ТЛН, синтезированных из стеариновой кислоты, в мышцах [249]. Суспензию камптотецина в ТЛН вводили в хвостовую вену животных. Оказалось, что препарат с высокой эффективностью достигал головного мозга, проникая сквозь гематоэнцефалический барьер. Ван с соавторами *in vitro* анализировали профиль высвобождения 5-фтор-2'-дезоксифлуридина из ТЛН и его распределение в головном мозге [224]. Профиль высвобождения препарата состоит из двух фаз: начальный активный выброс сменялся медленным высвобождением, в то же время при использовании свободного препарата все лекарство выводилось за 2 ч. Изучение распределения 5-фтор-2'-дезоксифлуридина в составе ТЛН в головном мозге мышей показало, что его содержание в два раза превышало уровень, достигаемый при введении свободного лекарства. Возможной причиной более активного накопления препарата в составе ТЛН является повышение липофильности, что облегчает транспорт через эндотелиальные клетки ГЭБ.

Чтобы подробнее ознакомиться с применением липидных наночастиц, советуем читателю обратиться к обзорным статьям [210, 250].

7.7. Нанотрубки и фуллерены

Трубки, диаметр которых составляет от нескольких нанометров до сотен нанометров, часто называют нанотрубками. Лучше всего изучены структуры, свойства, методы синтеза и возможности применения нанотрубок из углерода. Поэтому в данном разделе основное внимание уделено именно углеродным нанотрубкам (УНТ) и их применению для доставки лекарственных препаратов; кроме того, вкратце будет рассказано о биомедицинском применении фуллеренов.

Основу структуры УНТ составляют атомы углерода, организованные в виде бензольных колец, которые формируют графитовые листы, свернутые в бесшовные цилиндры. Есть два основных типа УНТ: одностенные и многостенные. Последние образуются из нескольких концентрических слоев свернутых графитовых листов. Диаметр одностенных УНТ обычно составляет от 0,4 до 2,0 нм, диаметр многостенных — от 2 до 100 нм. Трубки обоих типов имеют длину от нескольких микрометров до нескольких миллиметров. УНТ сформированы гексагональными слоями углерода с гибридизацией sp^2 и обладают идеальной цилиндрической структурой [251].

Фуллерен похож по свойствам на УНТ и рассматривается в качестве наноматериала, состоящего из третьей аллотропной формы углерода, карбина, после графита и алмаза. Атомы углерода в фуллерене похожи на выпуклые замкнутые многогранники. Фуллерен* состоит из 60 атомов углерода, образующих 12 пятиугольников и 20 шестиугольников. По форме фуллерены напоминают футбольный мяч. Их диаметр может составлять всего 2 нм [252]. Аналогично УНТ, атомы углерода в гексагональных и пентагональных ячейках фуллеренов имеют гибридизацию sp^2 . Уникальные свойства УНТ и фуллеренов явились причиной их активного изучения в качестве потенциальных систем доставки лекарств.

7.7.1. Синтез

Чаще всего для синтеза УНТ используют один из трех методов: химическое парофазное осаждение, электрическую дугу и лазерную абляцию; ниже кратко изложена суть этих методов.

7.7.1.1. Химическое парофазное осаждение

В этом процессе газообразный углеводород пропускают через трубчатую печь. Металлический катализатор в печи нагревается горячими газами до температуры 500–1000 °С. Молекулы углеводородов диссоциируют при участии металлического катализатора, и на частицах металла происходит скапливание атомов углерода [253]. Осаждение углерода на металлических частицах приводит к образованию твердых вытянутых структур из атомов углерода с гибридизацией sp^2 . Металлический катализатор ускоряет процесс, снижает его стоимость и улучшает качество конечного продукта [254]. Очистка продукта необходима для удаления образующихся при осаждении примесей: соединений графита, аморфного углерода, угля и частиц металла. С этой целью применяют обработку кислотой, микрофильтрацию, тепловую обработку или ультразвук. Свойства УНТ, полученных химическим парофазным осаждением, зависят от температуры, концентрации углеводорода, размера частиц и предварительной обработки катализатора, а также от времени реакции [255]. Чаще всего газовая смесь состоит из метана и этана [253], катализаторами обычно служат железо или никель.

7.7.1.2. Электрическая дуга

В данном методе в инертной атмосфере гелия или аргона между двумя графитовыми электродами создается электрическая дуга [256]. Высокая температура дуги вызывает испарение углерода, приводящее к формированию нанотрубок. Для получения конечного продукта требуется очистка под действием потока кислорода или диоксида углерода [257]. Метод электрической дуги позволяет получать одностенные и многостенные УНТ [258, 259]; синтез первых обычно

* Здесь речь идет о молекуле наиболее распространенного фуллерена — C_{60} .

происходит в присутствии металлического катализатора. Важными параметрами процесса являются расстояние между электродами, сила тока, напряжение и размеры электродов [259].

7.7.1.3. Лазерная абляция

При абляции кусок графита вместе с металлическим катализатором подвергают выпариванию под действием лазерного излучения в инертной атмосфере газообразного гелия или аргона. Чаще всего катализаторами служат кобальт и никель. Под воздействием лазера в газовой среде образуются УНТ, которые затем уносятся потоком газа в охлаждающий медный коллектор [260]. Для удаления углеродных примесей требуется очистка методом пропускания через материал потоков газа при высокой температуре. Определяющими параметрами процесса являются глубина проникновения лазерного луча, его энергия, длительность импульса и длина волны. При тщательном подборе параметров можно синтезировать УНТ достаточно высокой чистоты [256]. Лазерная абляция — наиболее предпочтительный метод получения чистых УНТ [256].

Есть и другие способы создания нанотрубок, основанные, например, на использовании энергии солнца [261] или плазменного факела [262].

Фуллерены обычно получают методами лазерной абляции [263], электрической дуги [264] или ионно-лучевого напыления [265]. Как правило, требования к условиям синтеза фуллеренов менее жесткие; это относится ко времени и температуре процесса. Нагревание углеродного, точнее графитового, источника до сравнительно более низкой температуры и за более короткое время позволяет получить фуллерен в качестве основного продукта.

7.7.2. Очистка углеродных нанотрубок

Синтезированные УНТ имеют значительное количество примесей (частиц металлического катализатора и аморфного углерода), поэтому прежде чем их использовать, проводят стадию очистки. Одним из распространенных методов очистки и солюбилизации УНТ в различных растворителях является обработка сильной кислотой, позволяющая удалить примеси металла [266]. Однако в таких условиях трубки расщепляются на отдельные фрагменты, на концах которых образуются карбоксильные группы, что изменяет химические и физические свойства трубок [266]. Чтобы избежать изменения свойств УНТ, используют другие способы очистки: хроматографию, газификацию, центрифугирование, фильтрацию и химическую дериватизацию [267–270].

7.7.3. Токсичность углеродных нанотрубок

Токсичность и биосовместимость УНТ чрезвычайно важны при оценке возможности их использования для доставки лекарственных препаратов. К сожалению, исследования влияния УНТ на кератиноциты кожи человека показали,

что их присутствие вызывают воспалительную реакцию, снижение жизнеспособности клеток и их морфологические изменения [271, 272]. Кроме описанных экспериментов *in vitro* исследования *in vivo*, проведенные на морских свинках и крысах, выявили легочное воспаление и образование гранул под воздействием УНТ, не несущих никакого лекарственного препарата [273–276]. Нанотрубки, использовавшиеся в упомянутых выше исследованиях, не подвергались очистке, поэтому их токсическое действие могло быть обусловлено присутствием ионов металлов, связанных с трубками. Гарибальди с соавторами изучали воздействие очищенных УНТ на клетки сердечной мышцы крысы [277]. Результаты эксперимента не показали токсических эффектов очищенных УНТ, которые оказались биосовместимы с кардиомиоцитами. Токсичность УНТ также может быть вызвана их низкой растворимостью. Поэтому при ковалентном связывании молекул, повышающих растворимость УНТ, их токсичность значительно понижается и углеродные нанотрубки становятся вполне безопасными для использования в биологических системах [278].

7.7.4. Функциональная модификация углеродных нанотрубок

Основным недостатком углеродных нанотрубок, значительно снижающим их совместимость с биологическими объектами, является отсутствие подходящих растворителей. Для применения в системах доставки лекарств УНТ должны быть хорошо диспергированы в воде или других растворителях. Следовательно, гидрофобные поверхности УНТ необходимо модифицировать с целью повышения их растворимости. Тогда появится возможность их биомедицинского использования [252].

Один из широко применяемых подходов к функциональной модификации УНТ состоит в нековалентных взаимодействиях с нуклеиновыми кислотами, пептидами, ПАВ, полимерами и олигомерами [279–282]. Преимущества данных подходов заключается в сохранении ароматической структуры и электронных характеристик УНТ. За нековалентное связывание отвечают гидрофобные или π - π -взаимодействия. При диспергировании нанотрубок применяют анионные, катионные и неионные ПАВ [283]. Ислам с соавторами использовали додецилсульфат натрия (ДСН) и Triton X-100 для получения суспензий УНТ [283]. Результаты исследования показали, что сочетание π - π -взаимодействий ароматических остатков между ДСН и УНТ с длинными липидными цепочками ДСН повышает стабильность комплекса. Triton X-100 участвует в диспергировании путем π -стэкинга. Хотя ПАВ вполне эффективны для солюбилизации УНТ, они могут повышать проницаемость плазматической мембраны клеток, усиливая токсическое действие [266]. Следовательно, взаимодействия ПАВ с биологическими системами ограничивает биомедицинское применение комплексов УНТ с ПАВ. Напротив, солюбилизация УНТ с помощью биологических молекул гораздо лучше подходит для введения данного типа материалов в живые системы. Поэтому идет активное изучение возможностей модификации УНТ полисахаридами [279], аминокислотами [280], белками [281] и нуклеиновыми кислотами [282].

В результате этих исследований были разработаны пути повышения растворимости УНТ в воде после их функциональной модификации.

Другой подход к модификации поверхности УНТ состоит в образовании ковалентных связей с функциональными группами. Для этого используют два способа. Первый — введение гидрофильных групп с использованием кислот, и второй — проведение реакций присоединения, позволяющих повысить растворимость нанотрубок в различных растворителях [238]. Под действием сильных кислот УНТ окисляются, что уменьшает их длину и одновременно модифицирует карбоксильными группами, повышающими дисперсность в водных средах [284]. Наиболее эффективный путь функциональной модификации УНТ состоит в 1,3-диполярном циклоприсоединении азометиновых илидов. При этом УНТ вступают в реакцию присоединения при нагревании в диметилформамиде в присутствии α -аминокислоты и альдегида [285]. Есть много вариантов этой реакции, но в любом случае конечным продуктом будут функциональные УНТ с хорошей растворимостью [286]. Недостатком ковалентной модификации является ухудшение физических свойств нанотрубок из-за структурных изменений, что ограничивает возможность их применения в электронных устройствах [266]. Однако для использования УНТ в системах доставки лекарств ковалентная модификация имеет некоторое преимущество, так как позволяет вводить в нанотрубки биологически активные молекулы, необходимые для носителей, использующихся в терапевтических целях [287].

7.7.5. Биомедицинское применение углеродных нанотрубок

УНТ представляют собой наноструктуры с замечательными электрическими, механическими, термическими и оптическими свойствами [256]. Они нашли применение в химических сенсорах, материалах для полевой эмиссии, носителях для катализаторов, микро- и наноэлектронных устройствах, нанопинцетах, в анодах литиевых батареек, сверхконденсаторах, плоских дисплеях и приспособлениях для хранения водорода [288–291]. Однако в этом разделе будут рассмотрены лишь возможности биомедицинского применения УНТ в качестве носителей для лекарств и генов. Поскольку модифицированные УНТ обладают низкой токсичностью и иммуногенностью, они могут оказаться весьма полезными для использования в нанобиотехнологии и наномедицине [279]. Удельный объем внутреннего пространства УНТ достаточно велик, что позволяет заполнять трубки различными биологически активными молекулами — белками, пептидами, нуклеиновыми кислотами, и подобные системы могут быть направлены к определенным клеткам и тканям в терапевтических целях [282].

7.7.5.1. Доставка лекарств с помощью углеродных нанотрубок

Возможности использования функциональных УНТ для доставки небольших молекул лекарственных препаратов, противоопухолевых, антибактериальных или антивирусных агентов, до сих пор полностью не исследованы. Наноконтейнеры, способные доставлять одно или несколько лекарств, обладают тканевой

специфичностью и модулируют сигнал для получения изображения, имеют высокий потенциал при лечении различных заболеваний [293]. Подобное использование УНТ потребует введения на поверхность трубок различных функциональных групп. С этой целью Ву с соавторами проводили двойную функциональную модификацию нанотрубок флуоресцеином и антибиотиком амфотерицином В (АмВ), используемым для лечения хронических грибковых инфекций [293]. Двойная функциональная модификация позволила одновременно ввести в систему флуоресцентный зонд для контроля захвата УНТ, и антибиотик в качестве активной молекулы. Противогрибковую активность конъюгата АмВ–УНТ анализировали по отношению к трем видам грибов, заражающих человека. Оказалось, что связанный с УНТ амфотерицин В сохранял высокую противогрибковую активность, что указывает на возможность применения нанотрубок для доставки противогрибковых препаратов. Пасторин с коллегами изучали возможность введения флуоресцентного зонда и противоопухолевого препарата метотрексата в УНТ с аминогруппами путем ковалентного связывания [294]. Выяснилось, что УНТ проникают в цитоплазму опухолевых клеток, причем ограниченный захват метотрексата клетками стимулировался при конъюгации с УНТ. Инхуа с сотрудниками синтезировали УНТ с замещенными карборановыми ячейками для создания новых растворимых в воде систем доставки противоопухолевых средств на их основе.

7.7.5.2. Доставка нуклеиновых кислот с помощью углеродных нанотрубок

Еще одна область биомедицинского применения УНТ, которая только начинает развиваться, — создание систем доставки нуклеиновых кислот. Пантаротто с соавторами попытались использовать УНТ с целью получения новой векторной системы переноса генов [282]. За счет электростатических сил они связывали плазмидную ДНК с УНТ, имеющими функциональные аммонийные группы. Взаимодействуя с линией клеток HeLa, УНТ проникали сквозь клеточные мембраны и захватывались клетками. При этом нанотрубки обладали низкой цитотоксичностью, а связанная с ними плазмидная ДНК эффективно проникала в клетки. Уровень экспрессии генов в 10 раз превышал уровень, достигаемый при использовании свободной ДНК. Данные исследования продемонстрировали новые свойства УНТ и открыли возможность их применения для доставки нуклеиновых кислот. Другая научная группа вводила плазмиду pUC19 в клетки *Escherichia coli* с помощью диспергируемых в воде УНТ [296]. Конъюгат нанотрубок с плазмидой вызывал временное нарушение структуры клеточной мембраны, что позволяло плазмидам проникать внутрь клеток. В аналогичном исследовании Сингх с коллегами изучали физико-химические взаимодействия между УНТ, модифицированными катионными группами, и молекулами ДНК, а также эффективность переноса ДНК с помощью нанотрубок [297]. Три типа нанотрубок, а именно однослойные и многослойные нанотрубки с введенными аммонийными группами и однослойные нанотрубки с введенными остатками

лизна, за счет электростатических взаимодействий связывали с плазмидой рСМV-в-gal. Критическими параметрами для образования электростатического комплекса между функциональными УНТ и ДНК были площадь поверхности нанотрубок и поверхностная плотность заряда. Кам с сотрудниками анализировали эффективность переноса короткой интерферирующей РНК, связанной с УНТ, в клетки млекопитающих [298]. Нековалентная адсорбция молекул фосфолипидов и ПЭГ привела к образованию устойчивой водной суспензии нанотрубок. Данные УНТ взаимодействовали с РНК посредством расщепляемых дисульфидных связей. С помощью УНТ олигонуклеотиды транспортировались в клетки млекопитающих, высвобождались там и переносились в ядро, что указывает на потенциальную возможность применения подобных систем в генной терапии.

7.7.5.3. Доставка белков с помощью углеродных нанотрубок

Активные исследования ведутся также в области использования функционально модифицированных УНТ в качестве переносчиков белковых препаратов. Кам и Дай сообщали об использовании УНТ как переносчиков белков с оценкой функциональной эффективности белков *in vitro* в клетках млекопитающих [299]. К окисленным УНТ нековалентно присоединяли три белка: БСА, белок А и цитохром *c*. Переносчик оказался совместим с биологической системой, подвергался интернализации в эндосомы, а затем высвобождался в цитоплазму клеток. Биологическую функциональность и активность белка *in vitro* оценивали по программируемой клеточной смерти, индуцированной цитохромом *c* внутри клеток. В другом исследовании Кам с соавторами конъюгировали использующийся в клинической практике белок стрептавидин с модифицированными кислотой одностенными УНТ [300]. Эффективность действия системы *in vitro* оценивали по влиянию конъюгата нанотрубок с белком на человеческие опухолевые клетки и Т-клетки. Модифицированные нанотрубки были нетоксичны для клеток. Конъюгат белка с переносчиком проникал в клетки посредством эндоцитоза и приводил к дозозависимой клеточной гибели, хотя стрептавидин сам по себе не способен проникать в клетки. Данные исследования указывают на возможность использования УНТ в качестве переносчиков белков в терапевтических целях.

7.7.5.4. Доставка вакцин и пептидов с помощью углеродных нанотрубок

Основной подход к использованию УНТ для доставки вакцин состоит в связывании антигена с нанотрубками, при этом должны сохраняться конформация антигена и, следовательно, вырабатываться антитела. При этом сами нанотрубки не могут вызывать иммунный ответ. Пантаролло с соавторами использовали УНТ, модифицированные пирролидиновым кольцом с помощью 1,3-диполярного циклоприсоединения азометиновых илидов [301]. Они ковалентно связали модифицированные УНТ с пептидной последовательностью вируса ящура (FMDV), в результате были получены трубки с одной или двумя пептидными

последовательностями. Оба варианта пептидных производных УНТ вызывали сильный иммунный ответ у мышей линии BALB/c. Это означает, что конформация антигена в процессе доставки пептида сохранилась, что является обязательным условием выработки антител необходимой специфичности. Нанотрубки не вызывали иммунного ответа. Приведенные результаты подтверждают способность УНТ доставлять биологически важные антигены в нужной конформации и, следовательно, указывают на потенциальную возможность использования УНТ для доставки вакцин. Разеник с соавторами показали, что синтетические олигонуклеотиды с последовательностью цитозин–фосфодиэфир–гуанин (CpG) у модельных мышей вырабатывают иммунитет против различных вирусных, бактериальных и протозойных инфекций [302]. Однако биологическая активность данных олигонуклеотидов быстро исчезает, поэтому для полного уничтожения инфекции требуется многократное введение высоких доз препарата. Клетки слабо захватывают олигонуклеотиды из-за электростатического отталкивания отрицательных зарядов клеточной мембраны и антигена. Бианко с коллегами использовали УНТ с аммониевыми группами для доставки олигонуклеотидов, содержащих фрагмент CpG, в клетки мышей [303]. Экспериментально показано, что отрицательный заряд олигонуклеотидов нейтрализовался модифицированными нанотрубками, в результате отталкивание мембраной ослабевало и облегчалось проникновение олигонуклеотидов в клетки.

7.7.6. Биомедицинское применение фуллеренов

В последнее десятилетие стали активно изучаться химические и физические свойства фуллеренов. Благодаря уникальной структуре, фуллерены открывают новые возможности в области доставки лекарственных препаратов и генов. Внутри фуллеренов можно помещать биологически активные молекулы; в этом случае внешняя поверхность фуллеренов должна быть модифицирована таким образом, чтобы осуществлять направленный транспорт в организме [304]. Вообще фуллерены нерастворимы, однако присоединение карбоксильных групп способствует повышению растворимости [304, 305].

Сами фуллерены используются в качестве терапевтических целей. Это сильные антиоксиданты, способные нейтрализовать различные свободные радикалы, задействованные в патогенезе некоторых заболеваний, в частности в нейродегенеративных нарушениях. Свободные радикалы кислорода за счет присутствия неспаренных электронов разрушают химические связи в важных биологических молекулах, например нуклеиновых кислотах, вызывая повреждение и гибель клеток [306]. Считается, что фуллерены прерывают этот процесс, поглощая повреждающие электроны. Модификация фуллеренов остатками малоновой кислоты привела к созданию соединения с высокой активностью при нейродегенеративных заболеваниях у модельных животных [306]. Дюган с соавторами синтезировали модифицированные карбоксильными группами фуллерены, содержащие в каждой молекуле по три остатка малоновой кислоты [307]. Эти соединения оказались активными ловушками свободных радикалов.

В экспериментах с крысами Фишера *in vivo* при изучении возможности перорального и внутривенного введения растворимых в воде фуллеренов было показано, что фуллерены быстро распределяются по многим тканям. Это означает, что в принципе данные соединения могут использоваться для доставки лекарств в организме. Фоли с соавторами предложили применять фуллерены в качестве носителей для переноса лекарств, основываясь на том, что их структура напоминает клатриновые везикулы, участвующие в эндоцитозе [308]. Результаты исследования показали, что производные фуллерена проникают сквозь внешнюю клеточную мембрану и преимущественно накапливаются в митохондриях.

Фуллерены используют для ингибирования протеазы ВИЧ [309], в качестве специфического агента для связывания с костной тканью [310] и как антибактериальный препарат [311]. Так, Фридман с коллегами выяснили, что производное фуллерена с двумя аминогруппами и двумя карбоксильными группами является мощным ингибитором специфической протеазы вируса иммунодефицита человека [309]. Исследования подтвердили, что сильные гидрофобные взаимодействия между производным фуллерена и ферментом приводят к ингибированию вируса. Гонзалвес с соавторами выявили, что фуллерен с бисфосфатными группами может связываться с костными тканями [310]. Это свойство можно использовать при создании производных фуллеренов для лечения заболеваний костей. Производное фуллерена с тремя остатками малоновой кислоты растворимо в воде и обладает антибактериальной активностью по отношению к грамположительной бактерии *Staphylococci* sp. [311]. Гибель бактерий происходит из-за проникновения фуллерена в клетки и разрушения их структуры. Таким образом, экспериментально подтверждена потенциальная возможность использования карбоксифуллеренов в качестве антибактериальных препаратов.

В недавнем исследовании Изобе с коллегами показали способность тетрааминопроизводного фуллерена к связыванию плазмидной ДНК и ее введения в клетки млекопитающих [312]. Захват клетками комплекса ДНК с фуллереном происходит посредством эндоцитоза, а интернализованная ДНК защищена фуллереном от ферментативного расщепления. В похожем исследовании Ашкрофт с коллегами провели синтез и охарактеризовали растворимое в воде производное фуллерена, ковалентно связанное с антителами, распознающими антигены на опухолевых клетках человека [313]. Таким образом, сделан первый шаг в области создания систем направленной доставки противоопухолевых препаратов на основе фуллеренов. Кроме того, сообщалось о захвате опухолевыми клетками человека растворимых производных фуллерена в условиях *in vitro* [314], а также о значительном противоопухолевом эффекте и медленном высвобождении активного компонента в системе на основе конъюгата фуллерена с паклитакселом [315].

Еще одно возможное применение фуллеренов — ядерная медицина [316]. Растворимые в воде металлофуллерены могут использоваться в качестве альтернативы хелатирующим агентам для предотвращения прямого связывания токсичных ионов металла с компонентами сыворотки. Вполне вероятно, что

металлофуллерены станут реальной заменой хелатирующим агентам благодаря их устойчивости при метаболизме и высокой кинетической стабильности в организме. Металлофуллерены также обладают потенциалом при использовании в качестве контрастных агентов для магнитно-резонансной томографии [317, 318].

Приведенные выше данные указывают на возможность использования функционально модифицированных УНТ и фуллеренов для доставки биологически активных молекул в различных биомедицинских целях. Однако в настоящее время изучение возможностей применения систем данного класса в этой области не выходит за рамки лабораторных экспериментов, и для их внедрения в клиническую практику необходимы дальнейшие исследования.

7.8. Наногели

Наногели — перекрестно-сшитые полимерные частицы размером меньше микрометра, свойства которых отличаются от свойств линейных макромолекул с той же молекулярной массой. Трехмерная структура наногелей образована сетью перекрестно-сшитых молекул полимера, содержащей растворитель; она напоминает структуру золь-гелевых материалов. Сеть наногеля, которая может быть сформирована из гомополимеров или сополимеров, нерастворима из-за наличия химических перекрестных сшивок (связей) или физических перекрестных сшивок, т. е. различных переплетений или кристаллических образований [319]. Диспергированные частицы геля похожи на перекрестно-сшитые латексные частицы, набухающие в хорошем растворителе. Если хороший растворитель — вода, такие частицы относят к классу гидрогелевых частиц.

7.8.1. Синтез наногелей

Наногели с химическими перекрестными сшивками синтезируют методом эмульсионной полимеризации [320–323], а также путем образования перекрестных сшивок внутри молекул полимера или между заранее сформированными полимерными фрагментами [324, 325].

7.8.1.1. Эмульсионная полимеризация

Это наиболее распространенный способ синтеза наногелей. Он заключается в сочетании полимеризации и образовании перекрестных сшивок и обычно протекает в эмульсии. Мономер диспергируют в водной среде и стабилизируют образующуюся эмульсию с помощью ПАВ. Свободно-радикальная полимеризация мономеров приводит к образованию полимерных гелевых частиц с небольшим разбросом по размерам. Относительно недавно внимание исследователей привлек метод микроэмульсионной полимеризации в обращенной фазе, поскольку он позволяет получать неионные гидрофильные наногелевые частицы, используемые для доставки белков и ферментов в организм [326–330]. Недостатком эмульсионного метода, особенно тогда, когда синтезируют продукт

биомедицинского назначения, является наличие примесей в конечном продукте мономеров (ПАВ и сшивающих агентов), которые обладают токсичностью и должны быть удалены после завершения синтеза.

7.8.1.2. Образование перекрестных сшивок между ранее сформированными фрагментами

Другой подход к созданию наногелевых частиц состоит во введении перекрестных сшивок между отдельными структурными компонентами. Например, Харт с соавторами описали приготовление частиц наногеля посредством реакции между молекулами бензоциклобутена в бензиловом эфире [331]. Авторы другой работы изучали образование внутримолекулярных перекрестных сшивок между остатками акриловой кислоты в полифункциональных макромолекулах в процессе полимеризации в низкоконцентрированном растворе [332]. Гомополимеры и сополимеры акриламида и алкилакриламидов широко применяются для синтеза термо- и рН-чувствительных наногелей введением перекрестных сшивок с полиспиртами и полиаминами [333–335]. Кроме упомянутых выше методов существует метод синтеза полиакриловых наногелей с помощью получения полимерных углеродных радикалов короткими импульсами быстрых электронов с последующей внутримолекулярной рекомбинацией [336, 337]. Данная технология позволяет избежать использования мономеров и сшивающих агентов.

7.8.2. Наногели для доставки лекарственных препаратов

В настоящее время наногели активно изучаются из-за возможности их использования в самых разных областях. Они применяются для создания покрытий [338–340], захвата и высвобождения ионов тяжелых металлов [341, 342], изготовления оптоэлектронных переключателей [343] и в системах доставки лекарств [344, 345]. Особыми свойствами наногелей являются высокая емкость и способность обратимо реагировать на внешние сигналы: изменение температуры, рН, ионной силы, природы растворителя, а также на внешнее возмущение [346, 347]. Эти полимерные частицы сочетают свойства гелей и коллоидных систем: микрогетерогенную структуру, малый размер и высокое значение удельной площади поверхности. Наногели можно использовать для контроля высвобождения лекарственных препаратов из резервуаров или в системах, где выход препарата регулируется набуханием носителя [348, 349]. Заметим, что наногели могут быть сконструированы таким образом, чтобы обеспечивать высвобождение лекарства в определенной части организма, например при известном значении рН в ЖКТ, или доставлять препарат к клеткам-мишеням за счет связывания функциональных лигандов с клеточными рецепторами.

Наногели, чувствительные к изменению внешних условий, нашли применение во многих системах контролируемой доставки лекарств. «Умный ответ» подобных систем позволяет регулировать высвобождение препарата путем изменения температуры или рН среды. Термочувствительные наногели, чаще всего состоящие из поли-N-изопропилакриламида (ПНИПА) и его производных, претерпевают обратимый фазовый переход при изменении температуры

[350]. Это вызвано расслоением на фазы, происходящим при критическом значении температуры, которое называют нижней критической температурой растворения (НКТР). При превышении НКТР полимерные гели сжимаются или коллапсируют, а при падении температуры ниже НКТР они вновь набухают. Например, значение НКТР для гелей ПНИПА составляет 33 °С, поэтому при более высокой температуре данные гели сжимаются, а при более низкой — набухают. Шин с соавторами использовали наногели ПНИПА для термочувствительной доставки модельного лекарственного препарата индометацина [351]. В эксперименте предполагалось сжатие геля и выход лекарства при температуре выше НКТР. Результаты показали равномерное и продолжительное высвобождение препарата из геля. Равномерный профиль высвобождения может оказаться полезным, например, для доставки жаропонижающих средств до тех пор, пока биологическая система инфицирована. Следовательно, термочувствительные наногели на основе ПНИПА могут использоваться для создания систем доставки с контролируемым и продолжительным выходом препарата в ответ на изменение температуры [352, 353].

pH-чувствительные наногелевые частицы из привитых сополимеров полиметакриловой кислоты и полиэтиленгликоля (ПМАК/ПЭГ) изучали при разработке систем перорального приема белковых препаратов. Так, Лоуманн с соавторами создали наногели ПМАК/ПЭГ, содержащие инсулин, и исследовали механизм высвобождения инсулина из матрицы [356, 357]. В кислой среде, аналогичной среде желудка, гели были сжаты из-за образования межмолекулярных полимерных комплексов, защищающих инсулин от протеолитического расщепления. Однако в нейтральной и щелочной средах, которые преобладают в кишечнике, комплексы диссоциируют, гель быстро набухает, и инсулин высвобождается.

Чувствительные к присутствию глюкозы наногели были синтезированы сополимеризацией метакрилата диэтиламиноэтила и ПЭГ-монометакрилата [358, 359]. В наногель включали глюкозооксидазу, что делало его чувствительным к изменению pH. Система функционировала по следующему принципу: под действием глюкозооксидазы глюкоза превращалась в глюконовую кислоту, это снижало локальное значение pH и вызывало сжатие/набухание наногеля. Результаты исследований показали корреляцию между изменением pH и сжатием или набуханием геля. Переход от одного состояния к другому происходил при pH 7,0. Кинетика высвобождения активных компонентов из наногелей позволяет использовать их в качестве «умных» систем для помощи больным диабетом, поскольку данные устройства реагируют на повышение уровня глюкозы в крови высвобождением инсулина.

Олигонуклеотиды привлекли внимание исследователей как потенциальное средство для диагностики и лечения нейродегенеративных заболеваний: болезней Альцгеймера и Паркинсона. К сожалению, применение олигонуклеотидов ограничено из-за легкости их протеолитического расщепления и быстрого выведения через почки. Кроме того, олигонуклеотиды не могут проникать из периферической крови в мозг через ГЭБ, что является главным препятствием при

их использовании для диагностики и коррекции заболеваний ЦНС. С целью изучения возможностей применения наногелей в качестве переносчиков лекарственных препаратов в головной мозг Виноградов с соавторами синтезировали катионные наногели, состоящие из перекрестно-сшитых цепей ПЭГ и ПЭИ [358]. Комплекс наногеля с олигонуклеотидами доставлялся к эндотелиальным клеткам капилляров головного мозга быка, причем матрица наногеля защищала олигонуклеотиды от ферментативного расщепления в клетках. Биораспределение наногеля и его комплексов с олигонуклеотидами изучали *in vivo* на мышах. Исследования показали, что после внутривенного введения мышам олигонуклеотидов в наногеле большинство частиц наногеля и олигонуклеотидов накапливалось в головном мозге животных. Потенциальная возможность использования наногелей для доставки лекарств в головной мозг также была подтверждена в других экспериментах. Например, в исследовании [359] наногели синтезировали из сополимера N-изопропилакриламида и N-винилпирролидона, а модельным лекарством служил фторурацил, включенный в матрицу геля. Эксперименты *in vivo* на кроликах показали преимущественное накопление в головном мозге заполненных лекарством частиц наногеля. МакАллистер с коллегами сообщали о синтезе полиакрилатных наногелей, несущих ДНК [360]. В этой работе исследовалась возможность использования наногелей для доставки генетического материала. *In vitro* показано, что частицы наногеля способны усиливать захват ДНК клетками линии HeLa.

Также была изучена возможность включения амфифильных молекул с низкой растворимостью в наногели из перекрестно-сшитых ПЭО и ПЭИ. Модельными препаратами служили индометацин и ретиноевая кислота [361]. Были получены тонкие дисперсии частиц, устойчивые в течение недели. Кинетику высвобождения индометацина из дисперсии наногеля анализировали методом равновесного диализа. За первый час диализа в среду выделялось около 17,5% лекарства, а через 24 ч во внешней среде оказывалось 82% препарата. Следовательно, систему для доставки малорастворимых препаратов можно получить, иммобилизуя препараты в наногелях, которые синтезированы из перекрестно-сшитых ПЭО и ПЭИ, стабильных в физиологических условиях.

7.9. Вирусные векторы и вирусоподобные частицы

Вирусы — внутриклеточные облигатные паразиты, которые в ходе эволюции приобрели способность инфицировать клетки и часто обладают специфичностью по отношению к определенному их типу. Вирусы состоят из генетического материала, заключенного в защитную белковую оболочку — капсид. Они очень успешно внедряют свою ДНК в клетки организма-хозяина, где она экспрессируется для воспроизведения дочерних вирусных частиц. В процессе эволюции вирусы «разработали» стратегию, состоящую из нескольких этапов связывания и интернализации и позволяющую им с высокой эффективностью проникать в клетки [362]. Кроме того, вирусы способны управлять генетическим аппаратом клетки организма-хозяина, заставляя ее производить вирусные белки. Эти

свойства делают вирусы идеальными системами для доставки генетического материала. Однако ввиду инфекционной природы вирусов в нативном виде их нельзя использовать для доставки лекарств или генов [363].

Удобной системой для генной терапии могут служить вирусные частицы, сохраняющие способность к эффективному переносу и экспрессии генов, но лишённые патогенных свойств. На этом основано создание рекомбинантных вирусных частиц, в которых генетический материал исходных вирусов модифицирован таким образом, что данные частицы напоминают природные вирусы, но лишены способности к репликации и распространению инфекции в клетках. Для создания рекомбинантных вирусных векторов гены, необходимые для репликации вируса, заменяют чужеродными генами. В результате модифицированный вирус по-прежнему способен инфицировать клетку организма-хозяина, но не может «заставить» ее воспроизводить вирусные белки [364]. Вирусные векторы активно используются в генной терапии, поскольку они обеспечивают эффективный перенос генетической информации и длительную экспрессию [364–367]. Однако кроме проблемы патогенности вирусов, которую удалось решить, есть задача стимуляции иммунного ответа, связанная с длительной экспрессией вирусных генов. Клетки, экспрессирующие вирусные гены, быстро выводятся из организма посредством иммунной реакции [365]. Перечисленные выше факторы, а также сложность наладки крупномасштабного производства рекомбинантных вирусных векторов ограничивают применение данных систем в качестве переносчиков генов, поэтому требуется поиск альтернативных систем доставки генов.

Альтернативой вирусным частицам служат вирусоподобные частицы (ВЧ), сохраняющие высокую трансфецирующую активность вирусных частиц, но не несущие инфицирующих генов. ВЧ лишь имитируют общую структуру вирусных частиц [366]. Вирусоподобные частицы полностью лишены геномной ДНК или РНК вирусов, но их белковый капсид аналогичен вирусным частицам. Сборка ВЧ основана на том, что экспрессия белков капсида многих вирусов приводит к спонтанному образованию дочерних частиц, по структуре идентичных родительским [367]. В отличие от вирусов ВЧ состоят только из капсида и не содержат нуклеиновой кислоты.

Рекомбинантные вирусные векторы и вирусоподобные частицы могут использоваться для вакцинации и доставки генетического материала. Возможности их применения в генной и иммунной терапии обсуждаются в следующих разделах.

7.9.1. Рекомбинантные вирусные векторы

7.9.1.1. Векторы на основе аденовирусов

Аденовирусы — безоболочечные вирусы, содержащие линейную двухнитевую молекулу ДНК длиной около 35 тысяч пар нуклеотидов. Геном упакован в белковый капсид, диаметр которого составляет около 70 нм. Векторы на основе

аденовирусов достаточно просты, производство их недорого, титр высок, но инфицирующая активность также очень высока [365]. Аденовирусы эффективно переносят гены как в делящиеся, так и в неделящиеся клетки [364]. Данные векторы широко применяют для доставки генов *in vivo*; в настоящее время подобные системы для лечения онкологических больных проходят стадию клинических испытаний [368]. При создании рекомбинантного аденовируса для переноса генов важный для репликации и экспрессии вируса ген E1 удаляют, а образующиеся плазмиды внедряют в клетки организма-хозяина, например в человеческие зародышевые клетки [369]. Синтез вирусных продуктов часто стимулирует иммунный ответ в инфицированных клетках, что приводит к прекращению экспрессии через одну-две недели после инъекции. Это в значительной степени ограничивает применение описанной системы [370].

7.9.1.2. Векторы на основе ретровирусов

Ретровирусы относятся к классу оболочечных вирусов. Их геном состоит из односторонней молекулы РНК. Диаметр типичной ретровирусной частицы находится в диапазоне 90–140 нм. После инфицирования клеток организма-хозяина вирусный геном в ходе обратной транскрипции превращается в двунитовую ДНК, которая внедряется в геном клетки-хозяина и заставляет ее производить вирусные белки. Ретровирусы поражают клетки путем специфического взаимодействия между белками оболочки вируса и рецепторами на клеточной поверхности [371]. Рекомбинантные ретровирусы получают делецией генов, ответственных за репликацию вируса, и их замены новыми генами. Модифицированный вирус по-прежнему способен проникать в клетку-мишень и внедряться в ее геном [372]. Векторы на основе ретровирусов представляют особый интерес для лечения генетических заболеваний, когда требуется стабильное введение нового материала в геном организма-хозяина [369]. Системы доставки генов на основе ретровирусов, по-видимому, наиболее стабильны и в принципе позволяют добиться непрерывной экспрессии необходимых генов [370].

7.9.1.3. Векторы на основе аденоассоциированных вирусов

Аденоассоциированные вирусы (ААВ) — вирусы, реплицирующиеся только в присутствии аденовирусов. ААВ — простой непатогенный вирус, геном которого построен из односторонней ДНК и содержит два гена — *cap* и *rep*. Ген *cap* кодирует белки вирусного капсида, а продукт гена *rep* участвует в репликации вируса и его интеграции в клетки организма-хозяина [370]. ААВ не может реплицироваться самостоятельно; необходимо, чтобы клетка была одновременно инфицирована аденовирусом. В векторе на основе ААВ гены *rep* и *cap* заменяют на трансгены и встраивают полученный вектор в клетки, инфицированные аденовирусом, где образуются новые ААВ-векторы [372].

В настоящее время созданы векторы на основе других рекомбинантных вирусов: вируса коровьей оспы [373], вируса простого герпеса [374], вируса герпеса крупного рогатого скота [375] и вируса Синдбис [376].

7.9.2. Применение векторов на основе рекомбинантных вирусов

Успешное проведение генной терапии зависит от правильной интернализации генетического материала клетками и от уровня экспрессии генов в ядре клеток-мишеней. Благодаря способности связываться с клетками организма-хозяина у рекомбинантных вирусов большой потенциал для эффективного переноса генетического материала, что, в конечном итоге, определяет эффективность терапии.

Векторы на основе рекомбинантных аденовирусов достаточно широко применяются для введения в организм генов и вакцин [377–384]. В результате интратекальной инъекции нейротропного фактора из линии глиальных клеток (GDNF) в составе рекомбинантного аденовируса была получена стабильная экспрессия GDNF в спинном мозге крыс [377]. Перенос гена значительно ослабил симптомы паралича и сохранил двигательную активность крыс с ишемией спинного мозга. Таким образом, была продемонстрирована возможность переноса генов в центральную нервную систему с помощью аденовирусов. В другом исследовании проводили транспорт рекомбинантных аденовирусных частиц, содержащих ген белка IL-1Ra, выполняющий функцию антицитокина, в легкие свиньи и изучали секрецию белков в легких [378]. Аденовирусные частицы не вызывали воспалительной реакции и эффективно доставляли ген *in vivo*, что подтверждалось появлением белка, кодируемого данным геном. Полученные результаты свидетельствуют о возможности использования рекомбинантных аденовирусов для доставки генов, модулирующих активность цитокинов. Также была изучена доставка генов в слюнные железы крыс рекомбинантными аденовирусами *in vivo* [379]. Экспериментально доказано, что после инъекции вируса закодированный в векторе белок эффективно экспрессировался в слюнных железах, причем концентрация белка возрастала с увеличением количества вводимого аденовируса. Рекомбинантные аденовирусы успешно применялись для иммунной терапии и в других исследованиях на модельных животных: крысах, мышах, кроликах, свиньях, шимпанзе и собаках для борьбы с различными инфекционными заболеваниями [380–384].

Векторы на основе ретровирусов могут использоваться при проведении генной терапии и показывают хорошие результаты тогда, когда требуется непрерывная экспрессия гена [370, 385]. Нагано с сотрудниками изучали перенос гена в мышечные стволовые клетки зародышевой линии с помощью ретровирусного вектора [386]. Результаты этой работы положили начало введению новых генов непосредственно в линию зародышевых клеток многих видов животных и позволили создать метод генной терапии соматических клеток.

Рекомбинантные векторы на основе ААВ имеют ряд преимуществ при использовании в генной терапии, так как не оказывают цитотоксического действия, способны проникать в делящиеся и в неделящиеся клетки, обеспечивают длительную экспрессию чужеродного гена и могут быть получены в лабораторных условиях в виде препаратов с высоким титром [387]. В экспериментах

in vivo, демонстрирующих возможность доставки функциональных генов с помощью ААВ-векторов, были получены интересные результаты для многих типов тканей, включая сердечную мышцу взрослой мыши [387], скелетные мышцы мыши [388], соматические клетки приматов [389], печень мыши [390] и субретинальное пространство глаза крысы [391, 392].

Рекомбинантные векторы, созданные на основе вируса герпеса, также применяются для доставки генов. Преимущества данной векторной системы состоят в слабой патогенности, способности переносить большой объем чужеродного генетического материала, инфицировать разные типы клеток, взятые у различных видов животных, а также поддерживать экспрессию чужеродных генов в ходе дифференцировки [393, 394]. Стевенсон с соавторами рассматривали вирус герпеса как вектор для доставки генов в организм человека [395]. Они обнаружили, что рекомбинантный вирус, несущий ген β -галактозидазы, *in vitro* способен инфицировать различные типы человеческих клеток, что приводило к экспрессии белка. Вирус герпеса крупного рогатого скота 4 (BHV-4) также оказался эффективным инструментом для переноса генетического материала [396]. Донофрио с коллегами инфицировали рекомбинантным BHV-4 несколько клеточных линий различных животных и обнаружили, что большинство клеток не подвергались цитотоксическому действию вируса и не поддерживали его репликацию, однако экспрессия закодированного в векторе белка происходила. В нескольких исследованиях было показано успешное введение генетического материала в культивируемые нервные клетки и даже в головной мозг живых крыс [397–399].

Известно также о применении векторов на основе рекомбинантных вирусов для генной терапии нейродегенеративных нарушений [400, 401], сердечно-сосудистых заболеваний [402] и о доставке генов в плаценту при осложненной беременности [403]. На основании приведенных выше примеров можно заключить, что рекомбинантные векторы показывают хорошие результаты в области генной и иммунной терапии. Однако вряд ли найдется вектор, пригодный для решения всех задач генной терапии. Скорее можно предположить, что появится целый спектр векторов, созданных на основе вирусов различных типов, каждый из которых будет наилучшим образом отвечать требованиям конкретного метода лечения.

7.9.3. Вирусоподобные частицы

Вирусоподобные частицы получают путем введения гена, кодирующего капсидный белок соответствующего вируса, в геном бакуловируса [404] или вируса коровьей оспы [373]. Трансфекция происходит путем гомологичной рекомбинации между ДНК вируса и вектором, несущим чужеродный ген [367]. Затем полученные генно-инженерным путем вирусы помещают в биореакторы с клетками насекомых или млекопитающих. Рекомбинантный вирус инфицирует клетки хозяина и быстро реплицируется. Инфицированные клетки получают

питательную среду и кислород определенное время, за которое они могут произвести максимальное количество целевого белка [366]. Белки капсида самопроизвольно собираются в вирусоподобные частицы, напоминающие настоящие вирусы и столь же эффективные при трансфекции клеток-мишеней [367]. Лучше всего изучены вирусоподобные частицы с капсидом папилломавируса и полиомавируса. Ниже рассмотрены возможности применения ВЧ, созданных на основе данных типов вирусов.

7.9.4. Применение вирусоподобных частиц

7.9.4.1. Вирусоподобные частицы с капсидом папилломавируса

Папилломавирусы принадлежат к семейству паповавирусов. Это безоболочечные ДНК-вирусы, инфицирующие человека и животных. Капсид папилломавируса состоит из двух белков — L1 и L2. Белок L1 — главный белок капсида, который при экспрессии в эукариотических клетках способен сам образовывать вирусоподобные частицы [405]. Белки капсида разных типов папилломавируса человека экспрессируют в клетках насекомых с помощью рекомбинантных векторов на основе бакуловируса [406–408] и в клетках млекопитающих с участием векторов на основе вируса коровьей оспы [409, 410].

В нескольких исследованиях вирусные частицы с капсидом папилломавируса применяли для иммунной терапии. Белок L1 капсида папилломавируса кролика экспрессировали в клетках насекомых посредством рекомбинантного бакуловируса. При этом из капсидов самопроизвольно собирались вирусоподобные частицы [411, 412]. Иммунизация кролика данными ВЧ приводила к образованию высокого титра антител, нейтрализующих вирус. Таким образом, обеспечивалась длительная и надежная защита кроликов, зараженных папилломавирусом. В другом исследовании в клетках насекомых проводили экспрессию нативной формы основного белка капсида папилломавируса собак [413]. Было показано, что белки капсида сами собирались в вирусоподобные частицы. ВЧ вводили под кожу скоту, и у привитых животных начинали вырабатываться антитела против собачьего вируса. Успех иммунизации зависел от сохранения конформации белка. Результаты этого исследования продемонстрировали возможность создания вакцин для предотвращения инфекций, вызванных папилломами слизистых оболочек, которые могут перерождаться в злокачественные опухоли. Во многих исследованиях установлено, что различные типы вирусоподобных частиц с капсидом папилломавируса вызывают иммунный ответ В- и Т-лимфоцитов [414–416] и, следовательно, такие ВЧ можно использовать для иммунизации против различных видов папилломавируса. Представленные выше результаты свидетельствуют, что вирусоподобные частицы с капсидом папилломавируса — эффективный инструмент для иммунной терапии, позволяющей снизить риск распространения некоторых заболеваний человека, вызванных папилломавирусом.

7.9.4.2. Вирусоподобные частицы с капсидом полиомавируса

Капсид полиомавируса не покрыт внешней оболочкой, диаметр этой частицы составляет около 45 нм. Капсид состоит из трех вирусных белков, VP1, VP2 и VP3, и окружает хроматин, содержащий ДНК и гистоны. Структурные белки VP1, VP2 и VP3 находятся в разных количественных соотношениях. Внешний слой капсида составляют 72 пентамерных белка VP1. При вирусной инфекции VP1 выступает как основной лиганд некоторых мембранных рецепторов. Кроме того, VP1 с группой NH₂ на конце содержит ДНК-связывающий домен [417]. К полиомавирусам относят вирус полиомы мышей, обезьяний вирус SV40, человеческие вирусы BKV и JCV и другие вирусы животных [418].

Белки полиомавируса козы экспрессировали в клетках насекомых [419–421], *E. coli* [418, 422] и млекопитающих [423]. Образующиеся мономерные белки при повышении ионной силы немедленно собирались в капсиды [420]. Данные вирусоподобные частицы стабилизировали добавлением ионов кальция или образованием дисульфидных связей между частицами [422].

Гольдман с соавторами создали вирусоподобные частицы из основного структурного белка капсида VP1 и человеческого вируса JCV и изучали их эффективность в качестве векторов для переноса генетического материала [424]. В частицы заключали плазмиду pCMV- β -gal. Результаты исследования показали, что ВЧ успешно переносили ДНК; это подтверждалось экспрессией функциональной β -галактозидазы в клетках почек обезьяны. Хенке с коллегами продемонстрировали эффективный захват олигонуклеотидов и более крупных фрагментов ДНК мышинными фибробластами *in vitro*, а также перенос плазмидной ДНК с помощью рекомбинантного капсида на основе VP1 [418]. ВЧ с капсидом полиомавируса оказались пригодными для переноса ДНК в клетки мышей *in vitro* и *in vivo* с последующей продолжительной экспрессией генов [418]. В этом процессе ключевую роль играл механизм захвата частиц клетками. Также было показано, что для интернализации частиц клетками и экспрессии генов требуются остатки сиаловой кислоты на поверхности клеток и полноценная сеть микротрубочек, необходимых для проявления инфицирующей активности вируса. Эббинг с соавторами получили вирусоподобные частицы из полиомавируса путем самопроизвольной сборки белков VP1 вирусного капсида и включали в них флуоресцентный белок и низкомолекулярный лекарственный препарат метотрексат [425]. Вирусоподобные частицы, содержащие флуоресцентный белок и лекарство, помещали в мышинные фибробласты *in vitro*. Приведенные результаты исследований указывают на то, что вирусоподобные частицы с капсидом полиомавируса можно использовать для доставки лекарств и белков.

7.10. Нанокристаллы

В последние годы технология получения нанокристаллов из-за их способности улучшать растворимость некоторых лекарств привлекла внимание ученых, работающих как в фундаментальных, так и в прикладных областях науки. Число

синтетических лекарственных препаратов, плохо растворимых в воде, постоянно увеличивается [426]. Поэтому возникла потребность в создании систем, обеспечивающих достаточно высокую биодоступность лекарств, принимаемых перорально или вводимых внутривенно. Растворимость малорастворимых препаратов можно увеличить уменьшением размера частиц, содержащих активные и дополнительные компоненты фармацевтического средства. Увеличение растворимости и, следовательно, повышение биодоступности происходят при достижении частицами препарата нанометрового диапазона [427–429], и этот фактор может улучшить фармакокинетические свойства любого нерастворимого в воде лекарства. Важный аспект этой технологии состоит в том, что нанокристаллы лекарственных средств можно вводить в организм пероральным, парентеральным и внутривенным способами.

7.10.1. Способы получения нанокристаллов лекарственных препаратов

Существует несколько методов получения водных растворов препаратов малорастворимых в воде лекарств, например использование циклодекстринов [430] или эмульсий типа масло в воде для препаратов внутривенного введения [431]. Однако эти методы далеко не всегда пригодны, поскольку лекарства должны обладать определенными физико-химическими свойствами, а именно хорошей растворимостью в неполярных средах или соответствовать размеру циклодекстринового кольца. Данные ограничения приводят к тому, что на фармацевтическом рынке присутствует совсем немного лекарств, структурированных в нанокристаллы.

Среди новых технологий удачной оказалась технология сырого измельчения [432]. В этом процессе размер частиц лекарственного вещества постепенно снижается до определенного уровня, который определяется типом полимерного стабилизатора, необходимого для предотвращения агрегации частиц. Следовательно, при сыром измельчении критическим параметром служит стабилизирующая способность полимера. Однако возможность применения того или иного полимера определяется свойствами препарата. Поэтому технологическим недостатком является отсутствие системного подхода к выбору подходящего полимера для конкретного лекарства.

Для производства нанокристаллов лекарственных препаратов можно применить либо подход «снизу вверх» (от англ. *bottom-up*), например метод преципитации [433], либо подход «сверху вниз» (от англ. *top-down*), скажем расщепление или размельчение [434]. В классическом методе преципитации лекарство растворяют в растворителе, а затем к нему добавляют осадитель, и образуются кристаллы. Основным недостатком метода является трудность или даже невозможность контроля роста нанокристаллов, который необходимо остановить до образования микрокристаллов. Кроме того, данный метод нельзя применить к многочисленным лекарствам, не растворимым ни в водной, ни в какой-либо иной среде. К сожалению, подход «снизу вверх» редко применяется для созда-

ния нанокристаллов лекарственных препаратов. Поэтому внимание исследователей привлек второй подход к созданию нанокристаллов.

Существуют два основных метода дезинтеграции, используемых для получения нанокристаллов: измельчение в шаровой мельнице и гомогенизация под высоким давлением.

В первом случае макросуспензию лекарства помещают в контейнер с шариками из стекла, оксида циркония или специального полимера — твердого полистирола. Шарик начинает двигаться под действием мешалки, и в результате столкновений между ними препарат расщепляется до нанокристаллов. Недостатком шаровых мельниц является эрозия шариков, приводящая к загрязнению продукта [434]. Степень эрозии зависит от твердости лекарства и шариков, а также от времени измельчения, которое колеблется от нескольких часов до нескольких суток. Преодолеть этот недостаток удастся, применяя шарики из полимерных материалов, эрозия которых минимальна. В принципе, процесс измельчения в шаровой мельнице можно масштабировать, однако есть ограничения из-за их веса.

Второй часто используемый метод дезинтеграции — измельчение путем гомогенизации под высоким давлением. Применяют два типа гомогенизаторов: микрофлюидизаторы и поршневые гомогенизаторы.

Действие гомогенизаторов первого типа основано на получении микрожидкостей. Суспензию лекарства с большой скоростью пропускают через специально сконструированные камеры гомогенизатора. В первой камере, Z-типа, суспензия несколько раз меняет направление движения, что приводит к столкновениям частиц и воздействию сил сдвига. Во второй камере, Y-типа, суспензия разделяется на две части, которые затем подвергаются фронтальным столкновениям. Недостатком метода является низкая продуктивность, поскольку суспензия должна пройти через камеру много раз. Часто полученные таким образом нанокристаллы содержат много микрочастиц, особенно нанокристаллы твердых лекарств, что приводит к потере специфических свойств, которыми обладают гомогенные суспензии нанокристаллов лекарственных веществ.

Ввиду технических проблем, возникающих при измельчении препаратов в шаровой мельнице или при производстве микрожидкостей, появился альтернативный метод получения нанокристаллов лекарственных веществ в гомогенизаторах поршневого типа. Первоначально технология была основана на гомогенизации веществ в чистой воде [435]. Однако затем появилась возможность гомогенизировать частицы лекарства в неводных средах или в дисперсионных средах с уменьшенным содержанием воды, т. е. в смесях воды со смешиваемыми с водой жидкостями, например системах вода/ПЭГ или вода/глицерин [436]. Как упоминалось ранее, одним из традиционных способов получения наночастиц лекарства является преципитация. Однако применение этого метода ограничено возможным ростом нанокристаллов до микроразмеров. С целью преодоления этой проблемы разработали комбинированную технологию, в которой за преципитацией следует гомогенизация под высоким давлением. Некоторые методы производства нанокристаллов, основанные на гомогенизации, перечислены в табл. 7.1 [437].

Таблица 7.1

Некоторые методы получения нанокристаллов

Тип нанокристаллов	Название компании	Патент или поданная заявка
Гидрозоль	Novartis (панее Sandoz)	GB 2,269,536; GB 2,200,048
Nanomorph TM	Soligs/Abbott	D 19,637,517
Nanocrystal TM	Elan's Nanosystems	US 5,145,684
Dissocubes ^R	SkyePharma	US 5,145,684
Nanopure	PharmaSol	PCT/EP00/0635
Nanoedge TM	Baxter	US 6,884,436

7.10.2. Изготовление таблеток из наносуспензий малорастворимых препаратов

Чаще всего для приготовления наносуспензий малорастворимых лекарственных препаратов прибегают к гомогенизации. Сначала порошок лекарства диспергируют в водном растворе ПАВ, используя механическую мешалку с верхним приводом. Полученную грубую дисперсию гомогенизируют под давлением 500–1500 Бар, проводя несколько циклов. В результате получают суспензию частиц с нанометровыми размерами [438]. Для изготовления таблеток и капсул эту наносуспензию сразу заливают в оболочку из желатина или гидроксипропилметилцеллюлозы, затем оболочку запаивают. Наносуспензия лекарства затвердевает уже внутри капсулы. При введении водной суспензии в твердую оболочку необходимо следить за тем, чтобы нанокристаллы лекарства не образовали сверхтонкую дисперсию, что иногда происходит из-за агрегации или слияния кристаллов под давлением в ходе таблетирования.

Таким образом, технология получения нанокристаллов может оказаться весьма полезной для солюбилизации малорастворимых лекарств и для улучшения их биодоступности. Такое изменение свойств позволяет вводить данные препараты в организм с помощью различных систем доставки.

7.11. Заключение

Возможности, предоставляемые нанотехнологиями в области создания систем доставки лекарственных препаратов, позволяют надеяться на значительный прогресс медицины, который был бы невозможен при использовании устройств и технологий более крупного масштаба. Потенциальные преимущества наносистем доставки лекарств: наночастиц, нановолокон, дендримеров, липосом, нанотрубок, наногелей и вирусных векторов, способствуют активному развитию этой области исследований. Этому будет способствовать тщательное

изучение физико-химических и физиологических процессов, лежащих в основе сложных взаимодействий между переносчиком лекарственного препарата и его микроокружением.

Необходимо продолжать исследования структуры, поверхностных свойств, рабочих параметров, т. е. эффективной нагрузки и профиля высвобождения препаратов, а также биосовместимости наносистем доставки лекарств, поскольку без этого невозможно успешное и эффективное внедрение подобных технологий. Будущее наномедицины определяется рациональным дизайном наносистем доставки, основанным на глубоком понимании сути патологических процессов и взаимодействием наносистем с их биологическим окружением.

Литература

1. Mainardes R.M., Silva L.P. Drug delivery systems: past, present, and future. *Curr. Drug Targets* 2004; 5: 449–455.
2. Ratner B.D., Schoen F.J., Hoffman A.S., Lemons J.E. *Biomaterials Science*. St Louis: Elsevier Science and Technology Books; 2004. p 629–649.
3. Peppas L.B. Polymers in controlled drug delivery. *Med. Plast. Biomater.* Nov: 1997; 34–40.
4. Vogelson C.T. Advances in drug delivery systems. *Mod. Drug Discov.* 2001; 4(52): 49–50.
5. Dreher M.R., et al. Tumor vascular permeability, accumulation, and penetration of macromolecular drug carriers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2006; 36: 335–344.
6. Mansouri S., et al. Characterization of folate–chitosan–DNA nanoparticles for gene therapy. *Biomaterials* 2006; 27: 2060–2065.
7. Yang L. Development of tumor-targeted nanoparticles for *in vivo* tumor imaging and drug delivery. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2006; 2(4): 293–295.
8. Amiji M.M. Nanotechnology for targeted drug and gene delivery. *Nanomed. Nanotechnol. Biol. Med.* 2006; 2(4): 299–300.
9. Gaillard P.J., Boer A.G. A novel opportunity for targeted drug delivery to the brain. *J. Control. Release* 2006; 2(28): 60–62.
10. Silva G.A. Nanotechnology approaches for the regeneration and neuroprotection of the central nervous system. *Surg. Neurol.* 2005; 63: 301–306.
11. Lu Y., Chen S.C. Micro and nano-fabrication of biodegradable polymers for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1621–1633.
12. Van D., McGuire T., Langer R. Small scale systems for *in vivo* drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21(10): 184–1191.
13. Kim G.J., Nie S. Targeted cancer nanotherapy. *Nanotoday* August: 2005; 28–33.
14. Martin C.R., Kohli P. The emerging field of nanotube biotechnology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 29–37.
15. Xu P., et al. Highly stable core-surface-crosslinked nanoparticles as cisplatin carriers for cancer chemotherapy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2006; 48: 50–57.
16. Kneuer C, et al. Silica nanoparticles modified with aminosilanes as carriers for plasmid DNA. *Int. J. Pharm.* 2000; 196: 257–261.
17. Luo D., Han E., Belcheva N., Saltzman W.M. A self-assembled, modular DNA delivery system mediated by silica nanoparticles. *J. Control Release* 2004; 95: 333–341.

18. Sergiienko R., et al. Carbon encapsulated iron carbide nanoparticles synthesized in ethanol by an electric plasma discharge in an ultrasonic cavitation field. *Mater. Chem. Phys.* 2006; 98(1): 34–38.
19. Brust M., Walker M., Bethell D., Schiffrin D.J., Whyman R. Synthesis of thiol-derivatised gold nanoparticles in a two-phase system. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1994; 801–802.
20. Chen M., Feng Y., Wang L., Zhang L., Zhang J. Study of palladium nanoparticles prepared from water-in-oil microemulsion. *Colloids Surf. A* 2006; 281(1–3): 119–124.
21. Kayser O., Lemke A., Trejo N.H. The impact of nanobiotechnology on the development of new drug delivery systems. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2005; 6: 3–5.
22. Fishbein I., et al. Nanoparticulate delivery system of a tyrphostin for the treatment of restenosis. *J. Control Release* 2000; 65: 221–229.
23. Nishioka Y., Yoshino H. Lymphatic targeting with nanoparticulate system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 55–64.
24. Panagi Z., et al. Effect of dose on the biodistribution and pharmacokinetics of PLGA and PLGA—mPEG nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2001; 221: 143–152.
25. Calvo P., et al. Quantification and localization of PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles in brain and spinal cord during experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Eur. J. Neurosci.* 2002; 15(8): 1317–1326.
26. Zhang Y., Zhuo R. Synthesis and *in vitro* drug release behavior of amphiphilic triblock copolymer nanoparticles based on poly(ethylene glycol) and polycaprolactone. *Biomaterials* 2005; 26(33): 6736–6742.
27. Calvo P., et al. Novel hydrophilic chitosan—polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.* 1997; 63(1): 125–132.
28. Merodio M., Arnedo A., Renedo M.J., Irache J.M. Ganciclovir-loaded albumin nanoparticles: characterization and *in vitro* release properties. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001; 12(3): 251–259.
29. Zwiorek K., Kloeckner J., Wagner E., Coester C. Gelatin nanoparticles as a new and simple gene delivery system. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2004; 7(4): 22–28.
30. Zahoor A., Sharma S., Khuller G.K. Inhalable alginate nanoparticles as antitubercular drug carriers against experimental tuberculosis. *Int. J. Antimicrob. Agents* 2005; 26(4): 298–303.
31. Samalige M.S., Rohdewald P. Reconstituted collagen nanoparticles, a novel drug carrier delivery system. *J. Pharm. Pharmacol.* 1983; 35(8): 537–539.
32. Hans M.L., Lowman A.M. Biodegradable nanoparticles for drug delivery and targeting. *Curr. Opin. Solid State Mater. Sci.* 2002; 6: 319–327.
33. Couvreur P., Vauthier C. Polyalkylcyanoacrylate nanoparticles as drug carrier: present state and perspectives. *J. Control Release* 1991; 17: 187–198.
34. Jain R.A. The manufacturing techniques of various drug loaded biodegradable poly(lactide-co-glycolide) (PLGA) devices. *Biomaterials* 2000; 21: 2475–2490.
35. Coombes A.G.A. Design of nano- and microparticulate controlled release systems. Drug delivery company's report 2001/02. PharmaVentures Ltd; 2001.
36. Alonso M.J., Gupta R.K., Min C., Siber G.R., Langer R. Biodegradable microspheres as controlled-release tetanus toxoid delivery systems. *Vaccine* 1994; 12(4): 299–306.
37. Zhanga Z., Feng S. Nanoparticles of poly(lactide)/vitamin E TPGS copolymer for cancer chemotherapy: synthesis, formulation, characterization and *in vitro* drug release. *Biomaterials* 2006; 27: 262–270.

38. Niwa T., Takeuchi H., Hino T., Kunou N., Kawashima Y. Preparations of biodegradable nanospheres of water-soluble and insoluble drugs with D,L-lactide/glycolide copolymer by a novel spontaneous emulsification solvent diffusion method, and the drug release behavior. *J. Control Release* 1993; 25: 89–98.
39. Guerrero D.Q., Fessi H., Allemann E., Doelker E. Influence of stabilizing agents and preparative variables on the formation of poly(D,L-lactic acid) nanoparticles by an emulsification—diffusion technique. *Int. J. Pharm.* 1996; 143: 133–141.
40. Murakami H., Kobayashi M., Takeuchi H., Kawashima Y. Preparation of poly(DL-lactide-co-glycolide) nanoparticles by modified spontaneous emulsification solvent diffusion method. *Int. J. Pharm.* 1999; 187: 143–152.
41. Kwon G.S., et al. Block copolymer micelles as vehicles for hydrophobic drugs. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 1994; 2: 429–434.
42. Salvage J.P., et al. Novel biocompatible phosphorylcholine-based self-assembled nanoparticles for drug delivery. *J. Control Release* 2005; 104: 259–270.
43. Xu J.P., Ji J., Chen W.D., Shen J.C. Novel biomimetic polymersomes as therapeutics for drug delivery. *J. Control Release* 2005; 107(3): 502–512.
44. Fu Y.J., Shyu S.S., Su F.H., Yu P.C. Development of biodegradable co-poly(D,L-lactic/glycolic acid) microspheres for the controlled release of 5-FU by the spray drying method. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2002; 25: 269–279.
45. Leroux J.C., Allemann E., Jaeghere F.D., Doelker E., Gurny R. Biodegradable nanoparticles — from sustained release formulations to improved site specific drug delivery. *J. Control Release* 1996; 39: 339–350.
46. Allemann E., Gurny R., Doelker E. Preparation of aqueous polymeric nanodispersions by a reversible salting-out process: influence of process parameters on particle size. *Int. J. Pharm.* 1992; 87: 247–253.
47. Lukowski R., Miiller H., Miiller B.W., Dittgen M. Acrylic acid copolymer nanoparticles for drug delivery: characterization of the surface properties relevant for *in vivo* organ distribution. *Int. J. Pharm.* 1992; 84: 23–31.
48. Behan N., Birkinshaw C., Clarke N. Poly(*n*-butylcyanoacrylate) nanoparticles: a mechanistic study of polymerisation and particle formation. *Biomaterials* 2001; 22: 1335–1344.
49. Reis C.P., Neufeld R.J., Ribeiro A.J., Veiga F. Nanoencapsulation methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *Nanomed: Nanotechnol, Biol. Med.* 2006; 2: 8–21.
50. McNeil S.E. Nanotechnology for the biologist. *J. Leukoc. Biol.* 2005; 78: 1–10.
51. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Release* 2001; 70: 1–20.
52. Chawla J.S., Amiji M.M. Biodegradable poly(*o*-caprolactone) nanoparticles for tumor targeted delivery of tamoxifen. *Int. J. Pharm.* 2002; 249: 127–138.
53. Perez C., et al. Poly(lactic acid)—poly(ethylene glycol) nanoparticles as new carriers for the delivery of plasmid DNA. *J. Control Release* 2001; 75: 211–224.
54. Yoo H.S., Lee K.H., Oh J.E., Park T.G. *In vitro* and *in vivo* anti-tumor activities of nanoparticles based on doxorubicin—PLGA conjugates. *J. Control Release* 2000; 68: 419–431.
55. Miiller R.H., Jacobs C., Kayser O. Nanosuspensions as particulate drug formulations in therapy: rationale for development and what we can expect for the future. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 3–19.
56. Vila A., Sanchez A., Tobo M., Calvo P., Alonso M.J. Design of biodegradable particles for protein delivery. *J. Control Release* 2002; 78: 15–24.

57. Zhang Z., Feng S.S. The drug encapsulation efficiency, *in vitro* drug release, cellular uptake and cytotoxicity of paclitaxel-loaded poly(lactide)—tocopheryl polyethylene glycol succinate nanoparticles. *Biomaterials* 2006; 27: 4025–4033.
58. Liu M., Dong J., Yang Y., Yang X., Xu H. Characterization and release of triptolide-loaded poly (D,L-lactic acid) nanoparticles. *Eur. Polym. J.* 2005; 41: 375–382.
59. Yamazaki N., et al. Endogenous lectins as targets for drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2000; 43: 225–244.
60. Brigger I., Dubernet C., Couvreur P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 631–651.
61. Peracchia M.T., et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting. *J. Control Release* 1999; 60: 121–128.
62. Couvreur P., Gref R., Andrieux K., Malvy C. Nanotechnologies for drug delivery application to cancer and autoimmune diseases. *Prog. Solid State Chem.* 2006; 34: 231–235.
63. Kaul G., Amiji M. Biodistribution and targeting potential of polyethylene glycol-modified gelatin nanoparticles in subcutaneous murine tumor model. *J. Drug Target.* 2004; 12: 585–591.
64. Kaul G., Amiji M. Tumor targeted gene delivery using polyethylene glycol-modified gelatin nanoparticles: *in vitro* and *in vivo* studies. *Pharm. Res.* 2005; 22(6): 951–961.
65. Li Y.P., et al. Stealth polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor carriers: pharmacokinetics and anti-tumor effects. *Biol. Pharm. Bull.* 2001; 24(6): 662–665.
66. Vittaz M., et al. Effect of PEO surface density on long circulating PLA-PEO nanoparticles which are very low complement activators. *Biomaterials* 1996; 17: 1575–1581.
67. Zeng Y. and Pitt W.G. Poly(ethylene oxide)-b-poly(JV-isopropylacrylamide) nanoparticles with crosslinked cores as drug carriers. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2005; 16(3): 371–380.
68. Shenoy D., Little S., Langer R., Amiji M. Poly(ethylene oxide)-modified poly(β -amino ester) nanoparticles as a pH-sensitive system for tumor-targeted delivery of hydrophobic drugs. Part I. *In Vitro* evaluations. *Mol. Pharmacol.* 2005; 2(5): 357–366.
69. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 65–81.
70. Roney C., et al. Targeted nanoparticles for drug delivery through the blood—brain barrier for Alzheimer's disease. *J. Control Release* 2005; 108: 193–214.
71. Garcia E.G., Andrieux K., Gil S., Couvreur P. Colloidal carriers and blood—brain barrier translocation: a way to deliver drugs to the brain. *Int. J. Pharm.* 2005; 298: 274–292.
72. Olivier J.C. Drug transport to brain with targeted nanoparticles. *J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 2005; 2: 108–119.
73. Gao X., et al. Lectin-conjugated PEG—PLA nanoparticles: preparation and brain delivery after intranasal administration. *Biomaterials* 2006; 27: 3482–3490.
74. Gao K., Jiang X. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood—brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2006; 310: 213–219.
75. Michaelis K., et al. Covalent linkage of apolipoprotein e to albumin nanoparticles strongly enhances drug transport into the brain. *J. Pharm. Exp. Ther.* 2006; 317(3): 1246–1253.
76. Mishra V., et al. Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. *J. Drug Target.* 2006; 14(1): 45–53.

77. Costantino L., et al. Peptide-derivatized biodegradable nanoparticles able to cross the blood-brain barrier. *J. Control Release* 2005; 108: 84–96.
78. Lu W., et al. Cationic albumin-conjugated pegylated nanoparticles as novel drug carrier for brain delivery. *J. Control Release* 2005; 107: 428–448.
79. Krauzewicz N., et al. Virus-like gene transfer into cells mediated by polyomavirus pseudocapsids. *Gene Ther.* 2000; 7: 2122–2131.
80. Leong K.W., et al. DNA—polycation nanospheres as non-viral gene delivery vehicles. *J. Control Release* 1998; 53: 183–193.
81. Borchard G. Chitosans for gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 52: 145–150.
82. Mansouri S., et al. Chitosan—DNA nanoparticles as non-viral vectors in gene therapy: strategies to improve transfection efficacy. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004; 57: 1–8.
83. Zhao X., Yu S.B., Wu F.N., Mao Z.B., Yu C.L. Transfection of primary chondrocytes using chitosan—pEGFP nanoparticles. *J. Control. Release* 2006; 112: 223–228.
84. Lungwitz U., Breunig M., Blunk T., Gopferich A. Polyethylenimine-based non-viral gene delivery systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 60: 247–266.
85. Santos A.G., et al. Oligonucleotide—polyethylenimine complexes targeting retinal cells: structural analysis and application to anti-TGFB-2 therapy. *Pharm. Res.* 2006; 23(4): 770–781.
86. Guliyeva U., Oner F., Ozsoy S., Hazirolu R. Chitosan microparticles containing plasmid DNA as potential oral gene delivery system. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2006; 62: 17–25.
87. Silva G.A. Introduction to nanotechnology and its applications to medicine. *Surg. Neurol.* 2004; 61: 216–220.
88. Yokoyama A., et al. Biological behaviour of hat stacked carbon nanofibers in subcutaneous tissue in rats. *Nano Lett.* 2005; 5(1): 157–161.
89. Chen Z., et al. Structure of poly(ferrocenyldimethylsilane) in electrospun organometallic nanofibers. *Macromolecules* 2001; 34(18): 6164–6166.
90. Kameoka J., Verbridge S.S., Lui H. Fabrication of suspended silica glass nanofibers using a scanned electrospinning source. *Nano Lett.* 2004; 4(11): 2105–2108.
91. Zhang M., Bando Y., Wada K., Kurashima K. Synthesis of nanotubes and nanowires of silicon oxide. *J. Mater. Sci. Lett.* 1999; 18(23): 1911–1913.
92. Duncan R. The drawing era of polymer therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2003; 2: 347–360.
93. Griffith L.G. Polymeric biomaterials. *Acta Mater.* 2000; 48: 263–277.
94. Zhang Y., Lim C.T., Ramakrishna S., Huang Z.M. Recent development of polymer nanofibers for biomedical and biotechnological applications. *J. Mater. Sci-Mater. Med.* 2005; 16: 933–946.
95. Ondarcuhu T., Joachim C. Drawing a single nanofiber over hundreds of microns. *Eur. Phys. Lett.* 1998; 42: 215–220.
96. Thomson R.C., Shung A.K., Yaszemski M.J., Mikos A.G. Polymer scaffold processing. In: Vacanti J., Lanza R.P., Langer R., editors. *Principles of Tissue Engineering*. San Diego: Academic Press; 251–261.
97. Feng L., Li S.J., Song Y.L., Jiang L., Zhu D.B. Template based synthesis of aligned polyacrylonitrile nanofibers using a novel extrusion method. *Synth. Met.* 2003; 136: 817–818.
98. Martin C.R. Template synthesis of electronically conductive polymer nanostructures. *Ace. Chem. Res.* November: 1995; 28: 61–68.
99. Martin C.R. Membrane-based synthesis of nanomaterials. *Chem. Mater.* 1996; 8: 1739–1746.

100. Martin C.R., Hulteen J.C. A general template-based method for the preparation of nanomaterials. *J. Mater. Chem.* 1997; 7: 1075–1087.
101. Guler M.O., Claussen R.C., Stupp S.I. Encapsulation of pyrene within self-assembled peptide amphiphile nanofibers. *J. Mater. Chem.* 2005; 15: 4507–4512.
102. Chen P. Self-assembly of ionic-complementary peptides: a physicochemical viewpoint. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Aspects* 2005; 261: 3–24.
103. Hartgerink J.D., Beniash E., Stupp S.I. Peptide-amphiphile nanofibers: a versatile scaffold for the preparation of self-assembling materials. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99(8): 5133–5138.
104. Hartgerink J.D., Paramonov S.E., Jun H.W. Self-assembly of peptide-amphiphile nanofibers: the roles of hydrogen bonding and amphiphilic packing. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 7291–7298.
105. Niece K.L., Hartgerink J.D., Donners J.M., Stupp S.I. Self-assembly combining two bioactive peptide-amphiphile molecules into nanofibers by electrostatic attraction. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 7146–7147.
106. Ma P.X., Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 46: 60–72.
107. Frenot A., Chronakis I.S. Polymer nanofibers assembled by electrospinning. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2003; 8: 64–75.
108. Reneker D.H., Chun I. Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996; 7: 216–223.
109. Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S. Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibers. *Nanotechnology* 2005; 16: 208–213.
110. Li M., et al. Electrospun protein fibers as matrices for tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 5999–6008.
111. Smith L.A., Ma P.X. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 2004; 39: 125–131.
112. Vasita R., Katti D.S. Nanofibers and their applications in tissue engineering. *Int. J. Nanomed.* 2006; 1(1): 15–30.
113. Shorey J.D., Michelson D. On the mechanism of electrospraying. *Nucl. Instrum. Methods* 1970; 82: 295–296.
114. Xinhua Zong X., et al. Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* 2002; 43: 4403–4412.
115. Huang Z.M., Zhang Y.Z., Kotaki M., Ramakrishna S. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos. Sci. Technol.* 2003; 63: 2223–2253.
116. Kosmider K., Scott J. Polymeric nanofibers exhibit an enhanced air filtration performance. *Filtr. Sep.* 2002; 39(6): 20–22.
117. Gibson H.L., Truong Q., Walker J.D., Jones W.E. Chemical and biological protection and detection in fabrics for protective clothing. *Mater. Res. Soc.* 2003; 228(8): 123–128.
118. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng.* 2006; 12(5): 1197–1211.
119. Salvay D.M., Shea L.D. Inductive tissue engineering with protein and DNA-releasing scaffolds. *Mol. Biosyst.* 2006; 2: 36–48.
120. Kenawy E.R., et al. Release of tetracycline hydrochloride from electrospun poly(ethylene-co-vinylacetate), poly(lactic acid), and a blend. *J. Control Release* 2002; 81: 57–64.

121. Zeng J., et al. Biodegradable electrospun fibers for drug delivery. *J. Control Release* 2003; 92: 227–231.
122. Kim K., et al. Incorporation and controlled release of a hydrophilic antibiotic using poly(lactide-co-glycolide)-based electrospun nanofibrous scaffolds. *J. Control Release* 2004; 98: 47–56.
123. Cui W., et al. Investigation of drug release and matrix degradation of electrospun poly(DL-lactide) fibers with paracetamol inoculation. *Biomacromolecules* 2006; 7: 1623–1629.
124. Katti D.S., Robinson K.W., Ko F.K., Laurencin C.T. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 70(2): 286–296.
125. Verreck G., et al. Incorporation of drugs in an amorphous state into electrospun nanofibers composed of a water-insoluble, nonbiodegradable polymer. *J. Control Release* 2003; 92: 349–360.
126. Rosen H.B., Chang J., Wnek G.E., Linhardt R.J., Langer R. Bioerodible polyanhydrides for controlled drug delivery. *Biomaterials* 1983; 4: 131–133.
127. Taepaiboon P., Rungsardthong U., Supaphol P. Drug-loaded electrospun mats of poly(vinyl alcohol) fibres and their release characteristics of four model drugs. *Nanotechnology* 2006; 17: 2317–2329.
128. Huang Z.M., et al. Encapsulating drugs in biodegradable ultrafine fibers through co-axial electrospinning. *J. Biomed. Mater. Res.* 2006; 77: 169–179.
129. Sun Z., et al. Compound core—shell nanofibers by coelectrospinning. *Adv. Mater.* 2003; 15(22): 1929–1932.
130. Jiang H., et al. Preparation and characterization of ibuprofen-loaded poly(lactide-co-glycolide)/poly(ethylene glycol)-g-chitosan electrospun membranes. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2004; 15(3): 279–296.
131. Luu Y.K., Kim K., Hsiao B.S., Chu B., Hadjiargyrou M. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA–PEG block copolymers. *J. Control Release* 2003; 89: 341–353.
132. Liang D., et al. In vitro non-viral gene delivery with nanofibrous scaffolds. *Nucleic Acids Res.* 2005; 33(19): 1–8.
133. Zeng J., et al. Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings. *Biomacromolecules* 2005; 6: 1484–1488.
134. Jiang H., et al. A facile technique to prepare biodegradable coaxial electrospun nanofibers for controlled release of bioactive agents. *J. Control Release* 2005; 108: 237–243.
135. Jiang H., Fang D., Hsiao B.S., Chu B., Chen W. Optimization and characterization of dextran membranes prepared by electrospinning. *Biomacromolecules* 2004; 5: 326–333.
136. Vasita R., Katti D.S. Growth factor-delivery systems for tissue engineering: a materials perspective. *Expert Rev. Med. Devices* 2006; 1: 29–47.
137. Chew S.Y., Wen J., Yim E.F., Leong K.W. Sustained release of proteins from electrospun biodegradable fibers. *Biomacromolecules* 2005; 6: 2017–2024.
138. Beaty C.E., Saltzman M.W. Controlled growth factor delivery induces differential neurite outgrowth in three-dimensional cell cultures. *J. Control Release* 1993; 24: 15–23.
139. Elbert S.S., Hubbell J.A. Controlled release of nerve growth factor from a heparin-containing fibrin-based cell ingrowth matrix. *J. Control Release* 2000; 69: 149–158.
140. Lee A.C., et al. Controlled release of nerve growth factor enhances sciatic nerve regeneration. *Exp. Neurol.* 2003; 184: 295–303.

141. Haller M.F., Saltzman M.W. Nerve growth factor delivery systems. *J. Control Release* 1998; 53: 1–6.
142. Luginbuehl V., Meinel L., Merkle H.P., Gander B. Localized delivery of growth factors for bone repair. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2004; 58: 197–208.
143. Holland T.A., Tabata Y., Mikos A.G. Dual growth factor delivery from degradable oligo(poly(ethyleneglycol) fumarate) hydrogel scaffolds for cartilage tissue engineering. *J. Control Release* 2005; 101: 111–125.
144. Simmons C.A., Alsberg E., Hsiong S., Kim W.J., Mooney D.J. Dual growth factor delivery and controlled scaffold degradation enhance *in vivo* bone formation by transplanted bone marrow stromal cells. *Bone* 2004; 35: 562–569.
145. Wei G., Jin Q., Giannobile W.V., Ma P.X. Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant human PDGF-BB. *J. Control Release* 2006; 112: 103–110.
146. Lee J.Y., et al. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials. *J. Control Release* 2002; 78: 187–197.
147. Park Y.J., et al. Controlled release of platelet-derived growth factor-BB from chondroitin sulfate—chitosan sponge for guided bone regeneration. *J. Control Release* 2000; 67: 385–394.
148. Markkanen J.E., Rissanen T.T., Antti Kivel A., Herttua S.Y. Growth factor-induced therapeutic angiogenesis and arteriogenesis in the heart-gene therapy. *Cardiovasc. Res.* 2005; 65: 656–664.
149. Sun Q., et al. Sustained vascular endothelial growth factor delivery enhances angiogenesis and perfusion in ischemic hind limb. *Pharm. Res.* 2005; 22(7): 1110–1116.
150. Frechet J.M.J., Tomalia D. *Dendrimers and Other Dendritic Polymers*. N-Y: John Wiley and Sons, Inc.; 2001.
151. Newkome G.R., Moorefield C.N., Vogtle F. *Dendrimers and Dendrons: Concepts, Syntheses, Applications*. Wiley–VCH; 2002.
152. Tomalia D.A. Starburst dendrimers—nanoscopic supermolecules according to dendritic rules and principles. *Macromol. Symp.* 1996; 101: 243–255.
153. Hawker C.J., Frechet J.M.J. Preparation of polymers with controlled molecular architecture — a new convergent approach to dendritic macromolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 1990; 112: 7638–7647.
154. Esfand R., Tomalia D.A. Poly(amidoamine) (PAMAM) dendrimers: from biomimicry to drug delivery and biomedical applications. *Drug Discov. Today* 2001; 6: 427–436.
155. Gillies E.R., Frechet J.M.J. Dendrimers and dendritic polymers in drug delivery. *Drug Discov. Today* 2005; 10: 35–43.
156. Bosman A.W., Janssen H.M., Meijer E.W. About dendrimers: structure, physical properties and applications. *Chem. Rev.* 1999; 99: 1665–1688.
157. Liu M., Frechet J.M.J. Designing dendrimers for drug delivery. *Pharm. Sci. Technol. Today* 1999; 2(10): 393–401.
158. Duncan R. Polymer conjugates for tumour targeting and intra-cytoplasmic delivery, the EPR effect as a common gateway? *Pharm. Sci. Technol. Today* 1999; 2: 441–449.
159. Available at www.dekker.com/sdek/93432345-48443502/
160. Svenson S., Tomalia D.A. Dendrimers in biomedical applications — reflections on the field. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57: 2106–2129.
161. Dufs C., Uchegbu I.F., Shtzlein A.G. Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57: 2177–2202.
162. Klajnert B., Bryszewska M. Dendrimers: properties and applications. *Acta Biochim. Pol.* 2001; 48: 199–208.

163. Beezer A.E., et al. Dendrimers as potential drug carriers; encapsulation of acidic hydrophobes within water-soluble PAMAM derivatives. *Tetrahedron* 2003; 59: 3873–3880.
164. Patri A.K., et al. Targeted drug delivery with dendrimers: comparison of the release kinetics of covalently conjugated drug and non-covalent drug inclusion complex. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57: 2203–2214.
165. Malik N., Evagorou E.G., Duncan R. Dendrimer—platinate: a novel approach to cancer chemotherapy. *Anticancer Drugs* 1999; 10(8): 767–776.
166. Zhuo R.X., Du B., Lu Z.R. *In vitro* release of 5-fluorouracil with cyclic core dendritic polymer. *J. Control Release* 1999; 57: 249–255.
167. Marie R.G. Epidemiology of nonsteroidal anti-inflammatory drug-associated gastrointestinal injury. *Am. J. Med.* 1998; 104: 23–29.
168. Denis M.M. Comparative toxicity of nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Am. J. Med.* 1999; 107: 37–41.
169. Kolhe P., et al. Preparation, cellular transport and activity of polyamidoamine-based dendritic nanodevices with a high drug payload. *Biomaterials* 2006; 27: 660–669.
170. Kolhe P., Misra E., Kannan R.M., Kannan S., Lieh-Lai M. Drug complexation, *in vitro* release and cellular entry of dendrimers and hyperbranched polymers. *Int. J. Pharm.* 2003; 259: 143–160.
171. Yiyun C., Tongwen X. Dendrimers as potential drug carriers, Part I. Solubilization of non-steroidal anti-inflammatory drugs in the presence of polyamidoamine dendrimers. *Eur. J. Med. Chem.* 2005; 40: 1188–1192.
172. Na M., et al. Dendrimers as potential drug carriers. Part II. Prolonged delivery of ketoprofen by *in vitro* and *in vivo* studies. *Eur. J. Med. Chem.* 2006; 41: 670–674.
173. Bielinska A.U., et al. Regulation of *in vitro* gene expression using antisense oligonucleotides or antisense expression plasmids transfected using starburst PAMAM dendrimers. *Nucleic Acids Res.* 1996; 24: 2176–2182.
174. Kukowska-Latallo J.F., et al. Intravascular and endobronchial DNA delivery to murine lung tissue using a novel, nonviral vector. *Hum. Gene Ther.* 2000; 11: 1385–1395.
175. Eichman J.D., Bielinska A.U., Latallo J.K., Baker J.R. The use of PAMAM dendrimers in the efficient transfer of genetic material into cells. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2000; 3(7): 232–245.
176. Haensler J., Szoka F.C. Polyamidoamine cascade polymers mediate efficient transfection of cells in culture. *Bioconjug. Chem.* 1993; 4: 372–379.
177. Dufes C., Uchegbu I.F., Schatzlein A.G. Dendrimers in gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57: 2177–2202.
178. Dhanikula R.S., Hildgen P. Synthesis and evaluation of novel dendrimers with a hydrophilic interior as nanocarriers for drug delivery. *Bioconjug. Chem.* 2006; 17: 29–41.
179. Bhadra D., Bhadra S., Jain N.K. PEGylated peptide based dendritic nanoparticulate systems for delivery of artemether. *J. Drug Deliv. Sci. Technol.* 2005; 15: 65–73.
180. Ostro M.J., Cullis P.R. Use of liposomes as injectable-drug delivery systems. *Am. J. Hosp. Pharm.* 1989; 46: 1576–1587.
181. Available at <http://en.wikipedia.org/wiki/Liposome>.
182. Kshirsagar N.A. Drug delivery systems. *Indian J. Pharma* 2000; 32: 54–61.
183. Bangham A.D. Home R.W. Negative staining of phospholipids and their structural modification by surface-active agents as observed in the electron microscope. *J. Mol. Biol.* 1964; 8: 660–668.
184. Lasic D.D. Novel applications of liposomes. *Tibtech.* 1998; 16: 307–321.

185. Diederichs J.E., Muller R.H. Liposomen in kosmetika und arzneimitteln. *Pharm. Ind.* 1994; 56: 267–275.
186. Heath T.D. Liposome dependent drugs. In: Gregoriadis G., editor. *Liposomes as Drug Carriers: Trends and Progress*. New York: John Wiley and Sons, Inc.; 1988. 709–718.
187. Allemann E., Gurny R., Doelker E. Drug loaded nanoparticles — preparation methods and drug targeting issues. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1993; 39: 173–191.
188. Smith A., Hunneyball I.M. Evaluation of polylactide as a biodegradable drug delivery system for parenteral administration. *Int. J. Pharm.* 1986; 30: 215–230.
189. Siekmann B., Westesen K. Sub-micron sized parenteral carrier systems based on solid lipids. *Pharm. Pharmacol. Lett.* 1992; 1: 123–126.
190. Schwarz C., Mehnert W., Lucks J.S., Muller R.H. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery. I. Production, characterization and sterilization. *J. Control Release* 1994; 30: 83–96.
191. Westesen K., Siekmann B., Koch M.H.J. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *Int. J. Pharm.* 1993; 93: 189–199.
192. Cavalli R., Marengo E., Rodriguez L., Gasco M.R. Effects of some experimental factors on the production process of solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1996; 43(2): 110–115.
193. Muller R.H., et al. Solid lipid nanoparticles (SLN) as an alternative colloidal carrier system for controlled drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 1995; 41(1): 62–69.
194. Bunjes H., Westesen K., Koch M.H.J. Crystallization tendency and polymorphic transitions in triglyceride nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 1996; 129: 159–173.
195. Gasco M.R. Solid lipid nanospheres from warm microemulsions. *Pharm. Technol. Eur.* 1997; 9(II): 52–58.
196. Heiati H., Phillips N.C., Tawashi R. Evidence for phospholipids bilayer formation in solid lipid nanoparticles formulated with phospholipid and triglyceride. *Pharm. Res.* 1996; 13(9): 1406–1410.
197. Vringer T., Ronde H.G. Preparation and structure of a water-in-oil cream containing lipid nanoparticles. *J. Pharm. Sci.* 1995; 84(4): 466–472.
198. Sjostrom B., Kaplun A., Talmon Y., Cabane B. Structure of nanoparticles prepared from oil-in-water emulsions. *Pharm. Res.* 1995; 12(1): 39–48.
199. Dingier A., Blum R.P., Niehus H., Gohla S., Muller R.H. Solid lipid nanoparticles (SLN/Lipopearls): a pharmaceutical and cosmetic carrier for the application of vitamin E in dermal products. *J. Microencapsul.* 1999; 16(6): 751–767.
200. Demirel M., Yazan Y., Muller R.H., Kilic F., Bozan B. Formulation and *in vitro*—*in vivo* evaluation of piribedil solid lipid particles. *J. Microencapsul.* 2001; 18(3): 359–371.
201. Wissing S.A., Müller R.H. Solid lipid nanoparticles as carrier for sunscreens: *in vitro* release and *in vivo* skin penetration. *J. Control Release* 2002; 81: 225–233.
202. Cavalli R., Caputo O., Gasco M.R. Solid lipospheres of doxorubicin and idarubicin. *Int. J. Pharm.* 1993; 89: 9–12.
203. Morel S., Gasco M.R., Cavalli R. Incorporation in lipospheres of [D-Trp-6]LHRH. *Int. J. Pharm.* 1994; 105: 1–3.
204. Cavalli R., Morel S., Gasco M.R., Chetoni P., Saettone M.F. Preparation and evaluation *in vitro* of colloidal lipospheres containing pilocarpine as ion pair. *Int. J. Pharm.* 1995; 117: 243–246.

205. Sznitowska M., Gajewska M., Janicki S., Radwanska A., Lukowski G. Bioavailability of diazepam from aqueous-organic solution, submicron emulsion and solid lipid nanoparticles after rectal administration to rabbits. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2001; 52: 159–163.
206. Miiller R.H., Radtke M., Wissing S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 131–155.
207. Miiller R.H., Radtke M., Wissing S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.* 2002; 242: 121–128.
208. Radtke M. and Miiller R.H. Comparison of structural properties of solid lipid nanoparticles (SLN) versus other lipid particles. *Proc. Int. Symp. Control Release Bioact. Mater.* 2000; 27: 309–310.
209. Olbrich C., Gebner A., Kayser O., Miiller R.H. Lipid-drug conjugate (LDC) nanoparticles as novel carrier system for the hydrophilic antitrypanosomal drug diminazene-diacetate. *J. Drug Target* 2002; 10(5): 387–396.
210. Miiller R.K., Mader K., Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery—a review of the state of the art. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 50: 161–177.
211. Hoffman R.M., Margolis L.B., Bergelson L.D. Binding and entrapment of high molecular weight DNA by lecithin liposomes. *FEBS Lett.* 1978; 33: 365–368.
212. Ridder M., Wang Y., Hofschneider P.H. Liposomes as gene carriers: efficient transformation of mouse L cells by thymidine kinase gene. *Science* 1982; 215: 166–168.
213. Liu F., Yang J., Huang L., Liu D. Effect of non-ionic surfactants on the formation of DNA/emulsion complex and the emulsion-mediated gene transfer. *Pharm. Res.* 1997; 13: 1642–1646.
214. Watwe R.M. and Bellare J.R. Manufacture of liposomes: a review. *Curr. Sci.* 1995; 68: 715–724.
215. Cortesi R., Esposito E., Luca G., Nastruzzi C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* 2002; 23: 2283–2294.
216. Lim S.J. and Kim C.K. Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with *all-trans* retinoic acid. *Int. J. Pharm.* 2002; 243: 135–146.
217. Siekmann B., Bunjes H., Koch M.H.J., Westesen K. Preparation and structural investigations of colloidal dispersions prepared from cubic monoglyceride—water phases. *Int. J. Pharm.* 2002; 244: 33–43.
218. Lippacher A., Miiller R.H., Mader K. Preparation of semisolid drug carriers for topical application based on solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2001; 214: 9–12.
219. Lippacher A., Miiller R.H., Mader K. Semisolid SLN dispersions for topical application: influence of formulation and production parameters on microstructure. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002; 53(2): 155–160.
220. Jennings V., Lippacher A., Gohla S.H. Medium scale production of solid lipid nanoparticles (SLN) by high pressure homogenization. *J. Microencapsul.* 2002; 19(1): 1–10.
221. Dingier A. and Gohla S. Production of solid lipid nanoparticles (SLN): scaling up feasibilities. *J. Microencapsul.* 2002; 19(1): 11–16.
222. Cavalli R., Caputo O., Marengo E., Pattarino F., Gasco M.R. The effect of the components of microemulsions on both size and crystalline structure of solid lipid nanoparticles (SLN) containing a series of model molecules. *Pharmazie* 1998; 53: 392–396.
223. Eldem T., Speiser P., Hincal A. Optimization of spray-dried and congealed lipid micro-pellets and characterisation of their surface morphology by scanning electron microscopy. *Pharm. Res.* 1991; 8: 47–54.

224. Wang J.X., Sun X., Zhang Z.R. Enhanced brain targeting by synthesis of 3V,5V-di-octanoyl-5-fluoro-2V-deoxyuridine and incorporation into solid lipid nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2002; 54: 285–290.
225. Hou D.Z., Xie C.S., Huang K.J., Zhu C.H. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles. *Biomaterials* 2003; 24: 1781–1785.
226. Cortesi R., Esposito E., Luca G., Nastruzzi C. Production of lipospheres as carriers for bioactive compounds. *Biomaterials* 2002; 23: 2283–2294.
227. Shahgaldian P., Silva E.D., Coleman A.W., Rather B., Zaworotko M.J. Para-acyl-calix-arene based solid lipid nanoparticles (SLN): a detailed study of preparation and stability parameters. *Int. J. Pharm.* 2003; 253: 23–38.
228. Dubes A., et al. Scanning electron microscopy and atomic force microscopy imaging of solid lipid nanoparticles derived from amphiphilic cyclodextrins. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2003; 55: 279–282.
229. Boswell G.W., Buell D., Bekersky I. AmBisome (liposomal amphotericin B): a comparative review. *J. Clin. Pharmacol.* 1998; 38: 583–92.
230. Gray A., Morgan J. Liposomes in hematology. *Blood Rev.* 1991; 5: 258–271.
231. Longuet P., et al. Limited protection by small unilamellar liposomes against the renal tubular toxicity induced by repeated amphotericin B infusion in rats. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1991; 35: 1303–1308.
232. Davidson R.N., et al. Liposomal amphotericin B in drug-resistant leishmaniasis. *Lancet* 1991; 337: 1061–1062.
233. Gregoriadis G., Gursel I., Gursel M., McCormack B. Liposomes as immunological adjuvants and vaccine carriers. *J. Control Release* 1996; 41: 49–56.
234. Gregoriadis G. Engineering liposomes for drug delivery: progress and problems. *Biotechnology* 1995; 13: 527–537.
235. Oussoren C., Storm G. Targeting to lymph nodes by subcutaneous administration of liposomes. *Int. J. Pharm.* 1998; 162: 39–44.
236. Gregoriadis G., Saffie R., DaSouza J.B. Liposome mediated DNA vaccination. *FEBS Lett.* 1997; 402: 107–110.
237. Kim C.K., Jeong E.J. Development of dried liposome as effective immuno-adjuvant for hepatitis B surface antigen. *Int. J. Pharm.* 1995; 115: 193–199.
238. Zabner J. Cationic lipids used in gene transfer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 27: 17–28.
239. Smith J., Zhang Y.L., Niven R. Toward development of a non-viral gene therapeutic. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 26: 135–150.
240. Feigner P.L., et al. Lipofection — a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1987; 84: 7413–7417.
241. Reimer D.L., et al. Formation of novel hydrophobic complexes between cationic lipids and plasmid DNA. *Biochemistry* 2001; 44: 12877–12883.
242. Wong F.M., Reimer D.L., Bally M.B. Cationic lipid binding to DNA: characterization of complex formation. *Biochemistry* 2000; 35: 5756–5763.
243. Ferguson M.R., et al. Delivery of double-stranded DNA thioaptamers into HIV-1 infected cells for antiviral activity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 2006; 344(3): 792–797.
244. Wong J., et al. Liposome-mediated transient transfection reduces cholesterol-dependent coxsackievirus infectivity. *J. Virol. Methods* 2006; 133(2): 211–218.
245. Iwasa A., et al. Cellular uptake and subsequent intracellular trafficking of R8-liposomes. *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.* 2006; 1758(6): 713–720.
246. Cavalli R., Caputo O., Gasco M.R. Preparation and characterization of solid lipid nanospheres containing paclitaxel. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2000; 10: 305–309.

247. Ugazio E., Cavalli R., Gasco M.R. Incorporation of cyclosporine A in solid lipid nanoparticles. *Int. J. Pharm.* 2002; 241: 341–344.
248. Souto E.B., Müller R.H. SLN and NLC for topical delivery of ketoconazole. *J. Microencapsul.* 2005; 22: 501–510.
249. Yang S.C., et al. Distribution in mice of intravenously injected camptothecin solid lipid nanoparticles and targeting effect on brain. *J. Control Release* 1999; 59: 299–307.
250. Wissing S.A., Kayser O., Müller R.H. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2004; 56: 1257–1272.
251. Yamago S., et al. *In vivo* biological behavior of a water-miscible fullerene: C-14 labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity. *Chem. Biol.* 1995; 2(6): 385–389.
252. Bianco A., et al. Biomedical applications of functionalized carbon nanotubes. *Chem. Commun.* 2005; 571–577.
253. Dai H. Carbon nanotubes: opportunities and challenges. *Surf. Sci.* 2002; 500: 218–241.
254. Resasco D.E., et al. A scalable process for production of single-walled carbon nanotubes by catalytic disproportionation of CO on a solid catalyst. *J. Nanopart. Res.* 2002; 4: 131–136.
255. Qingwen L., Jin Y., Zhogfan L. Dependence of the formation of carbon nanotubes on the chemical structures of hydrocarbons. *Adv. Nanomater. Nanodevices* 2002; 59–71.
256. Journet C., Bernier P. Production of carbon nanotubes. *Appl. Phys. A* 1998; 1–9.
257. Morishita K., Takarada T. Scanning electron microscope observation of the purification behavior of carbon nanotubes. *J. Mater. Sci.* 1999; 34(6): 1169–1174.
258. Bethune D.S., et al. Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* 1993; 363: 605–607.
259. Ebbesen T.W., Ajayan P.M. Large-scale synthesis of carbon nanotubes. *Nature* 1992; 358: 220–222.
260. Chiang M., et al. Electron field emission properties of pulsed laser deposited carbon films containing carbon nanotubes. *J. Vac. Sci. Technol.* 2001; 19(3): 1034–1039.
261. Guillard T., et al. Scale up of a solar reactor for fullerene and nanotube synthesis. *J. Sol. Energy Eng.* 2002; 124: 22–27.
262. Bilodeau J.F., Alexakis T., Meuniery J.L., Tzantrizos P.G. Model of the synthesis of fullerenes by the plasma torch dissociation of C₂C₁₄. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 1997; 30: 2403–2410.
263. Kroto H.W., Heath J.R., Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E. C₆₀: buckminsterfullerene. *Nature* 1985; 318: 162–165.
264. Kratschmer W., Lamb L.D., Fostiropoulos K., Huffman D.R. Solid C₆₀: a new form of carbon. *Nature* 1990; 347: 354–357.
265. Chuanchen S., Haibin G., Dufei F. Extraction of C₆₀ cluster ion beam. *Rev. Sci. Instrum.* 1994; 65: 1405–1409.
266. Sinha N., Yeow J.W. Carbon nanotubes for biomedical applications. *IEEE Trans. Nanobiosci.* 2005; 4(2): 180–195.
267. Dyke C.A., Stewart M.P., Tour J.M. Separation of single-walled carbon nanotubes on silica gel: materials morphology and Raman excitation wavelength affect data interpretation. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 4497–4509.
268. Georgakilas V., et al. Purification of HiPCO carbon nanotubes via organic functionalization. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124: 14318–14319.
269. Zhao B., et al. Chromatographic purification and properties of soluble single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 11673–11677.

270. Niyogi S., et al. Chromatographic purification of soluble single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 733–734.
271. Shvedova A.A., Castranova V. Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J. Toxicol. Environ. Health* 2003; 66(20):T 909–1926.
272. Riviere N.A., Nemanich R.J., Inman A.O., Wang Y.Y., Riviere J.E. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 2005; 155(3): 377–384.
273. Lam C., James J.T., McCluskey R., Hunter R. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanotubes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol. Sci.* 2004; 77(1):T26–134.
274. Warheit D.B., et al. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol. Sci.* 2004; 77(1): 117–125.
275. Huczko A., Lange H., Bystrzejewski M., Baranowski. Pulmonary toxicity of 1-D nano-carbon materials. *Fullerenes Nanotubes Carbon Nanostruct.* 2005; 13(2): 141–145.
276. Muller J., et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol. App. Pharmacol.* 2005; 207(3): 221–231.
277. Garibaldi S., Brunelli C., Bavastrello V., Ghigliotti G., Nicolini C. Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells. *Nanotechnology* 2006; 17: 391–397.
278. Bianco A., et al. Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2005; 9: 674–679.
279. Star A., Steuerman D.W., Heath J.R., Stoddart J.F. Starched carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2002; 41(14): 2508–2512.
280. Zheng M., et al. DNA-assisted dispersion and separation of carbon nanotubes. *Nat. Mater.* 2003; 2: 338–342.
281. Chen R.J., Zhang Y., Wang D., Dai H. Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 3838–3839.
282. Pantarotto D., et al. Functionalized carbon nanotubes for plasmid DNA gene delivery. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004; 43: 5242–5246.
283. Islam M.F., Rojas E., Bergey D.M., Johnson A.T., Yodh A.G. High weight fraction surfactant solubilization of single-wall carbon nanotubes in water. *Nano Lett.* 2003; 3: 269–273.
284. Liu J., et al. Fullerene pipes. *Science* 1998; 280: 1253–1256.
285. Georgakilas V., et al. Organic functionalization of carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124: 760–761.
286. Georgakilas V., et al. Amino acid functionalization of water-soluble carbon nanotubes. *Chem. Commun.* 2002; 24: 3050–3051.
287. Bianco A., et al. Carbon nanotubes: on the road to deliver. *Curr. Drug Deliv. Rev.* 2005; 2: 253–259.
288. Planeix J.M., et al. Application of carbon nanotubes as supports in heterogeneous catalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 1994; 116(17): 7935–7936.
289. Saito S. Carbon nanotubes for next-generation electronics devices. *Science* 1997; 278: 77–78.
290. Kim P., Lieber C.M. Nanotube nanotweezers. *Science* 1999; 286: 2148–2150.
291. Collins P.G., Zettl A., Bando H., Thess A., Smalley R.E. Nanotube nanodevice. *Science* 1997; 278: 100–102.

292. Mitchell D.T., et al. Smart nanotubes for bioseparations and biocatalysis. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124: 11864–11865.
293. Wu W., et al. Targeted delivery of amphotericin B to cells by using functionalized carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2005; 44: 6358–6362.
294. Pastorin G., et al. Double functionalization of carbon nanotubes for multimodal drug delivery. *Chem. Commun.* 2006; 11: 1182–1184.
295. Yinghuai Z., et al. Substituted carborane-appended water-soluble single-wall carbon nanotubes: new approach to boron neutron capture therapy drug delivery. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 9875–9880.
296. Rojas-Chapana J., Troszczyńska J., Firkowska I., Morszeck C., Giersig M. Multi-walled carbon nanotubes for plasmid delivery into *Escherichia coli* cells. *Lab. Chip.* 2005; 5: 536–539.
297. Singh R., et al. Binding and condensation of plasmid DNA onto functionalized carbon nanotubes: toward the construction of nanotube-based gene delivery vectors. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 4388–4396.
298. Kam N.S., Liu Z., Dai H. Functionalization of carbon nanotubes via cleavable disulfide bonds for efficient intracellular delivery of siRNA and potent gene silencing. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 12492–12493.
299. Kam N.S., Dai H. Carbon nanotubes as intracellular protein transporters: generality and biological functionality. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 6021–6026.
300. Kam N.S., Jessop T.C., Wender P.A., Dai H. Nanotube molecular transporters: inter-nalization of carbon nanotube—protein conjugates into mammalian cells. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; 126: 6850–6851.
301. Pantarotto D., et al. Immunization with peptide-functionalized carbon nanotubes enhances virus-specific neutralizing antibody responses. *Chem. Biol.* 2003; 10: 961–966.
302. Rasenick M.M., Watanabe M., Lazarevic M.B., Hatta S., Hamm H.E. Synthetic peptides as probes for g protein function. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(34): 21519–21525.
303. Bianco A., et al. Cationic carbon nanotubes bind to CpG oligodeoxynucleotides and enhance their immunostimulatory properties. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 58–59.
304. Schergna S., et al. Enzymatic modification of fullerene derivatives. *Tetrahedron Lett.* 1998; 39(42): 7791–7794.
305. Kurz A.H., Halliwell C.M., Davis J.J., Hill A.O., Canters G.W. A fullerene-modified protein. *Chem. Commun.* 1998; 433–434.
306. Available at <http://www.csixty.com/development.html>
307. Dugan L.L., et al. Carboxyfullerenes as neuroprotective agents. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 9434–9439.
308. Foley S., et al. Cellular localisation of a water-soluble fullerene derivative. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002; 294: 116–119.
309. Friedman S.H., et al. Inhibition of the HIV-1 protease by fullerene derivatives: model building studies and experimental verification. *J. Am. Chem. Soc.* 1993, 115: 6506–6509.
310. Gonzalez A.K., Wilson L.J., Wu W., Nancollas G.H. Synthesis and *in vitro* characterization of a tissue-selective fullerene: vectoring C₆₀(OH)₁₆AMPB to mineralized bone. *Bioorg. Med. Chem.* 2002; 10: 1991–1997.
311. Tsao N., et al. *In vitro* action of carboxyfullerene. *J. Antimicrob. Chemother.* 2002; 49: 641–649.
312. Isobe H., et al. Nonviral gene delivery by tetraamino fullerene. *Mol. Pharmacol.* 2006; 3(2): 124–134.

313. Ashcroft J.M., et al. Fullerene (C₆₀) immunoconjugates: interaction of water-soluble C₆₀ derivatives with the murine anti-gp240 melanoma antibody. *Chem. Commun.* 2006; 3004–3006.
314. Rancan F., et al. Fullerene-pyropheophorbide a complexes as sensitizer for photodynamic therapy: uptake and photo-induced cytotoxicity on Jurkat cells. *J. Photochem. Photobiol. B: Biol.* 2005; 80: 1–7.
315. Zakharian T.Y., et al. A fullerene—paclitaxel chemotherapeutic: synthesis, characterization and study of biological activity in tissue culture. *J. Am. Chem. Soc.* 2005; 127: 12508–12509.
316. Cagle D.W., Kennel S.J., Mirzadeh S., Michael Alford J., Wilson L.J. *In vivo* studies of fullerene-based materials using endohedral metallofullerene radiotracers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 1999; 96: 5182–5187.
317. Bolskar R.D., et al. First soluble M@C₆₀ derivatives provide enhanced access to metallofullerenes and permit *in vivo* evaluation of Gd@C₆₀[C(COOH)₂]₁₀ as a MRI contrast agent. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 5471–5478.
318. Kato H., et al. Lanthanoid endohedral metallofullerenols for MRI contrast agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 4391–4397.
319. Lee I., Akiyoshi K. Single molecular mechanics of a cholesterol-bearing pullulan nanogel at the hydrophobic interfaces. *Biomaterials* 2004; 25: 2911–2918.
320. Candau F., Daoud M., Williams C.E. *Soft Matter Physics*. N-Y: Springer; 1995.
321. Antonietti M., Bremser W., Schmid M. Clusters and colloids: from theory to applications. *Macromolecules* 1990; 23: 3796–3805.
322. Antonietti M. Microgels — colloidal models for the cross-linked state. *Macromol. Symp.* 1995; 93: 213–225.
323. Antonietti M., Pakula T., Bremser W. Rheology of small spherical polystyrene microgels: a direct proof for a new transport mechanism in bulk polymers besides reptation. *Macromolecules* 1995; 28: 4227–4233.
324. Kuckling D., Vo C.D., Wohlrab S.E. Preparation of nanogels with temperature-responsive core and pH responsive arms by photocrosslinking. *Langmuir* 2002; 18: 4263–4269.
325. Zhou J., Li Z., Liu G. Diblock copolymer nanospheres with porous cores. *Macromolecules* 2002; 35: 3690–3696.
326. Daubresse C., Grandfils C., Jerome R., Teyssie P. Enzyme immobilization in nanoparticles produced by inverse microemulsion polymerization. *J. Colloid Interface Sci.* 1994; 168: 222–229.
327. Daubresse C., et al. Synthesis and inverse emulsion polymerization of aminated acrylamidodextran. *J. Pharm. Pharmacol.* 1993; 45: 1018–1023.
328. Gupta A.K., Madan S., Majumdar D.K., Maitra A. Ketorolac entrapped in polymeric micelles: preparation, characterisation and ocular anti-inflammatory studies. *Int. J. Pharm.* 2000; 209: 1–14.
329. Gaur U., et al. Biodistribution of fluoresceinated dextran using novel nanoparticles evading reticuloendothelial system. *Int. J. Pharm.* 2000; 202: 1–10.
330. Madan T., et al. Biodegradable nanoparticles as a sustained release system for the antigens/allergens of *Aspergillus fumigatus*: preparation and characterisation. *Int. J. Pharm.* 1997; 159: 135–147.
331. Harth E., et al. A facile approach to architecturally defined nanoparticles via intramolecular chain collapse. *J. Am. Chem. Soc.* 124: 8653–8660.
332. Mecerreyes D., et al. A novel approach to functionalized nanoparticles: self-crosslinking of macromolecules in ultradilute solution. *Adv. Mater.* 2001; 13: 204–207.

333. Gregor H.P., Samuelson E., Dalven P.I., Gregor C.D. Homopolymers and copolymers of acrylamide TV-substituted acrylamide or TV-substituted methacrylamide solid state cross-linked with polyamines or polyols. US patent 5,280,078. 1994.
334. Gan D., Lyon L.A. Tunable swelling kinetics in core—shell hydrogel nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2001; 123: 7511–7517.
335. Jones C.D., Lyon L.A. Synthesis and characterization of multiresponsive core—shell microgels. *Macromolecules* 2000; 33: 8301–8306.
336. Kadlubowski S., Grobelny J., Olejniczak W., Cichomski M., Ulanski P. Pulses of fast electrons as a tool to synthesize poly(acrylic acid) nanogels: intramolecular cross-linking of linear polymer chains in additive-free aqueous solution. *Macromolecules* 2003; 36: 2484–2492.
337. Ulanski P., Kadlubowski S., Rosiak J.M. Synthesis of poly(acrylic acid) nanogels by preparative pulse radiolysis. *Radiat. Phys. Chem.* 2002; 63: 533–537.
338. Corrigan V.G., Zawacky S.R. Cationic microgels and their use in electrodeposition. US patent 5,096,556. 1992.
339. Gajria C., Ozari Y. Water-swallowable crosslinked polymeric microgel particles and aqueous dispersions of organic film-forming resins containing the same. US patent 4,560,714. 1985.
340. Quadrat O., Snparek J. Structure and flow properties of latexes containing carboxylic groups. *Prog. Org. Coat.* 1990; 18: 207–228.
341. Biffis A. Functionalised microgels: novel stabilizers for catalytically active metal colloids. *J. Mol. Catal. A: Chem.* 2001; 165: 303–307.
342. Morris G.E., Vincent B., Snowden M.J. The interaction of nanothermosensitive, anionic microgels with metal ion solution species. *Prog. Colloid. Polym. Sci.* 1997; 105: 16–22.
343. Sawai T., Ikariyama Y., Aizawa M. Electrically modulated/flocculation of ultra fine microgels. In: *Proceedings of the International Conference on Intelligent Materials*; 1993; p. 279.
344. Peppas N.A., Bures P., Leobandung W., Ichikawa H. Hydrogels in pharmaceutical formulations. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2000; 50: 27–46.
345. Kiserab P.F., Wilson G., Needham D. Lipid-coated microgels for the triggered release of doxorubicin. *J. Control. Release* 2000; 68: 9–22.
346. Guzman L.A., et al. Local intraluminal infusion of biodegradable polymeric nanoparticles: a novel approach for prolonged drug delivery after balloon angioplasty. *Circulation* 1996; 94: 1441–1448.
347. Morimoto M., Endo T., Ohtomi M., Iwasaki Y., Akiyoshi K. Hybrid nanogels with physical and chemical cross-linking structures as nanocarriers. *Macromol. Biosci.* 2005; 5: 710–716.
348. Moshfeghi A.A., Peyman G.A. Micro- and nanoparticulates. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2005; 57: 2047–2052.
349. Winet H., Hollinger J.O., Stevanovic M. Incorporation of polylactide—polyglycolide in a cortical defect: neoangiogenesis and blood supply in a bone chamber. *J. Orthop. Res.* 1995; 13: 679–689.
350. Kuckling D., Vo C.D., Wohlrab S.E. Preparation of nanogels with temperature-responsive core and pH-responsive arms by photo-cross-linking. *Langmuir* 2002; 18: 4263–4269.
351. Shin Y., et al. Hybrid nanogels for sustainable positive thermosensitive drug release. *J. Control Release* 2001; 73: 1–6.

352. Jeong B., Kim S., Bae Y.H. Thermosensitive sol—gel reversible hydrogels. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2002; 54: 37–51.
353. Sershen S., West J. Implantable, polymeric systems for modulated drug delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003; 55: 439–446.
354. Lowman A.M., Takayama K., Nagai T., Peppas N.A. Elucidation of the mechanism of incorporation of insulin in controlled release systems based on complexation polymers. *J. Control Release* 2002; 81: 25–32.
355. Lowman A.M., Morishita M., Kajita M., Nagai T., Peppas N.A. Oral delivery of insulin using pH-responsive complexation gels. *J. Pharm. Sci.* 2003; 88(9): 933–937.
356. Podual K., Doyle F.J., Peppas N.A. Dynamic behavior of glucose oxidase-containing microparticles of poly(ethylene glycol)-grafted cationic hydrogels in an environment of changing pH. *Biomaterials* 2000; 21: 1439–1450.
357. Podual K., Doyle F.J., Peppas N.A. Preparation and dynamic response of cationic copolymer hydrogels containing glucose oxidase. *Polymer* 2000; 41: 3975–3983.
358. Vinogradov S.V., Batrakova E.V., Kabanov A.V. Nanogels for oligonucleotide delivery to the brain. *Bioconjug. Chem.* 2004; 15: 50–60.
359. Soni S., Babbar A.K., Sharma A.K., Maitra M. Delivery of hydrophobised 5-fluorouracil derivative to brain tissue through intravenous route using surface modified nanogels. *J. Drug Target.* 2006; 14(2): 87–95.
360. McAllister K., et al. Polymeric nanogels produced via inverse microemulsion polymerization as potential gene and antisense delivery agents. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124: 15198–15207.
361. Bronich T.K., Vinogradov S.V., Kabanov A.V. Interaction of nanosized copolymer networks with oppositely charged amphiphilic molecules. *Nano Lett.* 2001; 1: 535–540.
362. Zuber G., Dauty E., Nothisen M., Belguise P., Behr J.P. Towards synthetic viruses. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 52: 245–253.
363. Knowles M.R., et al. Adenoviral-vector-mediated gene transfer for cystic fibrosis. *N Eng. J. Med.* 1995; 333(13): 823–831.
364. Lai C.M., et al. Controlled production of active cathepsin D in retinal pigment epithelial cells following adenovirus-mediated gene delivery. *Mol. Ther.* 2000; 2(5): 476–484.
365. Lazennec G., Katzenellenbogen B.S. Expression of human estrogen receptor using an efficient adenoviral gene delivery system is able to restore hormone-dependent features to estrogen receptor-negative breast carcinoma cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* 1999; 149: 93–105.
366. Noad R., Roy P. Virus-like particles as immunogens. *Trends Microbiol.* 2003; 11(9): 438–444.
367. Garcea R.L., Gasman L. Virus-like particles as vaccines and vessels for the delivery of small molecules. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2004; 15: 513–517.
368. Grinshtein N. Recombinant adenovirus vaccines can successfully elicit CD8 + T cell immunity under conditions of extreme leukopenia. *Mol. Ther.* 2006; 13(2): 270–279.
369. Graham F.L., Prevec L. Methods for construction of adenovirus vectors. *Mol. Biotechnol.* 1995; 3: 207–220.
370. Robbins P.D., Ghivizzani S.C. Viral vectors for gene therapy. *Pharmacol. Ther.* 1998; 80(1): 35–47.
371. Kamiya H., Tsuchiya H., Yamazaki J., Harashima H. Intracellular trafficking and transgene expression of viral and non-viral gene vectors. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 52: 153–164.

372. Verma I.M., Somia N. Gene therapy: promises, problems and prospects. *Nature* 1997; 398(18): 239–242.
373. Hruby D.E. Vaccinia virus vectors: new strategies for producing recombinant vaccines. *Clin. Microbiol. Rev.* 1990; 3(2): 153–170.
374. Sandler V.M., et al. Modified herpes simplex virus delivery of enhanced GFP into the central nervous system. *J. Neurosci. Methods* 2002; 121: 211–219.
375. Donofrio G., Martignani E., Cavarani S., Flammini C.F. Exploiting persistent infection for selection of bovine herpesvirus 4 recombinants. *J. Virol. Methods* 2005; 125: 6–13.
376. Ketola A., Schlesinger S., Wahlfors J. Properties of Sindbis virus vectors produced with a chimeric split helper system. *Int. J. Mol. Med.* 2005; 15(6): 999–1003.
377. Chou A.K., et al. Intrathecal gene delivery of glial cell line-derived neurotrophic factor ameliorated paraplegia in rats after spinal ischemia. *Mol. Brain Res.* 2005; 133: 198–207.
378. Morrison D.F., Murtaugh M.P. Adenovirus-mediated expression of interleukin-1 receptor antagonist in swine cells *in vitro* and *in vivo*. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2001; 78: 71–81.
379. Wang C., Chao C., Chao L., Chao J. Expression of human tissue kallikrein in rat salivary glands and its secretion into circulation following adenovirus-mediated gene transfer. *Immunopharmacology* 1997; 36: 221–227.
380. Mason B.B., et al. Adenovirus vaccine vectors expressing hepatitis B surface antigen: importance of regulatory elements in the adenovirus major late intron. *Virology* 1990; 177: 452–461.
381. Lubeck M.D., et al. Immunogenicity and efficacy testing in chimpanzees of an oral hepatitis B vaccine based on live recombinant adenovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1989; 86: 6763–6767.
382. Xiang Z.Q., Yiping Y., Wilson J.M., Ertl H.J. A replication-defective human adenovirus recombinant serves as a highly efficacious vaccine carrier. *Virology* 1996; 219: 220–227.
383. Wesley R.D., Tang M., Lager K.M. Protection of weaned pigs by vaccination with human adenovirus 5 recombinant viruses expressing the hemagglutinin and the nucleoprotein of H3N2 swine influenza virus. *Vaccine* 2004; 22: 3427–3434.
384. Imler J.L. Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* 1995; 13(13): 1143–1151.
385. McTaggart S., Rubeai M.L. Retroviral vectors for human gene delivery. *Biotechnol. Adv.* 2002; 20: 1–31.
386. Nagano M., Shinohara T., Avarbock M.R., Brinster R.L. Retrovirus-mediated gene delivery into male germ line stem cells. *FEBS Lett.* 2000; 475: 7–10.
387. Du L., et al. Differential myocardial gene delivery by recombinant serotype-specific adeno-associated viral vectors. *Mol. Ther.* 2004; 10(3): 604–608.
388. Rivera V.M., et al. Long-term regulated expression of growth hormone in mice after intramuscular gene transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1999; 96: 8657–8662.
389. Ye X., et al. Regulated delivery of therapeutic proteins after *in vivo* somatic cell gene transfer. *Science* 1999; 283: 88–91.
390. Auricchio A., et al. Constitutive and regulated expression of processed insulin following *in vivo* hepatic gene transfer. *Gene Ther.* 2002; 9: 963–971.
391. Auricchio A., et al. Pharmacological regulation of protein expression from adeno-associated viral vectors in the eye. *Mol. Ther.* 2002; 6(2): 238–242.
392. During M.J. Adeno-associated virus as a gene delivery system. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 27: 83–94.

393. Desrosiers R.C., et al. Synthesis of bovine growth hormone in primates by using a herpesvirus vector. *Mol. Cell. Biol.* 1985; 5: 2796–2803.
394. Simmer B., et al. Persistence of selectable herpesvirus saimiri in various human haematopoietic and epithelial cell lines. *J. Gen. Virol.* 1991; 72: 1953–1958.
395. Stevenson A.J., et al. Assessment of herpesvirus saimiri as a potential human gene therapy vector. *J. Med. Virol.* 1999; 57: 269–277.
396. Donofrio G., Cavarani S., Simone T., Van Santen V.L. Potential of bovine herpesvirus 4 as a gene delivery vector. *J. Virol. Methods* 2002; 101: 49–61.
397. Krisky D.M., et al. Deletion of multiple immediate-early genes from herpes simplex virus reduces cytotoxicity and permits long-term gene expression in neurons. *Gene Ther.* 1998; 5(12): 1593–1603.
398. Lilley C.E., et al. Multiple immediate-early gene-deficient herpes simplex virus vectors allowing efficient gene delivery to neurons in culture and widespread gene delivery to the central nervous system *in vivo*. *J. Virol.* 2001; 4343–4356.
399. Costantini C., et al. Gene transfer to the nigrostriatal system by hybrid herpes simplex virus/adeno-associated virus amplicon vectors. *Hum. Gene Ther.* 1999; 10(15): 2481–2494.
400. Emborg M.E., Deglon N., Leventhal L., Aebischer P., Kordower J.H. Viral vector-mediated gene therapy for Parkinson's disease. *Clin. Neurosci. Res.* 2001; 1: 496–506.
401. Lesch K.P. Gene transfer to the brain: emerging therapeutic strategy in psychiatry. *Soc. Biol. Psychiatry* 1999; 45: 247–253.
402. Feldman L.J., Steg G. Optimal techniques for arterial gene transfer. *Cardiovasc. Res.* 1997; 35: 391–404.
403. Parry S., Koi H., Strauss J.F. Transplacental drug delivery: gene and virus delivery to the trophoblast. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1999; 38: 69–80.
404. Ou W.C., et al. The major capsid protein, VP1, of human JC virus expressed in *Escherichia coli* is able to self-assemble into a capsid-like particle and deliver exogenous DNA into human kidney cells. *J. Gen. Virol.* 1999; 80: 39–46.
405. Touze A., Coursaget P. *In vitro* gene transfer using human papillomavirus-like particles. *Nucleic Acids Res.* 1998; 26(5): 1317–1323.
406. Kimbauer R., Booy G., Cheng N., Lowy D.R., Schiller J.T. Papillomavirus LI major capsid protein self-assembles into virus-like particles that are highly immunogenic. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 12180–12184.
407. Rose R.C., Bonnez R., Reichman C., Garcea R.L. Expression of human papillomavirus type 11 LI protein in insect cells: *in vivo* and *in vitro* assembly of viruslike particles. *J. Virol.* 1993; 67: 1936–1944.
408. Volpers C.P., Schirmacher R.E., Sapp M. Assembly of the major and the minor capsid protein of human papillomavirus type 33 into virus-like particles and tubular structures in insect cells. *Virology* 1994; 200: 504–512.
409. Zhou J., Stenzel D.J., Sun X.Y., Frazer I.H. Synthesis and assembly of infectious bovine papillomavirus particles *in vitro*. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 763–768.
410. Hagensee M.E., Yaegashi N., Galloway D.A. Self-assembly of human papillomavirus type 1 capsids by expression of the LI protein alone or by coexpression of the LI and L2 capsid proteins. *J. Virol.* 1993; 67: 315–322.
411. Breitbart F., et al. Immunization with viruslike particles from cottontail rabbit papillomavirus (CRPV) can protect against experimental CRPV infection. *J. Virol.* 1995; 69(6): 3959–3963.

412. Christenson N.D., Reed C.A., Cladel N.M., Han R., Kreider J.W. Immunization with viruslike particles induces long-term protection of rabbits against challenge with cottontail rabbit papillomavirus. *J. Virol.* 1996; 70(2): 960–965.
413. Suzich J.A., et al. Systemic immunization with papillomavirus LI protein prevents the development of viral mucosal papillomas completely. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1995; 92: 11553–11557.
414. Balmelli C., Demotz S., Orbea H.A., Grandi P.D., Haefliger D.N. Trachea, lung and tracheobronchial lymph nodes are the major sites where antigen-presenting cells are detected after nasal vaccination of mice with human papillomavirus Type 16 virus-like particles. *J. Virol.* 2002; 76(24): 12596–12602.
415. Silva D.D., et al. Physical interaction of human papillomavirus virus-like particles with immune cells. *Int. Immunol.* 2001; 13(5): 633–641.
416. Nicholls P.K., Stanley M.A. The immunology of animal papillomaviruses. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 2000; 73: 101–127.
417. Forstova J., et al. Cooperation of structural proteins during late events in the life cycle of polyomavirus. *J. Virol.* 1993; 67(3): 1405–1413.
418. Henke S., Rohmann A., Bertling W.M., Dingermann T., Zimmer A. Enhanced *in vitro* oligonucleotide and plasmid DNA transport by VP1 virus-like particles. *Pharm. Res.* 2000; 17(9): 1062–1070.
419. Chang D., et al. Self-assembly of the JC virus major capsid protein, VP1, expressed in insect cells. *J. Gen. Virol.* 1997; 78: 1435–1439.
420. Pawlita M., Muller M., Oppenlinder M., Zentgraf H., Herrmann M. DNA encapsidation by viruslike particles assembled in insect cells from the major capsid protein VP1 of B-lymphotropic papovavirus. *J. Virol.* 1996; 70(11): 7517–7526.
421. Sandalon Z., Oppenheim A. Self-assembly and protein—protein interactions between the SV40 capsid proteins produced in insect cells. *Virology* 1997; 237: 414–421.
422. Rodgers R.D., Chang D., Cai X., Consigli R.A. Purification of recombinant budgerigar fledgling disease virus VP1 capsid protein and its ability for *in vitro* capsid assembly. *J. Virol.* 1994; 68(5): 3386–3390.
423. Schmidt U., Gunther C., Rudolph R., Bohm G. Protein and peptide delivery via engineered polyomavirus-like particles. *FASEB J.* 2001; 15: 1646–1648.
424. Goldmann C., et al. Molecular cloning and expression of major structural protein VP1 of the human polyomavirus JC virus: formation of virus-like particles useful for immunological and therapeutic studies. *J. Virol.* 1999; 73(5): 4465–4469.
425. Abbing A., et al. Efficient intracellular delivery of a protein and a low molecular weight substance via recombinant polyomavirus-like particles. *J. Biol. Chem.* 2004; 279(26): 27410–27421.
426. Merisko E. Liversidge nanocrystals: resolving pharmaceutical formulation issues associated with poorly water-soluble compounds. In: Marty J.J., editor. *Particles*. Orlando: Marcel Dekker; 2002.
427. Lee J. Drug nano- and microparticles processed into solid dosage forms: physical properties. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92: 2057–2068.
428. Lee J. Intrinsic adhesion force of lubricants to steel surface. *J. Pharm. Sci.* 2004; 93: 2310–2318.
429. Liu R. *Water-Insoluble Drug Formation*. Buffalo, IL: Inter-Pharm Press; 2000. p. 455.
430. Fromming K.S., Fromming J. *Cyclodextrines in Pharmacy*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers; 1993.

431. Müller R.H. Dispersions for the formulation of slightly or poorly soluble drugs. PCT/EP01/08726, Pharmasol GmbH Berlin; 2001.
432. Choi J.Y., Yoo J.Y., Kwak H.S., Nam B.U., Lee J. Role of polymeric stabilizers for drug nanocrystal dispersions. *Curr. Appl. Phys.* 2005; 5: 472–474.
433. Sucker H., Gassmann P. Improvements in pharmaceutical compositions. GB patent 2,269,536. Sandozy Ltd; 1994.
434. Buchmann S., Fischli W., Thiel F.P., Alex R. Aqueous microsuspension, an alternative intravenous formulation for animal studies. In: 42-nd Annual Congress of the International Association for Pharmaceutical Technology; Mainz; 1996. p. 124.
435. Müller R.H., Becker R., Kruss B., Peters K. Pharmaceutical nanosuspensions for medicament administration as systems with increased saturation solubility and rate of solution. US patent 5,858,410. 1999.
436. Müller R.H., Mader K., Krause K. Verfahren zur schonenden Herstellung von hochfeinen Micro-/Nanopartikeln. PCT application PCT/EPO0/06535. Germany; 2000.
437. Rabinow B.E. Nanosuspensions in drug delivery. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; 3: 785–796.
438. Müller R.H., Peters K. Nanosuspensions for the formulation of poorly soluble drugs I. Preparation by a size-reduction technique. *Int. J. Pharm.* 1998; 60: 229–237.

БИОКОНЬЮГИРОВАННЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ДЛЯ ВЫСОКОЧУВСТВИТЕЛЬНОГО ОПРЕДЕЛЕНИЯ МОЛЕКУЛЯРНЫХ БИОМАРКЕРОВ И ИНФИЦИРУЮЩИХ АГЕНТОВ

Амит Агравал, Май Дуньмэй Ван и Шумин Не

8.1. Введение

Инфекционные заболевания являются одной из основных медицинских проблем во всем мире, только за последние годы человечество столкнулось с эпидемиями атипичной пневмонии, вирусом Западного Нила и птичьим гриппом. Возникла острая необходимость в создании новых технологий для высокочувствительного и специфичного обнаружения и идентификации инфицирующих агентов. Для всего общества ранняя диагностика инфекции помогает своевременно принять меры для защиты здорового населения, на уровне отдельного больного это сказывается на эффективности лечения, а анализ инфекционного процесса на клеточном уровне помогает установить механизмы развития заболевания и создать новые лекарства и вакцины. Сейчас существуют несколько методов определения, основанных на амплификации ДНК и серологическом анализе, однако процесс амплификации (например, с помощью полимеразной цепной реакции) часто сопряжен с контаминацией образцов, а серологические тесты достаточно длительны и не очень чувствительны.

Развитие биомедицинской диагностики направлено на обнаружение и определение индивидуальных молекул биологических маркеров и отдельных вирусных частиц в сложных образцах. Недавние исследования показали возможность идентификации единичных молекул красителя и флуоресцентных белков, однако флуоресцентные метки недостаточно ярки и стабильны для рутинного анализа отдельных молекул. Еще одна трудность заключается в том, что часто в искомые молекулы требуется ввести флуоресцентную метку химически, что является непростой задачей при работе с генами и белками, количества которых невелики. Наконец, возникает проблема отделения меченых молекул от избытка несвязанного зонда в сложных смесях или внутри живых клеток.

В этой главе мы обратимся к рассмотрению биоконъюгатов наночастиц и применению метода двухфотонной флуоресценции для быстрого обнаружения единичных нативных биомолекул и интактных вирусов. Недавние исследо-

вания, проведенные в нашей и других лабораториях, показали, что частицы размером несколько нанометров, например, квантовые точки, можно ковалентно связать с анализируемыми молекулами: пептидами, антителами или нуклеиновыми кислотами, в целях использования их в качестве флуоресцентных зондов [1–6]. По сравнению с органическими красителями и флуоресцентными белками квантовые точки и подобные им наночастицы обладают уникальными оптическими и электронными свойствами: зависимой от размера и состава флуоресцентной эмиссией, высоким коэффициентом поглощения, повышенной яркостью и фотостабильностью [7–9]. Используя данные преимущества, мы предложили метод сэндвич-анализа, в котором два зонда разного цвета одновременно узнают два участка на одной и той же молекуле. К тому же двухцентровой сэндвич-метод обладает свойством «двойной селекции», что позволяет улучшить как чувствительность, так и специфичность анализа. На принципе двухцентрового связывания основаны и некоторые другие мощные диагностические методы, например реакция латексной агглютинации [10], твердофазный иммуоферментный анализ [11], люминесцентный иммуноанализ туннелирования атомов кислорода [11, 13] (когда испускание света происходит в результате проксимальной диффузии синглетного кислорода между двумя соседними частицами после связывания мишени), а также флуоресцентная кросс-корреляционная спектроскопия [14, 15]. Все перечисленные способы позволяют избежать модификации искомым молекул, однако при этом по-прежнему остается проблема отделения связанного зонда от избытка свободного зонда.

8.2. Новые свойства наночастиц

Флуоресцентные квантовые точки (КТ), обладают уникальными свойствами, которые делают их чрезвычайно привлекательными метками для использования в сверхчувствительных оптических методах определения (рис. 8.1, см. цв. вклейку). КТ характеризуются очень высокими значениями коэффициента молярной экстинкции [порядка $(0,5 \div 5) \cdot 10^6 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$] [16], что увеличивает их яркость в 10–50 раз по сравнению с яркостью органических красителей. Кроме того, фотостабильность КТ в несколько тысяч раз превышает таковую для красителей [17, 18], так что можно получать изображение одной-единственной наночастицы и долго следить за ней без потери интенсивности (см. рис. 8.1, б). Возможность регистрации большого числа фотонов от ярких наночастиц позволяет локализовать их положение с ошибкой не более 1 нм (см. следующий раздел). Поскольку КТ отличаются также высокой поглощательной способностью, их использование в качестве зондов в биологических системах требует менее сильного возбуждения и уровень повреждения биологических образцов под действием света при длительном наблюдении снижается.

Спектр излучения квантовых точек зависит от их размера и состава, располагается в диапазоне от видимой до инфракрасной области (рис. 8.1, з) и характеризуется очень широким адсорбционным профилем [22] (рис. 8.1, а). Это

приводит к значительной величине сдвига Стокса (до 300–400 нм; расстояние между пиками возбуждения и излучения), так что один и тот же источник излучения можно использовать для получения флуоресценции различных цветов [7]. Данная технология позволяет создавать КТ-зонды с максимальной эмиссией и фоновым сигналом, при котором достигается оптимальное соотношение сигнал/шум. Поэтому для обнаружения единичных молекул исчезает необходимость в дорогом двухлазерном оборудовании, которое требуется для фокусировки двух различных длин волн в перекрывающихся образцах [23, 24]. Большая величина сдвига Стокса также играет важную роль при получении изображений молекул в условиях *in vivo*, поскольку сложные биомедицинские пробы часто обладают высокой фоновой автофлуоресценцией. Сигналы органических красителей с небольшим сдвигом Стокса нередко перекрываются интенсивной автофлуоресценцией образцов, однако сигналы КТ с большим значением сдвига Стокса легко распознаются на этом фоне. Такой «цветовой контраст» возможен только для КТ-зондов, поскольку сигналы и фон можно разделить, меняя длину волны [25].

Для улучшения отношения сигнал/фон существует два пути: повышение амплитуды сигнала и снижение уровня фона. При обнаружении единичных молекул выиграть можно путем минимизации фоновых шумов. В этом смысле оказывается полезным длительное время флуоресценции КТ. Как показано на рис. 8.1, *в*, продолжительность флуоресценции КТ превышает 10 нс, а аналогичные значения для молекул органических красителей составляют 1–2 нс. Таким образом, если мы возбуждаем меченный КТ образец лазерным излучением и ждем более 1 нс до начала анализа, сигнал КТ будет по-прежнему сильным, но автофлуоресценция образца затухнет, что позволит получить лучшее значение соотношения сигнал/фон.

Другую группу флуоресцентных наночастиц, обладающих аналогичными преимуществами, составляют частички с нанесенными на них красителями. Поскольку каждая частица содержит несколько тысяч молекул красителя, излучение таких частиц является очень ярким и стабильным. Эмиссия при разных длинах волн при возбуждении на одной и той же длине волны достигается в результате резонансного переноса энергии флуоресценции в парах донор–акцептор внутри частиц. Выпускаются частицы разного размера (от 20 нм до 1 мкм) и с различной поверхностью, пригодной для биоконъюгации (компания «Invitrogen, Inc.»).

Стоит отметить, что квантовые точки и наночастицы с нанесенными красителями имеют размеры, сравнимые с размерами биологических молекул, а поэтому пригодны для конъюгации с ними [1, 2]. Малый размер обеспечивает минимальное влияние на действие биологических систем и позволяет использовать КТ в качестве специфичных зондов для распознавания белков, нуклеиновых кислот и небольших молекул. Контролируя число молекул лиганда на их поверхности, можно также следить за прочностью связи мишени и КТ-зонда. Более того, изменение химических свойств поверхности позволяет влиять на биосовместимость и токсичность подобных структур в зависимости от специфики конкретной задачи [25, 26].

8.3. Определение единичных молекул

8.3.1. Инструментальная основа и принципы метода

Первые оптические методы определения единичных молекул появились более 40 лет назад. В 1961 г. Ротман наблюдал превращение нефлуоресцентного субстрата в флуоресцентную молекулу под действием β -галактозидазы, включенной в микроскопические капельки, и измерял скорость реакции под действием одной молекулы фермента [27]. В 1976 г. Хершфилд сообщил об обнаружении 80–100 молекул красителя флуоресцеинизотиоцианата, связанного с антителом [28]. Эти пионерские исследования характеризовались некоторыми общими особенностями: оптические устройства анализировали очень малые объемы, низкую концентрацию флуорофоров и предоставляли возможность синхронной регистрации сигнала с помощью фотоумножителя. До сегодняшнего дня системы обнаружения единичных молекул были основаны на тех же принципах. В 1990 г. Шера с соавторами сообщили о возможности эффективного распознавания отдельных молекул красителя родамина-6G в концентрации 100 фемтомолей [29]. В последующие годы были созданы два новых метода определения единичных молекул: флуоресцентная корреляционная спектроскопия [30] и схема совпадений [31]. Оба подхода используют конфокальную оптическую систему и основаны на анализе вспышек фотонов.

Типичная схема распознавания единичных молекул представлена на рис. 8.2, *а*. Объектив с высокой цифровой апертурой фокусирует лазерный пучок в небольшом объеме (менее 10 фл) внутри раствора. Когда меченная красителем биомолекула попадает внутрь анализируемого объема (рис. 8.2, *б*), она многократно подвергается возбуждению сфокусированным лазерным светом и испускает интенсивное флуоресцентное излучение. Флуоресцентный сигнал проходит через точечное отверстие и оптические фильтры, снижающие фоновые шумы, и регистрируется чувствительным детектором фотонов, фотоумножителем или лавинным фотодиодом.

Анализ автокорреляции во вспышках фотонов проводят с помощью представленного ниже уравнения, а затем строят корреляционную кривую.

$$G(\tau) = \langle \delta F(t) \delta F(t + \tau) \rangle / \langle F(t) \rangle^2 \quad (8.1)$$

Здесь $F(t)$ — флуоресцентный сигнал, полученный за время t ; $\delta F(t)$ — разность среднего значения $F(t)$ и определенного значения $F(t)$. Автокорреляционная функция $G(\tau)$ отражает степень совпадения сигналов вспышки фотонов при временном сдвиге τ . Для определения времени τ , на протяжении которого флуорофор находится в анализируемом объеме, используют корреляционную кривую (τ зависит от характеристик флуорофора и скорости его диффузии). Методом распознавания единичных молекул можно изучать биомолекулы, поскольку в ходе эксперимента при связывании с биологическими молекулами формируется комплекс, который характеризуется повышенной молекулярной массой и более низким коэффициентом диффузии.

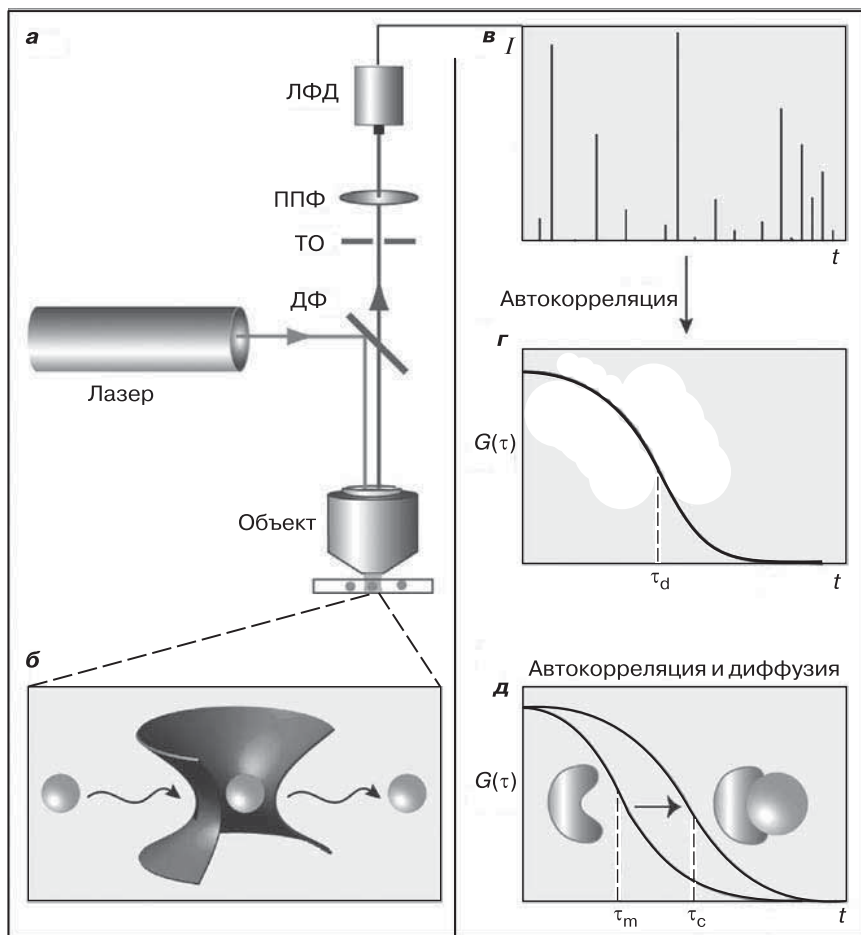


Рис. 8.2. Схема и основные принципы определения единичных молекул: *а* — лазерный луч вызывает возбуждение меченных красителем молекул, попадающих в конфокальный объем (*б*) раствора. Испускаемый свет проходит через фильтры (дихроичный фильтр, ДФ, и полосно-пропускающий фильтр, ППФ) и отверстие диафрагмы (ТО), а затем регистрируется лавинным фотодиодом (ЛФД). Вспышки фотонов (*в*) анализируются автокорреляционным устройством (*г*). Связывание молекулы-мишени (*д*) тормозит диффузию флуоресцентной метки и регистрируется по увеличению времени автокорреляции

Используя двухцветные метки и кросс-корреляционный анализ, можно также изучать взаимодействия биомолекул и их связывание, что схематично отражено на рис. 8.3 (см. цв. вклейку). Для детального ознакомления с методом флуоресцентной корреляционной спектроскопии советуем читателю обратиться

к работе [32]. Недавно для изучения взаимодействий биомолекул и обнаружения в растворе маркеров заболеваний стали применять метод совпадения двухцветных фотонных вспышек (рис. 8.3, в) [23, 24]. Он подробнее рассматривается в следующем разделе. В двухцветной схеме определения используют два комплементарных, специфичных по отношению к мишени зонда, меченных флуоресцентными красителями с разной длиной волны излучения. Поскольку органические флуорофоры обычно характеризуются узким диапазоном возбуждения, для возбуждения каждого красителя требуется своя длина волны. В другой работе [33] было показано, что софокусировка двух лазерных лучей (парфокальность) представляет собой чрезвычайно сложную задачу из-за хроматических и сферических aberrаций объектива микроскопа. Даже при тщательном выборе условий перекрывание анализируемых объемов для двух возбуждающих лазерных лучей не превышает 30% [24, 34].

8.3.2. Маркировка наночастиц цветом

Основные принципы определения единичных молекул с помощью нанозондов представлены на рис. 8.4 (см. цв. вклейку). На этой схеме изображены биоконъюгаты двух наночастиц, сконструированные для распознавания одной и той же молекулы-мишени по двум сайтам (антигенные участки или последовательности нуклеиновой кислоты). В результате образования своеобразного «сэндвича» две меченные разным цветом наночастицы сближаются, образуя пару (рис. 8.4, а). Она перемещается в растворе как единый комплекс, а при облучении лазерным пучком излучает одновременно красный и зеленый свет (т. е. пространственное сближение двух частиц приводит к временному совпадению их флуоресцентных сигналов). Напротив, несвязанные зеленые и красные частицы движутся случайным образом, и вероятность их одновременного прохождения через лазерный пучок очень низка (рис. 8.4, б). Таким образом, одновременное излучение красного и зеленого света позволяет отделить связанные мишени от избытка свободной метки в гомогенном растворе.

Для определения единичных молекул пригодны как квантовые точки, так и наночастицы с переносом энергии. Основным преимуществом метода является возможность использования одного и того же источника света для получения флуоресценции двух или нескольких цветов (рис. 8.4, в). Один возбуждающий луч создает лишь один анализируемый объем, и таким образом преодолевается проблема фокусирования двух лазерных лучей в малом объеме (несколько фемтолитров, т. е. 10^{-15} л). КТ имеют более узкие и более симметричные спектры излучения, чем одноцветные органические флуорофоры, что важно для минимизации перекрывания спектров различных меток.

Основой установки при детекции отдельных молекул служит одноточечный конфокальный микроскоп инвертированного типа с двумя лавинными фотодиодами для подсчета фотонов (ЛФД-1 и ЛФД-2), модулем регистрации отдельных фотонов или совпадений (прикреплен к дополнительному выходу микроскопа), а также проточным капилляром, вмонтированным в базу микро-

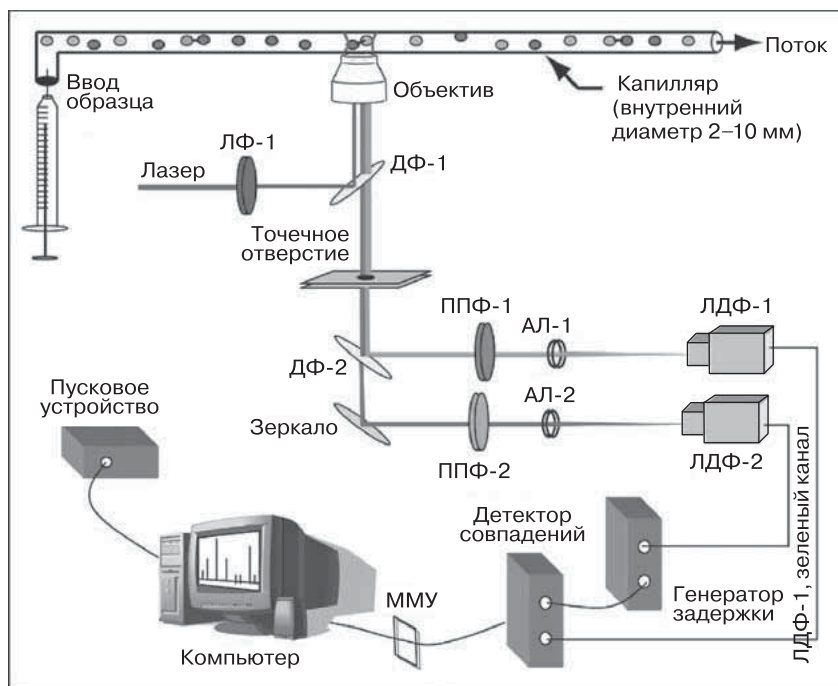


Рис. 8.5. Схема устройства, позволяющего в режиме реального времени регистрировать единичные наночастицы и «сэндвичи», проходящие по проточному капилляру. Детали процесса обсуждаются в тексте. ЛФ-1 — лазерный фильтр; ДФ-1 — дихроичный фильтр в фильтровом кубе микроскопа; ДФ-2 — дихроичный фильтр с внешней стороны от дополнительного входа микроскопа; ППФ-1 — полосно-пропускающий фильтр (HQ514 M10); ППФ-2 — полосно-пропускающий фильтр (D670 M40); АЛ-1 и АЛ-2 — асферические фокусирующие линзы; ЛДФ-1 и ЛДФ-2 — лавинные фотодиоды; ММУ — многоканальное масштабирующее устройство

скопа (рис. 8.5). В анализирующем модуле зеленое и красное флуоресцентное излучение наночастиц разделяется с помощью дихроичного фильтра (ДФ-2) и регистрируется в режиме реального времени с помощью ЛДФ-1 и ЛДФ-2. Сигнал ЛДФ-1 запускает действие генератора задержки, создающего импульс напряжения контролируемой величины. Данный импульс подается на детектор совпадений, и его ширина используется в качестве временного окна для определения количества фотонов, зарегистрированных за это время ЛДФ-2. Используя стандартные приборы для подсчета фотонов (например, многоканальное масштабирующее устройство), регистрируют совпадения выходящих сигналов за определенное время. При интервале интеграции порядка 1 мс такая система позволяет достигать высокой скорости определения единичных молекул в проточном капилляре (до 1000 значений в секунду).

8.3.3. Получение изображения отдельных молекул

Для определения локализации меченных цветом наночастиц с точностью до нескольких нанометров разработан метод, основанный на использовании двумерного гауссова ядра с нахождением центра с помощью локальных максимумов в свернутом изображении и с последующим применением гауссовой функции для локализации положения наночастиц. Эта процедура представляет собой адаптированный вариант астрофотометрической программы DAOPHOT (Dominion astrophysical observatory for the photometric analysis), предложенной в 1987 г. Стетсоном [35]. Недавние исследования показали, что положение единичных молекул можно установить с точностью до нескольких нанометров [33, 36–40], что позволяет обойти дифракционные пределы. Уэйсс с соавторами с высокой вероятностью (ошибка < 10 нм) определили локализацию наночастицы и измерили расстояние между двумя близко расположенными двухцветными частицами [33]. В 2002 г. Томпсон с соавторами предложили схему точной локализации отдельных флуоресцентных молекул и показали ее действие, используя флуоресцентные частицы диаметром 30 нм. Они установили, что важнейшую роль для локализации молекул играет минимизация фонового шума и увеличение числа фотонов, собираемых от каждого флуорофора. Позднее, используя фотообесцвечивание одной из молекул красителя Су3 в паре, Селвин с соавторами сумели локализовать данные молекулы с точностью 1,5 нм [41]. В том же году, используя аналогичный подход, Шерер с соавторами локализовали молекулы Су3 с точностью 2,5 нм [36]. Далее Спудих с коллегами показали возможность использования молекул Су3 и Су5 для определения расстояний между молекулами [38], а Рэм с сотрудниками предложили новые единицы измерения разрешения для локализации отдельных молекул [40]. В некоторых из этих работ положение флуорофора описывается двумерным гауссовым профилем, а его центр определяется путем нахождения локальных максимумов. Ошибка определения положения отдельной молекулы описывается приведенным ниже уравнением [37]:

$$\langle(x)^2\rangle = (s^2 + a^2/12)/N + (4\sqrt{\pi} s^3 b^2)/(aN^2), \quad (8.2)$$

в котором x является ошибкой определения центра; s — стандартным отклонением двумерного гауссова ядра, использовавшегося для регистрации профиля интенсивности; a — размером пикселя в изображении; N — числом фотонов от одной наночастицы и b — параметром фонового шума. Достижения в области оптики и техники получения изображений позволили в значительной степени снизить уровень шума, поэтому точность локализации молекул в значительной степени зависит от числа фотонов, собираемых от анализируемого объекта. Это означает, что более яркие и светоустойчивые флуорофоры можно локализовать более точно.

8.4. Применение биоконъюгатов частиц

8.4.1. Определение частиц респираторно-синцитиального вируса

Респираторно-синцитиальный вирус (РСВ) — причина тяжелой инфекции нижних дыхательных путей у маленьких детей и у взрослых с ослабленным иммунитетом. К сожалению, вакцины против РСВ сейчас не существует, а диагноз ставится на основе симптомов или серологических тестов. Последние для постановки диагноза, особенно при острой форме заболевания, практически непригодны, поскольку их проведение отнимает слишком много времени. Таким образом, назрела необходимость в создании чувствительного и быстрого метода определения вирусных частиц.

РСВ имеет на поверхности определенные белки, которые нужны для прикрепления к клетке организма хозяина. Используя антитела против этих белков, удалось обнаружить вирусные частицы и проследить за экспрессией белков на их поверхности [42]. Наночастицы покрывали антителами, которые специфически узнавали вирусные белки, отвечающие за связывание с клеткой организма хозяина или за слияние с ней (рис. 8.6, см. цв. вклейку). Далее создавали условия, благоприятные для образования «сэндвичей», состоящих из вирусной частицы и наночастиц с двумя типами меток, излучающих свет разной длины волны. При наличии в растворе вирусов через анализируемый объем микроскопа одновременно проходили две наночастицы, и детектор регистрировал временное совпадение испускаемых ими фотонов (рис. 8.6, б).

Описанная выше система определения единичных молекул не только решает проблему парфокальности за счет использования наночастиц, но также позволяет применять единый тест для проверки присутствия белков, ДНК или вирусов в растворе в режиме реального времени. Обработка данных в таком режиме, с подсчетом числа фотонов и определением совпадений, позволила создать мультиплексную систему регистрации единичных молекул, которая обеспечивает более широкий динамический диапазон по сравнению с методом кросс-корреляции [43]. Однако подсчет молекул в потоке происходит довольно медленно, что связано с малым количеством пропускаемого материала. Это в первую очередь относится к образцам с концентрацией ниже фемтомолярного уровня. В подобной ситуации помогает описанный в следующем разделе метод определения единичных молекул, основанный на получении их изображений.

8.4.2. Определение единичных молекул с помощью создания двухцветных изображений

На рис. 8.7 (см. цв. вклейку) представлены результаты эксперимента, в котором комплементарные последовательности ДНК присоединяли к двухцветным наночастицам. Желтые светящиеся точки, указывающие на пространственное сближение наночастиц, видны только в том случае, когда мишени комплемен-

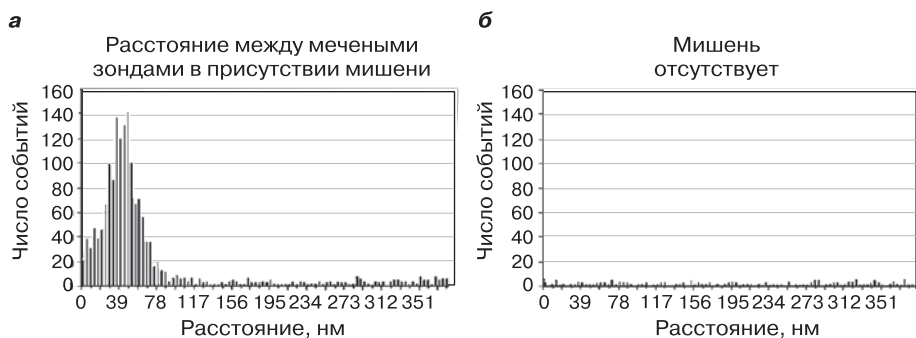


Рис. 8.8. Быстрое определение молекул ДНК. Локализация меченных разными цветами наночастиц совпадает при комплементарности мишеней. На гистограмме расстояния между красными и зелеными частицами имеется пик (а), отсутствующий в контрольном эксперименте (б, мишень отсутствует)

тарны друг другу (рис. 8.7 а и б). Длина гибридной ДНК составляет 24 пары оснований, что меньше длины обычной двунитевой ДНК [44]. Таким образом, гибридная ДНК напоминает «жесткую палочку», и можно ожидать, что расстояние между центрами двух частиц в паре составит 54 нм. Используя описанную выше схему определения локализации, мы показали, что две частицы отстоят друг от друга на расстоянии 54 нм, что совпадает с теоретическим расчетом.

Подобный анализ был проведен с девятью миллионами пар частиц для определения фрагмента гена, присутствовавшего в пиколярной концентрации и устойчивого к антиэстрогенной терапии при раке молочной железы. Результаты эксперимента были обработаны компьютером за одну минуту и представлены на рис. 8.8. В присутствии молекулы-мишени на гистограмме расстояния между красной и зеленой частичками выявляется отчетливый пик, которого нет при отсутствии мишени. Эта техника не ограничивается определением нуклеиновых кислот, она также применяется для детекции белков и патогенных организмов. Таким образом, метод визуализации единичных молекул позволяет проводить количественное и высокопроизводительное определение биологических мишеней. Поскольку размер инфицирующих агентов находится в том же диапазоне, что и размер наночастиц, использование меченных цветом частиц может обеспечить быстрое и чувствительное определение маркеров инфекционных заболеваний и нативных вирусов.

8.5. Заключение

Квантовые точки и другие флуоресцентные наночастицы — новый класс универсальных биологических зондов, которые используются в методах диагностики *in vitro* [42] для получения изображений молекул и клеток [25]. Комбина-

ция наночастиц с магнитными и оптическими свойствами позволяет получать многофункциональные зонды (Агравал и Не, неопубликованные данные). Проводя разделение частиц на основе их магнитных свойств и используя флуоресцентный метод идентификации, можно создать высокопроизводительный и высокочувствительный диагностический метод. Успехи, достигнутые в области синтеза наночастиц, и появление соответствующего оборудования расширяют границы высокочувствительного определения биологических объектов. Миниатюризация устройств и создание безопасных зондов на основе наночастиц позволят производить недорогие полифункциональные диагностические приборы. Безусловно, для этого понадобятся дополнительные исследования, однако междисциплинарная природа нанотехнологий позволяет объединять достижения самых разных отраслей науки. Результаты изучения квантовых точек указывают на возможность их успешного применения в биологических системах и предсказывают положительные результаты внедрения других нанотехнологий для биомедицинских целей.

Литература

1. Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998; 281(5385): 2013–2016.
2. Chan W.C.W., et al. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive non isotopic detection. *Science* 1998; 281: 2016–2018.
3. Dubertret B., et al. *In vivo* imaging of quantum dots encapsulated in phospholipid micelles. *Science* 2002; 298(5599): 1759–1762.
4. Jaiswal J.K., Mattoussi H., Mauro J.M., Simon S.M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21(1): 47–51.
5. Dahan M., et al. Diffusion dynamics of glycine receptors revealed by single-quantum dot tracking. *Science* 2003; 302(5644): 442–445.
6. Lidke D.S., et al. Quantum dot ligands provide new insights into erbB/HER receptor-mediated signal transduction. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22(2): 198–203.
7. Chan W.C.W., et al. Luminescent quantum dots for multiplexed biological detection and imaging. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002; 13(1): 40–46.
8. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22(1): 47–52.
9. Michalet X., et al. Quantum dots for live cells, *in vivo* imaging, and diagnostics. *Science* 2005; 307(5709): 538–544.
10. Newman D.J., Hnneberry H., Price C.P. Particle enhanced light-scattering immunoassay. *Ann. Clin. Biochem.* 1992; 29: 22–42.
11. Diamandis E.P., Christopoulos T.K., *Immunoassay*. San Diego: Academic Press; 1996. p. 579.
12. Ullman E.F., et al. Luminescent oxygen channeling assay (LOCI(TM)): sensitive, broadly applicable homogeneous immunoassay method. *Clin. Chem.* 1996; 42(9): 1518–1526.
13. Ullman E., et al. Luminescent oxygen channeling immunoassay — measurement of particle binding-kinetics by chemiluminescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1994; 91(12): 5426–5430.
14. Schwille P., Meyer Almes F.J., Rigler R. Dual-color fluorescence cross-correlation spectroscopy for multicomponent diffusional analysis in solution. *Biophys. J.* 1997; 72(4): 1878–1886.

15. Rigler R. Fluorescence correlations, single molecule detection and large number screening. Applications in biotechnology. *J. Biotechnol.* 1995; 41(2–3): 177–186.
16. Leatherdale C.A., Woo W.K., Mikulec F.V., Bawendi M.G. On the absorption cross section of CdSe nanocrystal quantum dots. *J. Phys. Chem. B* 2002; 106(31): 7619–7622.
17. Gao X.H., et al. *In vivo* molecular and cellular imaging with quantum dots. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005; 16(1): 63–72.
18. Wu X.Y., et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21(1): 41–46.
19. Clapp A.R., et al. Fluorescence resonance energy transfer between quantum dot donors and dye-labeled protein acceptors. *J. Am. Chem. Soc.* 2004; 126(1): 301–310.
20. Bailey R.E., Smith A.M., Nie S.M. Quantum dots in biology and medicine. *Phys. E Low Dimension Syst. Nanostruct.* 2004; 25(1): 1–12.
21. Smith A.M., Gao X., Nie S. Quantum dot nanocrystals for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Photochem. Photobiol.* 2004; 80(3): 377–385.
22. Smith A.M., Nie S. Chemical analysis and cellular imaging with quantum dots. *Analyst* 2004; 129(8): 672–677.
23. Agrawal A., Zhang C., Byassee T., Tripp R.A., Nie S. Counting single native biomolecules and intact viruses with color-coded nanoparticles. *Anal. Chem.* 2006; 78(4): 1061–1070.
24. Li H.T., Ying L.M., Green J.J., Balasubramanian S., Klenerman D. Ultrasensitive coincidence fluorescence detection of single DNA molecules. *Anal. Chem.* 2003; 75(7): 1664–1670.
25. Gao X., Cui Y., Levenson R.M., Chung L.W., Nie S. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22(8): 969–976.
26. Smith A.M., Ruan G., Rhyner M.N., Nie S. Engineering luminescent quantum dots for *in vivo* molecular and cellular imaging. *Ann. Biomed. Eng.* 2006; 34(1): 3–14.
27. Rotman B. Measurement of activity of single molecules of beta-D-galactosidase. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 1961; 47(12): 1981.
28. Hirschfeld T. Optical microscopic observation of single small molecules. *Appl. Opt.* 1976; 15(12): 2965–2966.
29. Shera E.B., Seitzinger N.K., Davis L.M., Keller R.A., Soper S.A. Detection of single fluorescent molecules. *Chem. Phys. Lett.* 1990; 174(6): 553–557.
30. Schwille P., Kettling U. Analyzing single protein molecules using optical methods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 2001; 12(4): 382–386.
31. Castro A., Williams J.G. Single-molecule detection of specific nucleic acid sequences in unamplified genomic DNA. *Anal. Chem.* 1997; 69(19): 3915–3920.
32. Medina M.A., Schwille P. Fluorescence correlation spectroscopy for the detection and study of single molecules in biology. *Bioessays* 2002; 24(8): 758–764.
33. Lacoste T.D. et al. Ultrahigh-resolution multicolor colocalization of single fluorescent probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97(17): 9461–9466.
34. Li H., Zhou D., Browne H., Balasubramanian S., Klenerman D. Molecule by molecule direct and quantitative counting of antibody-protein complexes in solution. *Anal. Chem.* 2004; 76(15): 4446–4451.
35. Stetson P.B. Daophot — a computer-program for crowded-field stellar photometry. *Publ. Astron. Soc. Pacific.* 1987; 99(613): 191–222.
36. Qu X., Wu D., Mets L., Scherer N.F. Nanometer-localized multiple single-molecule fluorescence microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(31): 11298–11303.
37. Thompson R.E., Larson D.R., Webb W.W. Precise nanometer localization analysis for individual fluorescent probes. *Biophys. J.* 2002; 82(5): 2775–2783.

38. Churchman L.S., Okten Z., Rock R.S., Dawson J.F., Spudich J.A. Single molecule high-resolution colocalization of Cy3 and Cy5 attached to macromolecules measures intramolecular distances through time. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102(5) 1419–1423.
39. Yildiz A., et al. Myosin V walks hand-over-hand: single fluorophore imaging with 1,5 nm localization. *Science* 2003; 300(5628): 2061–2065.
40. Ram S., Ward E.S., Ober R.J. Beyond Rayleigh's criterion: a resolution measure with application to single-molecule microscopy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103(12): 4457–4462.
41. Gordon M.P., Ha T., Selvin P.R. Single-molecule high-resolution imaging with photo-bleaching. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(17): 6462–6465.
42. Agrawal A., Tripp R.A., Anderson L.J., Nie S. Real-time detection of virus particles and viral protein expression with two-color nanoparticle probes. *J. Virol.* 2005; 79(13): 8625–8628.
43. D'Antoni C.M., et al. Rapid quantitative analysis using a single molecule counting approach. *Anal. Biochem.* 2006; 352(1): 97–109.
44. Hagerman P.J. Flexibility of DNA. *Ann. Rev. Biophys. Biophys. Chem.* 1988; 17: 265–286.

Часть II

**ПОВЕРХНОСТИ РАЗДЕЛА
МЕЖДУ
БИО- И НАНОСТРУКТУРАМИ**

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ВНЕКЛЕТОЧНОГО МАТРИКСА С КЛЕТКАМИ НА МАКРО- И НАНОУРОВНЯХ

Стив Мвенифумбо, Молли М. Стивенс

9.1. Введение

Взаимодействия клеток со средой и их реакции на внешние раздражители определяются локальными химическими и топографическими особенностями окружения, точнее, микроокружения. Характерная черта данного взаимодействия — масштабы особенностей. Они изменяются в очень широком диапазоне: от макро- до нанометрического. Очень важную роль в поведении клетки играет внеклеточный матрикс (ВКМ), который управляет внешними сигналами, а те, в свою очередь, регулируют клеточные функции, обеспечивая развитие и гомеостаз всего организма [1]. Особая роль ВКМ стала очевидной в последние годы, когда были изучены многие функции ее составляющих, выявлены новые рецепторы и механизмы клеточной сигнализации, а также описаны разнообразные молекулы-регуляторы поведения ВКМ.

Компоненты внеклеточного матрикса и их архитектура создают динамическое окружение клетки, которое не только физически «поддерживает» его, но и определяет функционирование клетки в целом [2–7]. Различие входящих в состав ВКМ молекул, а также изменения их соотношения и взаимного расположения приводят к многообразию форм матриц, каждая из которых соответствует биологическим, структурным, механическим и функциональным особенностям клеток определенных тканей. Разнообразие форм приводит к широким возможностям передачи или кодирования информации различными клеточными рецепторами с участием трансмембранных агентов, например гликопротеинов, протеогликанов и гликолипидов. Наиболее важные клеточные процессы — миграция или реструктуризация ВКМ — регулируются двунаправленной передачей информационных сигналов, что позволяет осуществлять связь с генами и, следовательно, с экспрессией белка [4]. Пространственно-временное регулирование и согласование поведения клеток обеспечивают динамические и функциональные свойства разных тканей [6].

В этой главе представлены последние достижения в области исследования ВКМ, а также характеристики взаимодействия матрикса с клеткой на разных масштабных уровнях: от макро до нано.

9.2. Микроокружение клетки

Размер обычных клеток составляет десятки микрометров, но стоит напомнить, что клетки — далеко не основная масса биологических тканей. Очень много места в них занимают промежуточные вещества. Это так называемый внеклеточный объем, который представляет собой динамические трехмерные сетки из макромолекул. Именно такие структуры называются внеклеточными матриксами и обозначаются аббревиатурой ВКМ. Постоянная перестройка данных комплексных образований приводит к необходимым изменениям клеточного окружения.

ВКМ — сложная структура из выделяемых клеткой белков, гликозамингликанов, протеогликанов и гликопротеинов. Неоднородность тканевой специфичности обеспечивает осуществление разнообразных функций, связанных с ВКМ, — от сохранения формы до передачи внутриклеточных сигналов. При этом белки активируют пути передачи сигналов, а рецепторы на поверхности клетки выступают как первичные их приемники, а также участвуют в трансдукции выделяемых клеткой сигнальных молекул и лигандов к окружающей ее матрице.

9.2.1. Разнообразие структуры и состава ВКМ

Основные составляющие ВКМ у всех организмов многоклеточных принадлежат к четырем классам биологических молекул: коллагены, гликопротеины, гликозамин-гликаны и протеогликаны, однако в ходе эволюции на этой основе возникли разные структуры ВКМ. Это объясняется наличием множества веществ в указанных классах соединений, а также способностью клеток выделять структурные компоненты ВКМ в разных сочетаниях и соотношениях. Таким образом, архитектура ВКМ характеризуется большим разнообразием, что отражает широчайший спектр биофункциональных требований к тканям.

9.2.1.1. Разнообразие макромолекулярного состава ВКМ

Экстенсивные эволюционные изменения, происходящие в организмах многоклеточных, привели к возникновению множества матриц, отличающихся молекулярным строением и сигнальными доменами. Например, сухожилия всех организмов содержат фибриллярные коллагены типа I с ленточной структурой, способные выдерживать сильные растягивающие напряжения [8]; для базальных мембран характерны сеточные образования из нефибриллярных коллагенов типа IV, выступающие в роли селективных фильтрационных барьеров [9]. Многие из этих макромолекул возникли в результате постройки так называемых химерных агрегатов из структурных доменов в ходе перетасовки экзонов [10]. Часть макромолекул — это изоформы, возникшие путем дифференцирующего сплайсинга доменов при посттрансляционной трансформации [11]. В качестве примера можно сослаться на разнообразие коллагенов, которые в настоящее время принято разделять на 27 различных типов [12, 13]. Аналогичное разнообразие, связанное с дифференцирующим сплайсингом, отмечено для

многих входящих в состав ВКМ гликопротеинов: фибронектинов, ламининов и тенасцинов, для которых изменение числа и видов гликозамингликанов связано с неоднородностью распределения протеогликанов [11, 14].

9.2.1.2. Эволюционное разнообразие компонентов ВКМ

Помимо специфического разнообразия, присущего индивидуальным макромолекулярным составляющим ВКМ, матрицы также характеризуются значительным композиционным разнообразием. Это может быть следствием различия в генерации клеткой отдельных компонентов матрикса и специфических областей или граничных зон внутри ткани.

Роль ВКМ в регулировании поведения развивающихся клеток изучалась во многих работах [5, 6, 15–17]. Было установлено, что данные клетки передвигаются в микроокружении растущих тканей под действием различных маркеров или сигналов, модулирующих переходные состояния клеток и их поведение. Модуляция вызывает значительные изменения в типах клеток, синтезируемых ВКМ, и в их химическом и геометрическом строении. В итоге образуется определенная ткань со своими биологическими и функциональными характеристиками.

Примером служит процесс энхондральной оссификации, или образования костной ткани под хрящами, требующий сложной координации воздействия микросреды с развитием клеток разных типов. Вначале обогащенные гиалонуратами и коллагенами типа I ВКМ предоставляют благоприятные условия для миграции и размножения мезенхимных клеток [18], которые, по мере развития костной ткани, начинают передвигаться, образовывать агрегаты, а затем конденсируются в виде матриц для будущих скелетных элементов [19, 20]. Клетки, расположенные в центре данных молекулярных конденсатов, позднее дифференцируются и превращаются в хондроциты, в результате из микроокружения клетки постепенно вытесняются гиалонураты, а затем возрастает секреция других макромолекул, включая агрекан и коллаген II [21], действующих как молекулярные маркеры, распознающие дифференцирующиеся хондроциты и отделяющие последние от недифференцированных мезенхимных клеток. После завершения дифференциации в окружении образовавшейся структуры ВКМ хрящевых тканей происходят сложные превращения. Затем близлежащие хондроциты ВКМ кальцинируются, что приводит к апоптозу [17]. Кальцинированный матрикс способствует развитию внутрикостной сосудистой системы путем проникновения в ткань хондропластов и остеобластов [15]. Одновременно вместо коллагена типа II начинается синтез коллагена I, в результате ВКМ хрящевой ткани вокруг клетки деградирует и замещается ВКМ костной ткани [21]. Такие структурные изменения — важный фактор органогенеза, позволяющий придать необходимые свойства растущим костным тканям скелетной системы.

9.2.1.3. Разнообразие, связанное с тканевой специфичностью

Структура и функции тканей определяются относительной долей различных составляющих матрицы, что легко проследить на некоторых типах тканей, например в клетках суставных хрящей и стенок артерий.

Уникальное сочетание макромолекул со сложной структурой ВКМ придает хрящевым тканям особые физические свойства: высокое сопротивление сжатию и способность изгибаться без затрат на трение. Основным компонентом хрящевых тканей является коллаген II, который в сочетании с небольшим числом коллагенов V, VI, IX, X и XI позволяет сформировать фибриллярную сетку [22] — результат самоорганизации смеси протеогликана, агрекана, гликозамингликанов и гиалуронана [23]. Структура образующейся коллагеновой сетки обеспечивает высокую прочность хрящевых тканей на разрыв и сопротивление набуханию, в то же время построенная из агреканов высокосульфатированная и отрицательно заряженная поверхность этих тканей притягивает к матриксу катионы. Это приводит к тому, что при набухании возрастает осмотическое давление [24]. Перечисленные особенности набухания хрящей способствуют диссипации и перераспределению сжимающих нагрузок, как результат изменения осмотического и гидростатического давления.

Примером противоположных функциональных свойств образующейся ткани служат стенки артериальных сосудов. Они должны не только сопротивляться растягивающим нагрузкам, обеспечивая поток крови без ее проникновения сквозь поверхность сосудов, но и одновременно приспосабливаться к гемодинамическому давлению, т. е. воздействию потока крови. Таким образом, сосуды изменяют свои свойства в зависимости от переменного давления крови, создаваемого сердечной мышцей [25]. Поэтому строение артериальных стенок представляет собой сложную иерархическую структуру из эндотелиальных клеток, клеток гладких мышц и ВКМ-белков [16]. Артериальные стенки обычно состоят из трех слоев. Внутренняя оболочка построена из эндотелиальных клеток и гидрированного матрикса, обогащенного гиалуронами и протеогликанами. Медия, или средняя оболочка, отделена от внутренней оболочки плотными и упругими внутренними перегородками из наслоений клеток гладких мышц и упругих волокон. Наконец, внешний слой также разделен упругими прослойками из фибриллярных коллагенов и фибробластов [26]. Основными строительными блоками описываемой системы служат коллагены I и III, находящиеся в фибриллах, обеспечивающих прочность стенок на растяжение [16]. Коллагены IV и VIII внутри базальных мембран формируют трехмерные сетки, которые закрепляют клетки на поверхности и создают возможность регулирования проницаемости стенок сосудов [26]. Самосборка молекул фибриллин приводит к формированию микрофибриллярных сетей, стабилизирующих структуру упругих волокон [27, 28], а самоорганизация эластинов обеспечивает упругость стенок, позволяющую реагировать на изменения гемодинамического давления крови [29].

Различие в составе и строении ВКМ предоставляет возможность для создания механизмов управления поведением клеток за счет перестройки специфических особенностей растущих биохимических структур.

9.2.2. Наномасштабные структуры ВКМ

Взаимодействия между клетками и ВКМ производятся с помощью разномасштабных структурных элементов, в результате иерархическая сборка составляющих ВКМ играет важную роль в большинстве клеточных процессов. Напомним, что все макромолекулы, составляющие нано- и макромасштабные структуры ВКМ, независимо от того, образуют они сложные гликопротеиновые сетки или представляют собой отрицательно заряженные протеогликаны, относятся к четырем группам соединений: белкам, гликозамингликанам, протеогликанам и гликопротеинам.

9.2.2.1. Коллагены и эластины

ВКМ составляет множество белков, но их подавляющее большинство относится к коллагенам и эластинам. Коллагены — наиболее распространенные белки в человеческом организме вообще и в составе ВКМ в частности, поэтому для них уже сложилась некая система классификации. Как уже отмечалось, выделяют 27 различных типов коллагенов, обозначаемых римскими цифрами I–XXVII, для которых уже описаны 42 так называемые α -цепи [12, 30–33]. Молекулы всех коллагенов состоят из трех гомо- или гетеротримерных составляющих структур в виде α -последовательностей, образующих тройную спираль [34]. Каждая из α -цепей содержит повторяющееся звено: $(\text{Gly-X-Y})_n$, в котором глицин всегда занимает каждую третью позицию, а X и Y чаще всего представлены пролином и гидроксипролином [35]. Гидроксильная группа гидроксипролина обычно образует водородные связи, стабилизирующие тройную спираль, а содержащиеся в этой же структуре остатки лизина и гидроксизина обеспечивают сохранение структуры в целом путем формирования ковалентных связей между молекулами коллагена на супрамолекулярном уровне [36]. При этом большая часть коллагенов ассоциирует. Так создаются высокоорганизованные надмолекулярные структуры, причем образуемые ими домены из тройной спирали могут различаться по длине и перемежаться, непрерывно или дискретно, с доменами неспиральной структуры, что зависит от типа коллагенов. Сверхсемеяства коллагенов обычно составляют несколько подсемейств. Общие сведения о коллагенах разных типов приводятся в табл. 9.1, где также указаны их некоторые свойства, виды тканей, где эти коллагены встречаются чаще всего, и их характерные функции.

Синтез про-альфа коллагеновых цепочек происходит за счет нескольких ко- и посттрансляционных трансформаций белков, выделяемых клеткой. К ним относятся: гидрокселирование выделяемых пролина и лизина, гликозилирование гидроксизинового и аспарагинового остатков, образование дисульфидных связей и самосборка цепей с формированием проколлагеновой тройной спирали. Проколлагены выделяются из клетки в ВКМ, где происходит расщепление защитных пропептидов N и C, в результате молекулы коллагенов формируют устойчивые сшитые фибриллы и другие супрамолекулярные структуры.

Таблица 9.1

**Подсемейства коллагенов и известных супрамолекулярных структур
по данным различных публикаций [13, 30, 32, 35–39 и др.]**

Подсемейство	Тип коллагена	Структурные особенности	Характерные ткани	Функции
Фибрилло-образующие коллагены	<i>Фибриллярные коллагены</i>			
	I	Пучки длиной 300 нм с перемежающимся расположением волокон большого диаметра	Кожа, сухожилия, кости, легкие, роговица	Поддерживающие волокна, опознаваемые интегринами поверхностных рецепторов клетки
	II	Пучки длиной 300 нм с перемежающимся расположением волокон малого диаметра	Хрящи, жидкая часть стекловидного тела	Поддерживающие волокна
	III	Пучки длиной 300 нм с перемежающимся расположением волокон малого диаметра; часто кополимеризуются с коллагенами типа I	Кожа, мышцы, сосуды, легкие, почки	Небольшие поддерживающие волокна
	V	Фибриллы длиной 390 нм с глобулами, расширенными к NH ₂ -содержащей группе; часто кополимеризуются с коллагенами типов I и III	Роговица, зубы, кости, кожа, гладкие мышцы, сухожилия, печень	Небольшие поддерживающие волокна на периферии клеток, взаимодействующие с тромбоспондином

Продолжение табл. 9.1

Подсемейство	Тип коллагена	Структурные особенности	Характерные ткани	Функции
	XI	Фибриллы малого диаметра; могут образовывать молекулы с коллагенами типов II, IX и V	Хрящи, жидкая часть стекловидного тела	Возможная основа для коллагенов типа II, регулирующих диаметр волокон
	XXIV	Фибриллы малого диаметра, могут экспрессироваться совместно с коллагенами типа I	Развивающаяся роговица и кости	Возможная регуляция фибрилlogenеза коллагенов типа I
	XXVII	Фибриллы малого диаметра	Хрящи, глаза, уши, легкие	Неизвестно
Нефибриллярные коллагены				
ФАСIТ (фибриллярные коллагены со структурной прерывистой тройной спиралью)	IX	ФАСIТ; глобулярные домены с NH ₂ -содержащей концевой группой; связанные гликозамингликанами (ГАГ)	Хрящи, жидкая часть стекловидного тела	Ассоциация с коллагенами типа II и взаимодействие с протеогликанами
	XII	ФАСIТ	Кожа, сухожилия, хрящи, периодонтальная связка	Ассоциация с коллагенами типа I и взаимодействие с различными компонентами ВКМ
	XIV	ФАСIТ	Фетальная кожа, сухожилия, хрящи	Аналогично коллагенам типа XII
	XVI	ФАСIТ	Сердце, легкие, поджелудочная железа, плацента	Стабилизация фибробластов в матриксе (межклеточном веществе) кожи

Продолжение табл. 9.1

Подсемейство	Тип коллагена	Структурные особенности	Характерные ткани	Функции
	XIX	FACIT	Сосудистые, нейрональные и мезенхимные зоны базальных мембран	Адгезивные белки в системах (клетка–клетка/клетка–матрикс); ассоциация с гепарансульфатами протеогликанов
	XX	FACIT	Эпителий ротовицы, кожа, хрящи, сухожилия	Регулирование диаметра фибрилл; функции, аналогичные коллагенам типов XII и XVI
	XXI	FACIT	Стенки сосудов, клетки гладких мышц	Участие в процессах ВКМ для сеток сосудистой системы при ангиогенезе
	XXII	FACIT	Соединительные ткани	Лиганды клеточной адгезии для эпителия кожи и фибробластов
	XXVI	FACIT	Семенники и яичники	Возможно участие в образовании репродуктивных тканей
	Слоистые коллагены	IV	Волокна длиной 400 нм, формирующие сетчатые слои	Базальные мембраны
VIII		Волокна длиной 130 нм, формирующие гексагональные разветвленные структуры	Склера (белковая оболочка глаза), десцеметова оболочка	Регулирование окружения матрикса; контроль толщины слоев фибробластов и десцеметовой оболочки в клетке

Продолжение табл. 9.1

Подсемейство	Тип коллагена	Структурные особенности	Характерные ткани	Функции
	X	Волокна длиной 130 нм, формирующие гексагональные структуры	Гипертрофированные хрящи	Образование эндохондральных костей; взаимодействие с волокнами коллагенов типа II
Коллагены с зернистой структурой	VI	Волокна из гранул диаметром 5–10 нм, образующие глобулы с периодической структурой	Сосуды, кожа, межпозвоночные диски	Поверхности раздела между фибриллами коллагена и клетками; множественные последовательности RGD, опознаваемые рецепторами интегрина
Прикрепленные коллагены	VII	Коллагеновые домены длиной 420 нм; образование фиксирующих волокон	Коллагены, расположенные под базальной мембраной кожи	Прикрепление эпителиальных клеток кожи к лежащей ниже строме
Трансмембранные коллагены	XIII	Белки клеточных мембран	Фибробласты, бляшки растущих хрящей, эпидерма, фолликулы волос	Адгезия и миграция клеток; связь с фибронектином, гепарином и компонентами базальных мембран
	XVII	Белки клеточных мембран	Соединения дермальных и эпидермальных слоев кожи в полудесмосомах	Связь базальных клеток со стромой
	XVIII	Белки клеточных мембран	Клетки метастатических опухолей, роговица, легкие	Возможно, способствуют стабильности поверхностных участков роговицы

Окончание табл. 9.1

Подсемейство	Тип коллагена	Структурные особенности	Характерные ткани	Функции
	XXV	Белки клеточных мембран	Нейроны	Возможно, участвуют в процессах соединения нейронов
Мультиплексины	XV	Белки основной части хондроитинсульфата	Сердце, плацента, эндометрий, скелетные мышцы	Регулирование важнейших функций базальных мембран; стабилизация мышечных клеток и микрососудов
	XVIII	Белки основной части хондроитинсульфата	Легкие, печень, почки	Регулирование важнейших функций базальных мембран; создание структурной общности

Более детальные сведения о биосинтезе коллагенов можно найти в обзорах [13, 32, 36] и учебниках [37, 40]. Ниже будут описаны только иерархические структуры коллагенов и процессы их самоорганизации при взаимодействии с клетками.

Особая важность коллагенов для обеспечения структурной целостности ВКМ и ее прикрепления к клетке обусловлена их способностью к формированию отдельных или объединенных фибрилл, волокон и сеток в сочетании с другими белками ВКМ. Фибриллообразующие коллагены относятся к структурирующим клеточным факторам, тогда как нефибриллярные связаны с механизмами регулирования поведения клеток.

Фибриллообразующие коллагены (см. классы I, II, III, V, XI, XXIV и XXVIII в табл. 9.1) — основные продукты синтеза соединительных тканей, обладающие способностью к организации, точнее, самоорганизации, высокоупорядоченных фибрилл и волокон. Структурные единицы данных коллагенов — участки тройных спиралей (длина около 300 нм и диаметр 1,5 нм), которые формируют в образующихся волокнах жесткие стержневые структуры. Фибриллы также могут содержать гетеротипные участки, состоящие из коллагенов разных типов, организованных в виде дискретных структур с требуемыми биомеханическими свойствами [35]. Например, известно, что диаметр волокон зависит от соотношения типов коллагенов в гетеротипных фибриллах, образующихся при зарождении хрящей из коллагенов типа II, IX и XI [41].

В работе [42] показано, что свойства формируемых волокон определяются взаимодействиями фибриллярных коллагенов с аналогичными коллагенами в виде прерывистой тройной спирали (FACIT) и небольшими молекулами протеогликанов. Коллагены типа FACIT (IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI, XXII и XXIV) выделяют в подкласс коллагенов, не формирующих волокна, а лишь присоединяющихся к поверхности уже существующих коллагеновых фибрилл. Эти коллагены также участвуют в образовании структуры ВКМ путем формирования связей между фибриллярными коллагенами и другими элементами ВКМ и, подобно коллагенам типа XVI, играют важную роль в фиксации микрофибрилл на поверхности базальных мембран [43]. В отличие от FACIT некоторые другие коллагены, например коллагены ГАГ (тип IX), только помогают модулировать поверхностный заряд формирующихся фибрилл [44].

Образующие слои коллагены (типы IV, VIII и X) подобны соединениям, участвующим в создании структур базальных мембран (тип IV) или гексагональных сеток (типы VIII и X). Они играют важную роль в закреплении на клетках, а также выступают как молекулярные фильтры или проницаемые барьеры для эмбрионов. Молекулы коллагенов типа IV в базальных мембранах содержат коллагеноподобные домены длиной около 400 нм [44], превышающие длину доменов фибриллообразующих коллагенов, что позволяет таким молекулам самоорганизовываться и формировать сетчатые структуры. Мономеры в этих сетках могут образовывать по принципу хвост-к-хвосту переплетающиеся спиральные домены и надмолекулярные спирали [36]. Слоистые коллагены (типы VIII и X) способны создавать почти одинаковые по размеру структурные

единицы в виде стержней длиной 130 нм, в которых коллагеноподобные домены содержат по восемь одинаковых нарушений в последовательности Gly–X–Y [30] и могут образовывать гексагональные решетки.

Коллагены типа VI похожи на гранулированные волокна. Обычно это гетеротримерные молекулы, которые состоят из трех одинаковых белковых цепей с очень короткими доменами из тройных спиралей, но достаточно длинными глобулярными доменами с N- и C-концевыми группами, способными соединяться в так называемые гранулярные микрофибриллы [36]. Их могут формировать только коллагены типа VI, причем наличие комбинаций RGD (аргинин–глицин–аспартат) в их структуре играет важную роль при взаимодействии с другими элементами ВКМ, а также с рецепторами на поверхности клеток [36].

Коллагены типа VII образуют фиксирующие фибриллы, связывающие базальную мембрану с фиксирующей бляшкой в основании ВКМ [46]. Данные коллагены составляют большинство фиксирующих фибрилл, причем в них домены из тройных спиральных структур имеют длину свыше 420 нм, значительно превышающую размеры других классов коллагенов [30]. Речь идет о гомотримерной молекуле, составленной из коллагеноподобных центральных доменов, объединенных на концах с двумя неколлагеноподобными доменами. Внутри внеклеточного пространства коллагены типа VII формируют антипараллельные димеры, которые затем неупорядоченно объединяются, образуя фиксирующие фибриллы [47].

Трансмембранные коллагены (типы XIII, XVII, XXIII и XXV) — гомотримерные молекулы на клеточной поверхности, которые состоят из многочисленных внеклеточных доменов: эктодоменов, экзодоменов, построенных в виде тройных спиралей, соединенных с одиночными гидрофобными трансмембранными доменами [35]. Внутри эктодоменов во внеклеточном пространстве участки тройных спиралей образуют стержневидные структуры, причем разрывы между спиральями придают гибкость всей молекуле [48].

Мультиплексины, принадлежащие к типам XV и XVIII, — гомотримерные коллагены, характеризующиеся как большим числом доменов, состоящих из тройных спиралей, так и множеством разрывов между ними. В состав мультиплексинов входит крупный N-концевой глобулярный домен из тройных спиралей со многими нарушениями и большой C-концевой глобулярный домен. В них часто присутствуют длинные цепочки гликозамингликанов, из-за этого многие исследователи относят мультиплексины к классу протеогликанов. Более подробное описание структур и функций сверхсемейства коллагенов можно найти в обзорах [13, 30, 32–34, 36, 48, 49].

Основным белком в составе упругих волокон соединительных тканей, например кровеносных сосудов и кожи, является эластин, в состав которого входят глицин, валин, аланин и пролин, а также гидрофобные аминокислоты [50, 51]. Синтез эластина происходит за счет ковалентного сшивания растворимого прекурсора фермента лизил-оксидазы с образованием нерастворимого полипептида [29]. Вместе с другими микрофибриллярными компонентами

эластина формирует упругие волокна, которые затем образуют случайно ориентированную сетку с внутренними связями. Образование волокон с участием эластина начинается с создания пучков микрофибрилл, диаметром около 10–12 нм, из фибриллина, выделяемого во внеклеточное пространство. Затем эти пучки агрегируют [29]. Процесс формирования волокон происходит посредством осаждения тропоэластинов на особых центрах внутри микрофибриллярных пучков, поэтому они постепенно мигрируют из внутренней части волокна к внешней и вступают в реакции ковалентного присоединения, формируя каркас из эластина. В результате образуются волокнистые сетки из эластина с низкой растворимостью и достаточно высокой упругостью [52]. Это объясняется сочетанием межмолекулярных поперечных сшивок десмозина и высоким содержанием гидрофобных аминокислот в эластине [53, 54]. Известно также, что последний способствует формированию путей передачи сигналов, а входящая в его состав структура VGVAPG, Val–Gly–Val–Ala–Pro–Gly, известна как активатор металлопротеиназ [55], повышающих хемотаксическую активность процессов с участием фибробластов [56].

9.2.2.2. Гликозамингликаны

Гликозамингликаны — длинные полимерные цепи с дисахаридными повторами. Они способствуют созданию подходящего микроокружения для маршрутов миграции клеток или переноса макромолекул внутри ВКМ за счет формирования каналов определенных размеров, а также связывания или, наоборот, активации сигнальных молекул при их прохождении по миграционным путям. Гликозамингликаны относятся к сложным углеводам. Их классифицируют в соответствии с повторами дисахаридных элементов: сульфатов хондроитина, дерматана, гепарана, гиалунорана и кератана [57]. Из-за высокого содержания сульфатов и уоновых кислот гликозамингликаны несут большой отрицательный заряд, что позволяет им за счет сил электростатического взаимодействия легко связываться с лигандами. В тканях гликозамингликаны обычно присутствуют в виде компонентов протеогликанов, единственным исключением служит гиалуронан, так как он выделяется во внеклеточное пространство клеточными мембранами, содержащими фермент гиалуронан-синтазу, способный выступать как свободный углевод [58, 59]. Молекула гиалуронана очень гибкая и легко изменяет конформацию, образуя так называемые случайные спирали, которые затем самоорганизуются в сеточные структуры. Благодаря большому числу поверхностных анионных остатков, гиалуронан имеет высокое сродство к воде и поэтому может связывать катионы с группами COO^- и образовывать суперагрегаты с некоторыми протеогликанами, включая агрекан.

9.2.2.3. Протеогликаны

Протеогликанами называют разнообразные молекулы, распространенные в ВКМ и экспрессируемые на поверхность клетки. Это ряд гликопротеинов, свойства и структуру которых несколько изменяют боковые цепи гликозамингликанов, ковалентно связанные с белками в центре молекулы. В протеоглика-

нах присутствует много последовательностей, часто встречающихся в аналогичных белках, включая повторяющееся звено фактора эпидермального роста и звенья-связки с гиалуронатом, а также соединения, похожие на иммуноглобулины с обогащенными лектиновыми повторами и доменами, соединенными с сахарами [60]. Подобные соединения, представленные в ВКМ, можно разделить на два подсемейства в соответствии с характерными для них особенностями белкового окружения [61]. Еще протеогликаны различают по размерам и по отношению к гиалуроновой кислоте, как способных, так и не способных связывать гиалурон. По этому признаку протеогликаны также делятся на две большие группы (табл. 9.2).

В верхней части таблицы приводятся данные о малых по размеру протеогликанах с высоким содержанием лейцина: бигликаны, декорин, фибромодулин и люмикан, в нижней — о более крупных, модулярных протеогликанах. Последние разделены на две группы. Соединения первой группы, аргин и перлекан, не связывающие гиалуроны, соединения второй группы — аггрекан, верзикан и CD44 могут связывать гиалуронат и лектин [2]. Большое разнообразие строения белковых доменов центральной части и боковых ветвей гликозамингликанов позволяет протеогликанам проявлять высокую степень химического родства при связывании разнообразных лигандов и специфических взаимодействиях внутри ВКМ. Например, молекула перлекана способна проникать в базальные мембраны, создавая отрицательный заряд, который обеспечивает селективную по заряду проницаемость данного участка мембраны [63]. Небольшой, обогащенный лейцином, декорин может регулировать процесс фибриллогенеза в коллагене [64, 65]. Некоторые протеогликаны, например гепарансульфат, участвуют в синтезе фактора роста фибробластов (ФРФ), взаимодействуя либо непосредственно с ФРФ, либо с клеточными рецепторами, повышающими сродство ФРФ к ассоциированным рецепторам [57, 66].

9.2.2.4. Гликопротеины

Гликопротеины (гликопротеиды) не только могут формировать упорядоченные структуры из коллагенов, эластинов, протеогликанов и клеток, но и сами являются строительными блоками ВКМ. Эти макромолекулы очень разнообразны по размерам, структуре и распределению в тканях и обычно представляют собой белки, ковалентно связанные с олигосахаридами. Гликопротеины состоят из большого числа субъединиц, способных взаимодействовать как друг с другом, так и с клетками и белками матрикса [6]. Внеклеточные мембраны содержат много разнообразных гликопротеинов, включая фибронектин и ламин.

Фибронектин — наиболее изученный гликопротеин, имеющий множество изоформ, состоящих из модулей трех типов (I, II и III), которые образуют повторяющиеся мотивы, разделенные соединительными последовательностями [67]. На рис. 9.1 показана молекула гликопротеина, содержащая центры связывания с коллагенами, протеогликанами и клеточными рецепторами, например интегринами. Наиболее распространены в таких структурах модули типа III, включающие аспаратсодержащие последовательности, например

Таблица 9.2

**Общие характеристики некоторых протеогликанов
по данным публикаций [2, 40, 61, 62]**

Протеогликан	Белковое ядро (~кДа)	Гликозамингликаны и их число	Характерные ткани	Функции
<i>Небольшие протеогликаны с высоким содержанием лейцина</i>				
Бигликан	38–40	Хондроитинсульфат/ дерматансульфат (2)	Мышцы, кости, хрящи, эпителий	Связывание с поверх- ностью клеток
Декорин	36–40	Хондроитинсульфат/ дерматансульфат (1)	Коллагенные матрицы, кости, зубы	Связывание с коллаген- новыми волокнами и модификация их соеди- нений; связь с β-транс- формирующим факто- ром роста
Фибромодулин	43–43	Кератансульфат (2–4)	Хрящи, кожа, сухожилия	Связывание коллагенов I и II; уменьшение раз- меров коллагеновых фибрилл

Окончание табл. 9.2

<i>Модулярные протеогликаны</i>						
Не связывающие гиалурон	Аргин	200–250	Гепарансульфат (3)	Синаптические сайты мышечных соединений	Участие в агрегации ацетихолиновых рецепторов	
	Перлекан	400–467	Хондроитин-сульфат/гепаран (3)	Базальные мембраны, поверхность клеток, хрящи	Самосборка; связывание ламинина с базальными мембранами; связывание факторов роста основных фибробластов	
Связывающие гиалуронан и лектин	Агтрекан	220–250	Хондроитин-сульфат (>150) и кератинсульфат (100–150)	Хрящи, мозг, кровь	Связывание гиалуронана и заполнение ВКМ	
	Верзикан	260–370	Хондроитин-сульфат/дерматансульфат (10–30)	Кровеносные сосуды, мозг, хрящи, кожа	Возможно связывание гиалуронана	

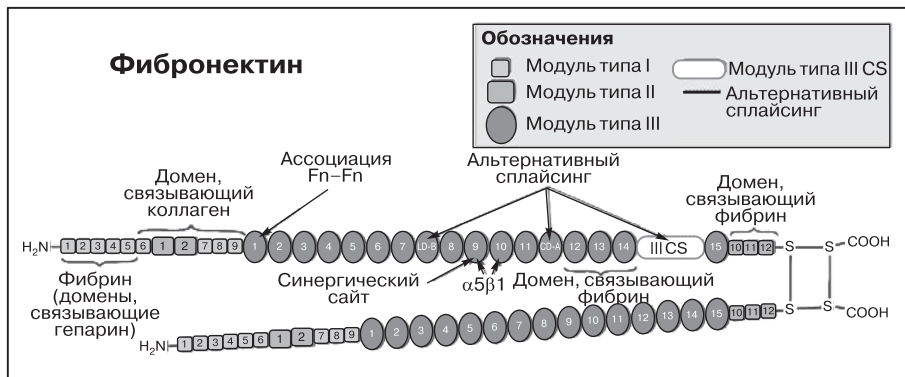


Рис. 9.1. Строение молекулы фибронектина. Показаны отдельные структурные модули, а также разнообразные домены, специфически связывающие определенные типы макромолекул. Разница в строении двух очень похожих молекулярных цепей димера (соединенных дисульфидными связями на С-концах) обусловлена лишь альтернантным сплайсингом. CS III — связывающий сегмент типа III; ED-A — избыточный домен А (между 11 и 12); ED-B — избыточный домен В (между 7 и 8); Fn — фибронектин

типа III, включающие аспаратсодержащие последовательности, например RGD, Arg-Gly-Asp, которые за счет интегринов участвуют в процессах клеточной адгезии [68, 69].

Фибронектин играет важную роль в большинстве межклеточных процессов. Он необходим для сборки коллагенов, а также для регулирования введения морфогенов и факторов роста в структуру внеклеточного матрикса [67, 71]. Изучение его распределения в организме при образовании скелетной системы позволяет предположить, что он вовлекается в процессы роста костной ткани на ранней стадии ее развития [72], а затем продолжает участвовать в поддержании гомеостаза зрелой ткани, регулируя дифференциацию и выживание остеобластов [73].

Ламинины — первичные адгезионные белки матрицы в составе базальных мембран, имеют несколько изоформ и представляют собой крупные гетеротримерные гликопротеины, состоящие из трех генетически различающихся полипептидных цепей, называемых обычно альфа-, бета- и гамма-цепями, которые образуют крестообразные структуры с глобулярными доменами на концах (см. рис. 9.1) [74, 75]. Эти белки содержат много связывающих доменов с разнообразными функциями, такими как образование сеток и волокон и объединение белков матрицы в супрамолекулярные структуры. Элементы, формирующие ВКМ, содержат все три субъединицы и обычно располагаются на коротких «рычагах» крестообразных структур, а ответственные за клеточные взаимодействия домены — на альфа-цепях с N- и С-концевыми группами [74]. Например, внутри базальной мембраны в самосборке молекул ламинина участвуют три коротких

«рычага», а именно, альфа1-, бета1- и гамма1-цепи ламинина-1 [76]. В то же время их связи с энтактин/азотом ограничены присутствием гамма1-цепи в коротком рычаге [77], поэтому интегриновые рецепторы на клеточной поверхности не могут связываться с G-подобными модулями GМ-ламинина в альфа-субъединицах [78, 79]. Предполагается, что каркас базальной мембраны формируется из коллагенов типа IV, ламининов и энтактинов, в результате образуется двухмерная супрамолекулярная сетка, где энтактин связывает сетки ламинина и коллагена путем нековалентных взаимодействий [78, 80].

9.2.3. Объединение элементов и самосборка иерархической структуры

В образовании тканей и их гомеостазе ясно проявляется иерархия строения разномасштабных биоструктур, что очень заметно при формировании ВКМ, обладающей развитой модулярной и иерархической архитектурой. В состав внеклеточного матрикса входит большое число элементов с различными связывающими доменами, которые обеспечивают не только сборку ВКМ и стабилизацию ее структуры, но и функциональные взаимодействия в системе клетка–матрикс. В качестве примера приведем волокнистые структуры, которые придают клеткам прочность, эластичность и проницаемость, где протеогликаны выступают как источники морфогенов или регуляторы осмотического давления, а гликопротеины стабилизируют структуру волокон или выполняют функцию связывающих центров. Такое объединение структуры и функции позволяет формировать сложные биологические ткани. Взаимоотношения структур разной величины при обеспечении необходимых функциональных свойств можно проследить на примере образования суставного хряща.

Суставной хрящ — типичная аваскулярная, бессосудистая ткань, содержащая небольшое число хондроцитов, покрывающих субхондральные клеточные образования в синовиальных сочленениях [22]. Суставные хрящи, в сочетании с синовиальной жидкостью, образуют очень прочную и стойкую к истиранию поверхность, толщина которой составляет несколько миллиметров [81, 82]. Составляющие данную ткань матрицы и клетки построены по строгому иерархическому принципу и четко разделяются на четыре зоны: поверхностную, среднюю, глубокую и кальцинированную (рис. 9.2), значительно различающиеся как по биохимическому составу и клеточной морфологии, так и по структурной организации в системе клетка–матрица [81, 83].

Поверхностная зона состоит из плотно упакованных фибриллярных сеток коллагена с плоскими участками хондроцитов, располагающихся тангенциально к плоскости сустава [84]. Такая ориентация коллагеновых фибрилл в области интенсивного трения обеспечивает их быстрое приспособление к высоким сдвиговым и растягивающим напряжениям, так как основную массу данных фибрилл составляют коллагены типа II. В состав микрофибрилл зоны трения также входят коллаген типа XI и декорин, причем коллаген регулирует латеральный рост, а декорин — диаметр волокон [41]. Волокна в этой зоне очень тонкие, их диаметр около 20 нм [83].

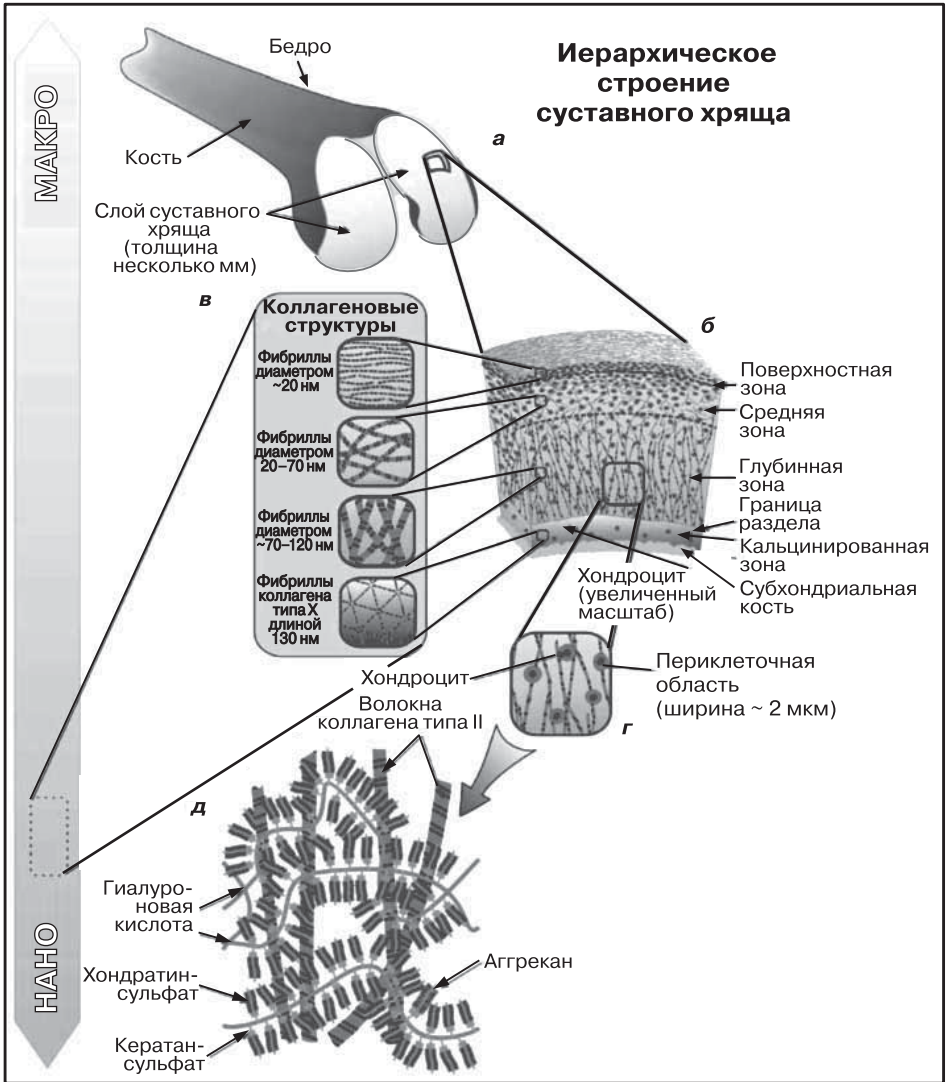


Рис. 9.2. Иерархия организации суставных хрящей. Суставной хрящ представляет собой износостойкую и выдерживающую большие нагрузки поверхность, которая покрывает кость в синовиальном соединении (а). Поверхность состоит из нескольких зон (б) с различной структурой коллагенов между зонами (в). Хондроциты (хрящевые клетки) заключены в периклеточные области (г), окруженные хорошо выделенными матрицами, наноструктура которых составлена из суперагрегатов (агреган/гиалуроновая кислота) и сеток макрофибриллярного коллагена (д)

Средняя зона — промежуточная, в ней тангенциальная ориентация волокон постепенно меняется на радиальную, присущую следующей, глубинной зоне, чьи клетки отличаются округлой формой и пониженной плотностью по сравнению с таковыми в поверхностной зоне [85, 86]. ВКМ глубинной области отличается высоким содержанием агреккана, а коллагеновые волокна характеризуются большим диаметром, неупорядоченным расположением и рыхлостью [84, 86, 87].

Волокна глубинной зоны, диаметром 70–120 нм, ориентированы перпендикулярно к поверхности субхондриальной кости [83]. Высокая сопротивляемость хрящевых тканей к сжатию объясняется давлением набухания в гидрированных агрегатах агреккана и гиалурона, связанных с пористыми структурами коллагенов типа II. Процесс набухания ограничивается возможностями коллагеновой сетки, причем движение суставов способствует перемещению питательных веществ в данной структуре [24].

Кальцинированная зона — промежуточная область между собственно хрящами и расположенной под ними костной тканью. Остающиеся в этой зоне хондроциты характеризуются гипертрофированным фенотипом. Они выделяют шестиугольные «плитки» из коллагенов типа X, способствующие кальцинированию ВКМ [83].

Отметим, что внутри различных зон хондроциты окружены периферическим 2-микрометровым слоем, структура которого отличается от основной структуры матрицы [83], так как на периферии концентрируются коллагены типа VI и декорин, образующие сетку из микроволокон. В ее состав могут входить и располагающиеся на поверхности клетки молекулы протеогликана, образующие перекрестные сшивки с другими компонентами ВКМ и тем самым присоединяющие поверхность клеток к структуре матрицы.

9.3. Разномасштабная карта взаимодействий в системе клетка–ВКМ

Помимо описанной выше поддержки структурной и функциональной работы клеток и создаваемых из них биологических тканей, ВКМ также управляет некоторыми регуляторными тканевыми механизмами. Иерархическая структура внеклеточного матрикса содержит множество элементов, регулирующих информационное управление, (рис. 9.3), где система взаимодействий представлена в виде нескольких разномасштабных схем. Информация внутри схем передается так называемыми сигнальными градиентами состояния, что математически описывается дифференциальными уравнениями для концентраций различных компонентов ВКМ. Градиенты распределения сигнальных молекул воспринимаются поверхностными рецепторами клеток, которые инициируют пространственно направленные реакции на возникающие воздействия. Такое регулирование требует двухстороннего обмена информацией между клетками и ВКМ, обеспечивающего локальные изменения микроокружения, которые возникают в процессе динамического обмена информацией. Представленная на

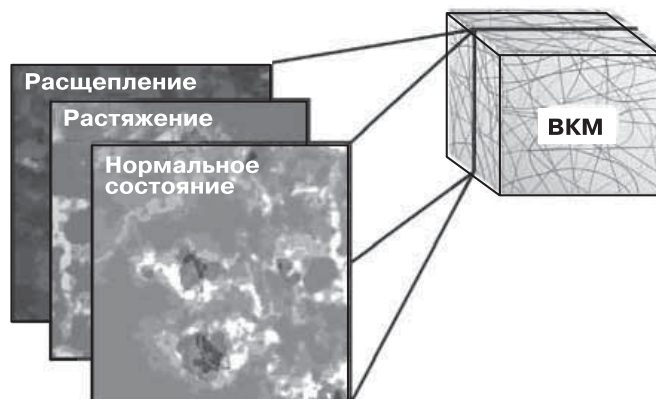


Рис. 9.3. Многомерные изображения строения ВКМ, демонстрирующие реакции клеток на различные внешние воздействия за счет изменения градиентов сигнальных молекул. На отдельных плоскостях показаны градиенты распределения сигнальных или связывающих молекул при соответствующих воздействиях (например, при растяжении или при протеолитическом расщеплении). Такие изображения можно назвать картами поведения ВКМ. (Модифицированный рисунок из работы [7], перепечатывается с разрешения AAAS.)

рис. 9.3 карта показывает различные варианты поведения системы, которые зависят от внешних воздействий и типов клеток, воспринимающих информацию.

9.3.1. Сигнальные градиенты

Для работы клетки как единого целого в системе управления должен существовать какой-то механизм, подающий химические сигналы в необходимое время. Эта достаточно сложная задача решается в ВКМ поступлением согласованных в пространстве и во времени сигналов из разных источников. Для этого клетки каждого вида создают собственную сеть из белков, «подобранных» таким образом, что их конформация позволяет решать структурные и информационные задачи, связанные с определенным типом микроокружения ВКМ. Трехмерная структура различных составляющих ВКМ позволяет регулировать множество сигналов, возникающих в результате существования локальных градиентов распределения биохимических составляющих или механических нагрузок. Взаимодействие ВКМ и клетки может передавать в последнюю информацию о состоянии микроокружения: химически это осуществляется растворимыми и нерастворимыми эффекторами, а физически — посредством соответствующих структурных или механических внутриклеточных перестроек. Механизмы установления градиентов сигнальных молекул во внеклеточном матриксе связаны с депонированием его составляющих и поэтому могут быть основаны на удалении молекул-эффекторов из клетки, а также с изменением

концентрации веществ в локальном микроокружении. Авторегулирование данных механизмов происходит за счет постепенного повышения уровней управления, что позволяет непрерывно сохранять гомеостаз между реструктурированием ВКМ и выделением сигнальных молекул при морфогенезе или перестройке тканей.

Поведение клетки обычно определяется многими внешними причинами (рис. 9.4), основными из которых являются растворимые вещества-факторы, взаимодействия компонентов ВКМ, наличие различных напряжений в микроокружении и межклеточные взаимодействия [88]. Модуляция и представление перечисленных факторов в локальном микроокружении ВКМ одинаково важны для управления внешними сигналами, однако в этой главе мы сосредоточимся на факторах, непосредственно связанных со структурами матрикса.

9.3.2. Растворимые вещества-факторы

Выделяемые клетками растворимые вещества-факторы (см. рис. 9.4) поступают внутрь ВКМ и тормозят каскады реакций, по которым обычно передаются сигналы от общих рецепторов. Модуляция клеточной активности растворимыми факторами достаточно сложна, поскольку здесь требуется не только наличие самих факторов, но и определенное сочетание времени, концентраций и соотношения концентраций. Молекулы, выделяемые клеткой, способны диффундировать на довольно большие расстояния, что заметно снижает их концентрацию и действие [89]. Механизмы воздействия могут включать выделение молекул в неактивной форме, например фактора трансформации роста TFG-бета, который активизируется только на некоторых выделенных сайтах [90], и могут определяться наличием некоторых кофакторов, например, гепарансульфата, для активизации соответствующего рецептора [57] или локализации определенных эффекторов типа Ca^{2+} для связывания компонентов матрикса [91]. При этом между составляющими ВКМ и растворимыми факторами могут возникать прямые или косвенные связи. Так, реакции между гликозамингликанами и протеогликанами приводят к динамическому росту концентрации сигнальных молекул [88]. При описываемых взаимодействиях ВКМ и растворимых факторов часто возникает синергизм, вследствие этого адгезионная способность клеток может усиливаться в ходе автофосфорилирования рецепторов EGF за счет присоединения некоторых лигандов [92]. В целом модуляция клеточной активности зависит от пространственного и временного распределения множества растворимых молекул, факторов роста и т. п.

9.3.3. Факторы роста

Факторы роста — особые полипептиды, связанные с поверхностными рецепторами клетки и «запускающие» прохождение сигналов по внутриклеточным путям передачи информации [12]. Связь факторов роста со структурами ВКМ создает механизмы, регулирующие как активность самих факторов роста, так

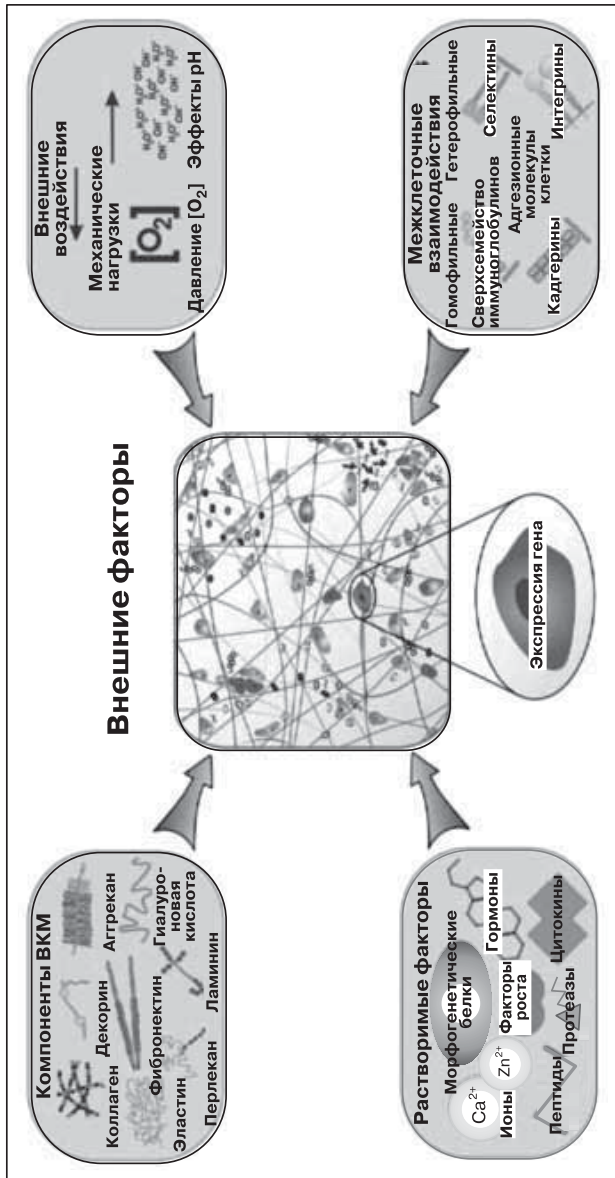


Рис. 9.4. Внешние факторы, влияющие на поведение клеток. Поведение клетки регулируется внешними сигналами, поступающими из четырех основных источников в микроокружении: наличие в среде растворимых факторов и молекул, компоненты ВКМ, внешние нагрузки и межклеточные взаимодействия (т. е. взаимодействия типа клетка–клетка). К растворимым факторам относятся факторы роста, цитокины, морфогенетические белки, пептиды, гормоны, протеазы и ионы. Компоненты ВКМ включают в себя белки, гликозамингликаны, протеогликаны и гликопротеины. Внешними воздействиями могут быть механические нагрузки (динамические или статические), повышенное давление кислорода и влияние pH. Межклеточные взаимодействия бывают гомофильные или гетерофильные, а их протекание регулируется клеточными адгезионными молекулами. Все внешние факторы оказывают существенное воздействие на экспрессию гена и поведение клетки в целом (влияя, в свою очередь, на динамические свойства микроокружения клетки), что в совокупности определяет развитие и функционирование биологической ткани

и создание сигнальных градиентов, необходимых для синтеза клеточной матрицы. Ее строение ограничивает или предотвращает диффузию, разрушающую хранимую информацию, вследствие чего взаимодействия в системе ВКМ–фактор роста позволяют «сохранять» в клетке огромное число готовых к работе информационных сигналов [93]. Кроме того, процессы связывания в данной системе предоставляют возможность передачи сигналов к клеткам ближайшего окружения, что является важным аспектом при формировании сложных клеточных структур.

Не все образующиеся внутри матрицы факторы роста сразу проявляют активность, некоторые из них остаются в пассивном состоянии. Иногда фактор роста длительное время «скрыт» внутри матрицы и его действие проявляется лишь при распаде ВКМ или движении клетки. Например, фактор роста васкулярного эндотелия выделяется и активизируется только в присутствии металлопротеиназы ММР-9 [95]. Биологическая активность клетки также может подавляться «гашением» противоположно направленных сигналов. Скажем, при ангиогенезе роль антиангиогенных факторов преобладает вплоть до момента выделения протеиназ из ВКМ [96–100]. Кроме того, латентность факторов роста иногда обусловлена слабой биологической активностью, в результате, например, фактор роста TGF-бета может выделяться большинством клеток только в виде «скрытых» комплексов, и поэтому его действие долго не проявляется в реакциях с соответствующими рецепторами, вплоть до активации, например, протеолиза [101].

Активность факторов роста контролируется в основном двумя механизмами — выделением из ВКМ и активацией. Выделение означает диссоциацию факторов роста из сайтов связывания с матрицей, а активация представляет собой диссоциацию факторов роста из бездействующих, так называемых дремлющих белков, или индукцию при конформационных превращениях, что дает возможность факторам роста связываться с рецепторами [93]. Выделение биологически активных факторов роста из ВКМ может также происходить под действием протеолитических ферментов. Например, локализованные на поверхности клетки матриксные металлопротеиназы, ММР-9 и ММР-2, выделяют и активизируют фактор роста TGF-бета за счет протеолитического расщепления латентных форм [102], причем протеолитическое выделение и активация данных факторов приводят к быстрой передаче локальных сигналов. Протеолитическая модуляция сигналов при этом происходит быстрее, чем регулирование генной экспрессии [93].

9.3.4. Компоненты ВКМ

В качестве пространственных и временных «ориентиров» прохождения разнообразных клеточных сигналов выступают компоненты ВКМ. Как было описано выше, клетки вместе с микроокружением мигрируют внутри развивающейся биологической ткани, и наличие ориентиров позволяет им необходимым образом организовывать свое поведение за счет экспрессии генов. Именно так

создается обратная связь, позволяющая клеткам реагировать на изменения среды ВКМ, выделяя соответствующие компоненты внеклеточного матрикса и/или протеазы. Сборка компонентов ВКМ зависит как от стадии развития клеток, так и от тканевой специфичности, что требует очень точного взаимодействия клеток с поступающими из микроокружения сигналами. Для компонентов ВКМ такие сигналы создаются молекулярной структурой за счет многочисленных связывающих доменов, открыто возникающих на поверхности белка или скрытых в топографии поверхности.

9.3.4.1. Связывающие домены

На ВКМ происходит экспрессия многих белков, создающих связывающие центры или домены для взаимодействий клетки с поверхностными рецепторами других клеток. Эти взаимодействия прямо или косвенно обеспечивают важнейшие механизмы поведения клеток: адгезию, миграцию, пролиферацию, дифференциацию и апоптоз. Например, рецепторы на поверхности клеток интегрина альфа5-бета1 могут непосредственно связываться с RGD-сайтами фибронектина [103], а тенаascin косвенно влияет на клеточную адгезию, взаимодействуя с фибронектином [104]. При изучении различных клеточных реакций была обнаружена пространственная близость связывающих доменов и регулярность их расположения. Установлено, что миграция фибробластов зависит от средней плотности поверхностных сайтов, а скорость движения клеток определяется пространственным распределением RGD-сайтов и влияет на адгезию [105]. Формирование клеточного отклика может происходить и за счет совместной локализации связывающих сайтов, в результате проявляется их синергетическое действие. Например, выяснилось, что синергетический сайт Pro-His-Ser-Arg-Asn (PHSRN) в центральном домене адгезии клеток фибронектина, не обладающий собственной биологической активностью, может играть важную роль в адгезии клеток при участии поверхностного рецептора интегрина — альфа5-бета1, если последний ассоциирован с RGD-сайтом [106]. Заметим, что в нативной конформации фибронектина расстояние между сайтами PHSRN и RGD составляет примерно 4 нм [107].

9.3.4.2. Замаскированные сайты

Эти сайты названы так потому, что многие связывающие домены часто скрыты или замаскированы внутри структуры ВКМ из-за фолдинга белков, в результате домены не могут попасть на белковую поверхность клетки (рис. 9.5) [31, 108, 109]. Активация этих сайтов происходит после структурной модификации молекул ВКМ при конформационных превращениях или протеолиза. Конформационные изменения могут возникать из-за механических воздействий и/или связывания с другими молекулами ВКМ и рецепторами клеточных мембран, а протеолитическое расщепление происходит при деградации ВКМ в результате перестройки или аналогичных процессов. Например, вследствие конформационных превращений при аллостерическом связывании раскрываются некоторые сайты, связывающие тенаascin [110], в результате изменяется способность

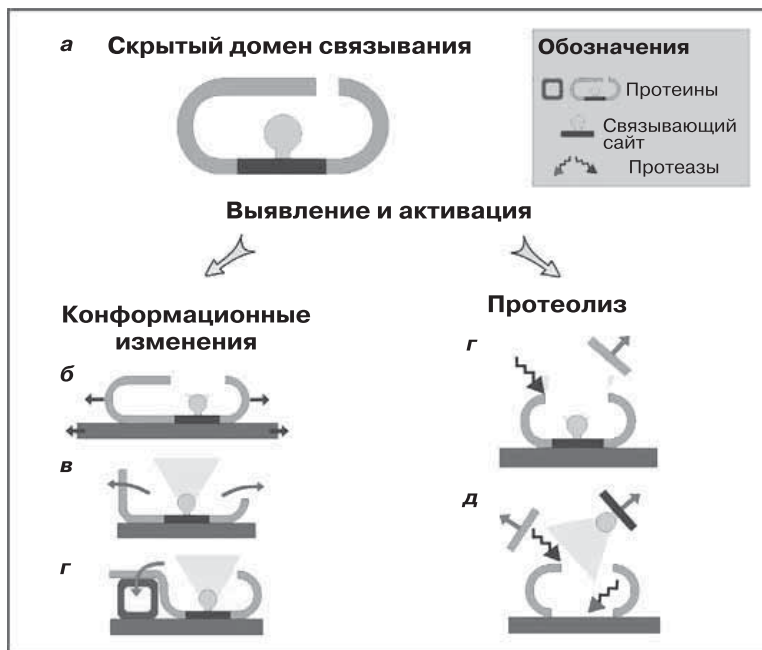


Рис. 9.5. Механизмы выявления скрытых (замаскированных) сайтов:

а — белковая структура, «закодированная» в скрытом домене. Такие домены могут проявляться в результате изменений конформации, связанных с механическим воздействием (*б*); адсорбцией молекул на поверхности (*в*); взаимодействием с другими белками (*з*), а также с протеолитическим расщеплением, которое либо открывает домены (*д*), либо высвобождает их фрагменты, способные к передаче сигналов к локальному микроокружению (*е*). (Модифицированный рисунок из работы [7], перепечатывается с разрешения AAAS)

фибронектина к адгезии клеток, что существенно меняет поведение всей системы. Аналогично, возникающие при протеолизе фрагменты неколлагеновых доменов NC1 от коллагенов базальных мембран типа IV, XV и XVIII могут затем проявляться как регуляторы биологической активности, например, при ангиогенезе [111]. Пространственно-временные распределения замаскированных доменов очень сильно зависят от состава компонентов молекул ВКМ и механических напряжений, а также от сборки структуры ВКМ и ее внутреннего строения.

9.3.4.3. Химия приповерхностного слоя ВКМ

Компоненты ВКМ могут выступать в качестве подложки или субстрата для сигнальных лигандов. Есть много маршрутов передачи химических сигналов, по которым клетки получают информацию относительно состояния поверхностей, с которыми они вступают в контакт. Наличие таких маршрутов требует сложной иерархии взаимодействия сигнальных молекул [69]. Чувствитель-

ность ВКМ к микроокружению создается многими сигнальными лигандами, находящимися в приповерхностном слое, а избирательность действия выделяемых клеткой белков ВКМ проявляется за счет конформационных превращений, меняющих химическое сродство к связыванию соответствующих рецепторов. Например, в работе [112] обнаружили корреляцию между специфической способностью связывания интегрин адсорбированным фибронектином и химическим составом приповерхностного слоя. Специфичность проявляется в том, что конформация фибронектина изменяется особым образом: смещается равновесие между одновременно протекающими процессами связывания различных форм интегрин, в результате на поверхности преобладают соединения с концевыми группами OH и NH₂ с избирательным сродством к связыванию определенных интегрин типа альфа5-бета1. В то же время поверхностные концевые группы COOH и CH₃ могут одинаково успешно связывать интегрин двух типов: альфа5-бета1 и альфа5-бета3. Установлено, что поверхности с концевыми группами OH и NH₂ обеспечивают положительную обратную связь, т. е. усиление некоторых процессов, например экспрессию генов, специфическую к остеообластам, ферментативную активность щелочной фосфатазы и минерализацию матрицы. Таким образом, различия в способности поверхностей связывать интегрин позволяют клеткам эффективно модулировать экспрессию генов, а также изменять собственную структуру и функциональные особенности.

9.3.4.4. Топография

Поведение клеток определяется не только молекулярным строением поверхности, но и ее топографией. Зависимость свойств растущих клеток от топографии поверхности культивирования была давно отмечена в литературе и даже получила название «топографическая реакция» [113]. В последние годы топографические реакции были изучены в нанометрическом масштабе, т. е. при размерах подложки, характерных для особенностей нативных ВКМ. В рассматриваемом нами контексте ВКМ фактически представляют собой трехмерные структуры со сложной топографией поверхности, важные детали которой имеют характерные нанометрические особенности. К ним относятся связывающие поры, волокна диаметром 10–300 нм и гребни на плоскости роста.

С топографией поверхности тесно связаны ориентация, адгезия и подвижность клеток, а также морфологические изменения в микро- и наноструктурах, обусловленные активацией тирозин-киназ, цитоскелетной конденсацией и модуляцией экспрессии генов [113]. Поведение клеток при наличии топографических особенностей зависит не только от размеров деталей поверхности, которые находятся в диапазоне от нанометров до микрометров, но и от изменений размера структур и их симметрии [114]. Обычно во внеклеточном матриксе есть множество упорядоченных структур, образованных, например, высокоупорядоченными ленточными формированиями с периодом повторяемости 67 нм, возникающими из параллельных волокон фибрилл коллагена [115]. В некоторых случаях, скажем в ВКМ сухожилий, такие структуры представляют

собой линейно ориентированные волокна коллагена [42]. Есть предположение, что проявления топологии или симметрии клеток связаны с возникновением межклеточных поверхностных сил, под воздействием которых составляющие ВКМ начинают объединяться в наноструктуры [116]. Например, трехмерная организация окружения ВКМ влияет на морфологию клеток и их адгезию, а они, в свою очередь, воздействуют на экспрессию генов и изменяют экспрессию интегринов, которые являются регуляторами выживания клеток [117, 118]. По-видимому, клетки с характерными наномасштабными особенностями могут полностью проявить свой фенотип и естественное поведение в результате полной «развертки» связанной с ними нановолоконной матрицы.

Наномасштабность структур ВКМ подразумевает значительно большую область его поверхности, чем в случае микроструктур. Специфическое, обусловленное именно наноструктурой увеличение общей площади ВКМ приводит к усилению ее способности к связыванию и передаче сигнальных молекул, а также к росту числа центров взаимодействия между матрицей и поверхностными рецепторами клетки. Кроме того, увеличение площади и повышение пористости поверхности усиливают процессы диффузии и активного транспорта компонентов.

Топографические особенности имеют важное биологическое значение, так как компоненты ВКМ с особыми топографическими характеристиками, способны к управлению поведением клетки посредством системы внутриклеточных сигнальных маршрутов лиганд–рецептор–медиатор [31].

9.3.5. Механические напряжения в окружении матрикса

Расположенная внутри ВКМ клетка постоянно получает сигналы механического сжимающего действия от соседних клеток, например при сжатии, контрактуре, обусловленной актомиозином, или от иных механических факторов — от воздействия сдвиговых напряжений, возникающих в системе кровообращения и др. [119]. Такие механические сигналы на поверхности раздела клетка–ВКМ приводят к двунаправленной трансдукции, определяющей экспрессию генов и белков [120]. Процессы преобразования механических напряжений в биохимические сигналы, участвующие в клеточном отклике, называются механотрансдукцией. Именно механотрансдукция доминирует в широком диапазоне размеров наноструктур — от макромолекулярных до молекулярных [3, 121]. При этом передача внешних нагрузок через клеточный объем по внутренним сигнальным маршрутам требует высокой координации действий молекул, входящих в состав ВКМ, поверхностных рецепторов клетки и ее цитоскелета. Преобразование механических напряжений в дискретные сигналы основано на молекулярных свойствах контактов клетка–ВКМ, обычно называемых адгезионными комплексами. Приложение внешних или внутренних сил к этим комплексам резко изменяет их строение, так как составляющие комплексов возникают лишь при определенных значениях физических нагрузок и разрушаются при релаксации, иными словами, регулируемые адгезией сигнальные системы обладают триггерным эффектом, где важную роль играют поверхностные клеточные рецепторы.

9.3.6. Поверхностные рецепторы клетки

Элементы ВКМ «распознаются» разнообразными поверхностными рецепторами, и прежде всего к ним относятся трансмембранные гликопротеины [122, 123], протеогликианы [124] и гликолипиды. Рецепторы создают внутри ВКМ множество структурных и информационных «подсказок», способствующих дальнейшему протеканию процессов, а также обеспечивают прямое и косвенное управление разнообразными функциями клеток: адгезией, миграцией, дифференцированием, пролиферацией, экспрессией генов и апоптозом. Наиболее важными молекулами, располагающимися на поверхности клеток, являются интегрины трансмембранных рецепторов, играющие главную роль в управлении системой клетка–ВКМ.

9.3.6.1. Интегрины

Интегрины — гетеродимерные трансмембранные молекулы, состоящие из альфа- и бета-субъединиц, способных опознавать и связывать специфические лиганды ВКМ [125]. Субъединицы обычно представлены несколькими изоформами и крупными внеклеточными доменами, включающими в себя трансмембранные сегменты и короткие внутриклеточные «хвосты». Специфичность субъединиц по отношению к связыванию интегринов определяется комбинацией видов и изоформ, однако следует отметить, что один и тот же интегрин может взаимодействовать с несколькими типами лигандов и наоборот — многие лиганды распознаются разными интегринными [126]. Предполагается, что интегрины, помимо присоединения через посредника к определенным белкам ВКМ, выполняют несколько сигнальных функций. К настоящему времени уже идентифицировано более 24 интегриновых рецепторов, для которых описаны взаимодействия с компонентами ВКМ или другими клетками [127].

9.3.6.2. Адгезия клеток и адгезионные комплексы

Связывание лигандов внеклеточными доменами интегрин приводит к конформационным изменениям рецепторов [128] и кластеризации самого интегрин, что, в свою очередь, инициирует внутриклеточную передачу сигналов, управляющую образованием адгезионных комплексов. Процессы адгезии с участием интегрин как посредника могут проявляться по-разному: возникновением фокальных центров или комплексов и фибриллярной адгезией [129]. При этом адгезионные комплексы, связанные с актиновым цитоскелетом внутри клетки, играют важную роль в управлении процессами выживания клеток [130]. Сборка данных комплексов протекает в определенном порядке, что указывает на ее иерархический характер и наличие некоего механизма обратной связи с клетками, при котором увеличение или уменьшение экспрессии белка на цитоскелете приводит к пространственным перегруппировкам рецепторов и лигандов.

9.3.6.3. Передача сигналов интегринными

Интегрины способны выступать как триггеры или запускающие механизмы во многих внутриклеточных каскадах сигнальных реакций, например активиза-

ции GTP-аз семейства Rho и липидных киназ [129, 131, 132]. Реакции сигнальной трансдукции очень сложны и пока недостаточно описаны, однако часто в них регистрируют передачу потоков информации между ВКМ, цитоскелетом и ядрами клеток [4]. В описанных системах интегрины также оказывают влияние на жизненный цикл клеток, их выживание и экспрессию генов [122, 131, 133]. Например, выяснено, что рецепторы фибронектина — интегрины типа альфа5-бета1 способны предотвращать гибель клеток при апоптозе, стимулируя каскад реакций В-клеток лимфомы 2 и «включая» экспрессию анти-апоптозного белка Bcl-2 [134].

Есть много сигнальных молекул для нативных сайтов адгезии, которые вовлекаются в сигнальные каскады реакций для факторов роста и цитокинов, что предполагает некоторое «перекрывание» путей реакций. Поэтому изучение взаимодействий между растворимыми молекулами-посредниками и интегринными очень часто позволяет получать лишь обобщенную информацию о микроокружении клеток, их поведении и выживании, поскольку некоторые рецепторы «искажают» влияние других. Например, известно, что активируемые интегрином EGF-рецепторы способны усиливать сигналы интегринного, но в случае отсутствия лигандов у EGF-рецепторов, те же интегрины могут индуцировать фосфорилирование тирозина данных рецепторов, создавая «обратные» сигналы, приводящие к фосфорилированию Sch и активированию MAP-киназы [135]. Описываемые процессы активации очень важны не только для создания «мембранных якорей» или точек фиксации, но и для выживания клеток, так как они предотвращают апоптоз. Таким образом, рецепторы адгезии и растворимых медиаторов должны рассматриваться как элементы некоторой общей системы, где интегрины передают пространственные сигналы, создаваемые матрицей вместе с растворимыми медиаторами.

9.3.7. Управляемая активность клеток. Реструктурирование ВКМ

Регулирование клеточного поведения матрикса — сложный процесс, протекающий под действием противоположно направленных сигналов между ВКМ и клетками. Посредством связанных с рецепторами растворимых сигнальных молекул, внеклеточный матрикс способен посылать сигналы клеткам, находящимся в состоянии миграции, пролиферации и дифференциации.

Реструктурирование ВКМ играет очень важную роль в развитии, гомеостазе и репарации клеток. Процессы, связанные с реструктурированием, очень сложны, поскольку в них участвует много ферментов и ингибиторов. При этом сама ВКМ непрерывно изменяется под действием различных внутренних и внешних стимулов и раздражителей. Постоянные изменения микроокружения матрицы позволяют клеткам производить необходимые перемещения, пролиферацию или дифференциацию. Хотя различные стимулы приводят к разнообразным структурным и функциональным изменениям, некоторые ключевые механические особенности — синтез и осаждение компонентов ВКМ и протеолиз —

остаются общими для всех процессов реструктурирования тканей [136]. В них обычно участвуют различные протеазы, в основном из семейства матриксных металлопротеиназ (МПП).

В механизмы активации и работы функциональных доменов вовлечены секретированные или полученные путем трансмембранного переноса зимогены или проферменты, представляющие собой ферменты деградации ВКМ [137]. Зимогены принято разделять на группы: коллагеназы, желатиназы, стромелизины и матрилизины, однако такое деление в некоторой степени перекрывается со специфичностью МПП. Активность зимогенов зависит от транскрипции и активации проферментов или подавления ферментативной активности ингибиторами [138]. Активация в основном происходит внутри клеток [139] с участием многих факторов роста и цитокинов, а также физических взаимодействий с самой клеткой, что может усиливать или подавлять транскрипцию генов металлопротеиназы [140]. Например, одним из механизмов регулирования активности МПП является их локализация на поверхности клетки, так как предполагают, что ассоциация МПП с поверхностью — необходимое условие их оптимального функционирования. В работе [141] было показано, что МПП, сосредоточенные на поверхности, утрачивают протеолитическую активность при экспрессии в форме секретов клетки. В сущности, такое поведение создает для клетки некоторые дополнительные механизмы защиты от деградации.

Воздействие МПП на поведение клеток связано с регулированием клеточной адгезии, которая протекает по нескольким механизмам. К ним относятся изменение структуры ВКМ, выделение и активация растворимых сигнальных молекул и (или) активация (деактивация) поверхностных рецепторов клетки. Например, происходящая при реструктурировании протеолитическая деградация одновременно способствует внутриклеточной инвазии, так как при этом разрушаются структурные барьеры ВКМ. Протеолитическая активность также может влиять на способность клеток к перемещению, поскольку реструктурирование матрикса приводит к динамической экспозиции скрытых сайтов, ранее не распознаваемых клеточными рецепторами. В работе [142] обнаружено, что расщепление ламинина-5 под воздействием МПП-2 приводит к выявлению замаскированных фрагментов в виде сайтов, связанных с интегрином. Также выяснилось, что разрыв ВКМ под воздействием МПП может индуцировать апоптоз в так называемых заякоренных (т. е. связанных с поверхностью культивирования) клетках, что важно при физиологической гибели тканей [143].

Происходящие при реструктурировании события могут даже потенциально регулировать фенотип клетки, причем не прямым влиянием на взаимодействия в системе клетка–ВКМ, а изменением доступности факторов роста. Протеазы способны регулировать дифференциацию клеток, воздействуя на мобильность и (или) активность факторов роста, в результате, например, связывание TGF-бета с декорином позволяет последнему выступать в качестве «резервуара» факторов роста. В ходе деградации под влиянием различных МПП соединения TGF-бета проявляют присущие им биологические функции: вызывают дифференциацию клеток или подавляют экспрессию МПП и т.п. [144]. Для про-

текания данных процессов необходима обратная связь, поэтому реакции с участием МПМ и выделением TGF-бета должны одновременно ограничивать дальнейшую экспрессию МПМ и, следовательно, выделение TGF-бета [138].

9.4. Заключение

Результаты последних достижений в исследовании структур ВКМ и взаимодействий в системе клетка–ВКМ позволяют оценить разнообразие и важность свойств ВКМ в процессах развития и физиологического функционирования клеток. Особое значение имеет способность ВКМ быть источником сигнальных «реплик», обеспечивающих реакции клеток на экспрессию генов и межклеточную адгезию.

Основное достижение в области исследования ВКМ — выявление, определение и классификация большого числа компонентов, структурных составляющих и связывающих доменов. Установлено, что многие компоненты участвуют в отклике клеток на давление эволюционного процесса, позволяя организмам функционировать в сложных условиях. Особую ценность представляет не только идентификация составляющих ВКМ, но и определение и описание входящих в ее состав белковых доменов, каждый из которых, по-видимому, способен быть посредником во взаимодействиях с клетками или другими макромолекулами.

Несмотря на достигнутые успехи, наука еще очень далека от полного понимания многих динамических механизмов, в соответствии с которыми клетка вырабатывает информацию, необходимую для отклика на изменения локального микроокружения. Описание данных механизмов осложняется присутствием большого числа скрытых особенностей структуры, разнообразием типов поверхностных клеточных рецепторов и недостаточно изученными путями прохождения внутриклеточных сигналов. В приведенных публикациях большое внимание уделялось изучению интегринсодержащих рецепторов на поверхности клеток и их взаимодействиям. Отметим, что роль рецепторов других типов остается невыясненной.

Исследование биологических свойств ВКМ имеет важное значение для тканевой инженерии и создания биомедицинских наноструктур. Изучение разнообразных взаимодействий в системе клетка–матрица на макро- и наноуровнях позволит в будущем создавать наноструктурные биокомпозиты, а также регулировать прохождение внутриклеточных сигналов. Задача исследователей состоит в достижении уровня сложности системы, требуемого для нормального функционирования ВКМ в природных тканях. Ее можно решать только объединением усилий биологии и нанотехнологий, изучением методов молекулярной самосборки, применением рекомбинантных ДНК и т. п. Тогда будут созданы материалы, которые достигнут или даже превзойдут природные биологические ткани по способности к трехмерной передаче молекулярной и структурной информации.

Благодарности

Авторы благодарят проф. Гэвина Джелла за его конструктивные замечания и выражают свою признательность Институту биоинженерии (Королевский колледж Лондона) и Канадский совет по естественным и техническим наукам (NSERC) за оказание финансовой поддержки.

Литература

1. Lukashev M.E., Werb Z. ECM signalling: orchestrating cell behaviour and misbehaviour. *Trends Cell Biol.* 1998; 8: 437–441.
2. Aumailley Mand Gayraud B. Structure and biological activity of the extracellular matrix. *J. Mol. Med.* 1998; 76: 253–265.
3. Pizzo A.M., Kokini K., Vaughn L.C., Waisner B.Z., Voytk-Harbin S.L. Extracellular matrix (ECM) microstructural composition regulates local cell–ECM biomechanics and fundamental fibroblast behavior: a multidimensional perspective. *J. Appl. Physiol.* 2005; 98: 1909–1921.
4. Roskelley C.D., Srebrow A., Bissell M.J. A hierarchy of ECM-mediated signaling regulates tissue-specific gene expression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1995; 7: 736–747.
5. Wallner E.I., Yang Q., Peterson D.R., Wada J., Kanwar Y.S. Relevance of extracellular matrix, its receptors, and cell adhesion molecules in mammalian nephrogenesis. *Am. J. Physiol.* 1998; 275: 467–477.
6. Zagris N. Extracellular matrix in development of the early embryo. *Micron* 2001; 32: 427–438.
7. Stevens M.M., George J.H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* 2005; 310: 1135–1138.
8. Provenzano P.P., Vanderby R. Jr. Collagen fibril morphology and organization: implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biol.* 2006; 25: 71–84.
9. Ayad S., Boot-Handford R., Humphries M.J., Kadler K.E., Shuttleworth A. *The Extracellular Matrix Facts Book.* Academic Press; London: 2004; 1–163.
10. Kolkman J.A., Stemmer W.P. Directed evolution of proteins by exon shuffling. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: 423–428.
11. Gerhart J., Kirschner M. *Conditionality and Compartmentalization. Cells, Embryos and Evolution: Toward a Cellular and Developmental Understanding of Phenotypic Variation and Evolutionary Adaptability.* Blackwell Science; Malden: 1997; 238–295.
12. Alberts B., et al. *Molecular Biology of the Cell.* Garland Science; N–Y: 2002; 1–1463.
13. Myllyharju J., Kivirikko K.I. Collagens and collagen-related diseases. *Ann. Med.* 2001; 33: 7–21.
14. Reichardt L.F. Extracellular matrix molecules introduction. In: Kreis T., Vale R., editors. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins.* 2-nd ed. Oxford University Press: N–Y; 1999. 335–344.
15. Aszodi A., Bateman J.F., Gustafsson E., Boot-Handford R., Fassler R. Mammalian skeletogenesis and extracellular matrix: what can we learn from knockout mice? *Cell Struct. Funct.* 2000; 25: 73–84.
16. Brooke B.S., Karnik S.K., Li D.Y. Extracellular matrix in vascular morphogenesis and disease: structure versus signal. *Trends Cell Biol.* 2003; 13: 51–56.
17. Behonick D.J., Werb Z. A. Bit of give and take: the relationship between the extracellular matrix and the developing chondrocyte. *Mech. Dev.* 2003; 120: 1327–1336.

18. Toole B. Pand., Linsenmayer T.F. Newer knowledge of skeletogenesis: macromolecular transitions in the extracellular matrix. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 1977; 258–278.
19. Erlebacher A., Filvaroff E.H., Gitelman S.E., Derynck R. Toward a molecular understanding of skeletal development. *Cell* 1995; 80: 371–378.
20. Hall B.K., Miyake T. All for one and one for all: condensations and the initiation of skeletal development. *Bioassays* 2000; 22: 138–147.
21. Karsenty G., Wagner E.F. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. *Dev. Cell* 2002; 2: 389–406.
22. Leipzig N.D., Athanasiou K.A. Cartilage Regeneration. In: Wnek G., Bowlin G.L., editors. *Encyclopedia of Biomaterials and Biomedical Engineering*. Marcell Dekker, Inc.; N–Y: 2004. 283–291.
23. Knudson C.B., Knudson W. Cartilage Proteoglycans. *Semin. Cell Dev. Biol.* 2001; 12: 69–78.
24. Dudhia J. Aggrecan, aging and assembly in articular cartilage. *Cell Mol. Life Sci.* 2005; 62: 2241–2256.
25. Faury G. Function–structure relationship of elastic arteries in evolution: from microfibrils to elastin and elastic fibres. *Pathol. Biol. (Paris)* 2001; 49: 310–325.
26. Raines E.W. The Extracellular matrix can regulate vascular cell migration, proliferation, and survival: relationships to vascular disease. *Int. J. Exp. Pathol.* 2000; 81: 173–182.
27. Handford P.A., Downing A.K., Reinhardt D.P., Sakai L.Y. Fibrill: from domain structure to supramolecular assembly. *Matrix Biol* 2000; 19: 457–470.
28. Reinhardt D.P., Chalberg S.C., Sakai L.Y. The structure and function of fibrillin. *Ciba Found Symp.* 1995; 192: 128–143.
29. Rosenbloom J., Abrams W.R., Mecham R. Extracellular matrix 4: the elastic fiber. *FASEB J.* 1993; 7: 1208–1218.
30. Van der Rest M., Garrone R. Collagen family of proteins. *FASEB J.* 1991; 5: 2814–2823.
31. Abrams G.A., Goodman S.L., Nealey P.F., Franco M., Murphy C.J. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res.* 2000; 299: 39–46.
32. Myllyharju J., Kivirikko K.I. Collagens, modifying enzymes and their mutations in humans, flies and worms. *Trends Genet.* 2004; 20: 33–43.
33. Kietly C.M., Grant M.E. The collagen family: structure, assembly, and organization in the extracellular matrix. In: Royce PM, Steinmann B, editors. *Connective tissue and its heritable disorders*. 2-nd ed., N–Y: Wiley–Liss; 2002; 159–221.
34. Exposito J.Y., Cluzel C., Garrone R., Lethias C. Evolution of collagens. *Anat. Rec.* 2002; 268: 302–316.
35. Ricard-Blum S., Ruggiero F. The collagen superfamily: from the extracellular matrix to the cell membrane. *Pathol. Biol. (Paris)* 2005; 53: 430–442.
36. Prockop D.J., Kivirikko K.I. Collagens: molecular biology, diseases, and potentials for therapy. *Annu. Rev. Biochem.* 1995; 64: 403–434.
37. Haralson M.A., Hassell J.R. The extracellular matrix – an overview. In: Haralson M.A., Hassell J.R., editors. *Extracellular Matrix: A Practical Approach*. Oxford University Press; N–Y: 1995; 1–30.
38. Lodish H., et al. Integrating cells into tissues. *Molecular Cell Biology*. 5-th ed., W.H. Freeman and Company; N–Y: 2003; 197–243.
39. Koch M., et al. A novel marker of tissue junctions, collagen XXII. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 22514–22521.
40. Pollard T.D., Earnshaw W.C. Extracellular matrix molecules. *Cell Biology*. Saunders; N–Y: 2002; 485–506.

41. Blaschke U.K., Eikenberry E.F., Hulmes D.J., Galla H.J., Bruckner P. Collagen XI nucleates self-assembly and limits lateral growth of cartilage fibrils. *J. Biol. Chem.* 2000; 275: 10370–10378.
42. Zhang G., et al. Development of tendon structure and function: regulation of collagen fibrillogenesis. *J. Musculoskelet Neuronal Interact.* 2005; 5: 5–21.
43. Kassner A., et al. Molecular structure and interaction of recombinant human type XVI collagen. *J. Mol. Biol.* 2004; 339: 835–853.
44. Kassner A., et al. Discrete integration of collagen XVI into tissue-specific collagen fibrils or beaded microfibrils. *Matrix Biol.* 2003; 22: 131–143.
45. Kuhn K. Basement membrane (type IV) collagen. *Matrix Biol.* 1995; 14: 439–445.
46. Keene D.R., Sakai L.Y., Lunstrum G.P., Morris N.P., Burgeson R.E. Type VII collagen forms an extended network of anchoring fibrils. *J. Cell Biol.* 1987; 104: 611–621.
47. Chen M., Keene D.R., Costa F.K., Tahk S.H., Woodley D.T. The carboxyl terminus of type VII collagen mediates antiparallel dimer formation and constitutes a new antigenic epitope for epidermolysis bullosa acquisita autoantibodies. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 21649–21655.
48. Franzke C.W., Bruckner P., Bruckner-Tuderman L. Collagenous transmembrane proteins: recent insights into biology and pathology. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 4005–4008.
49. Garrone R. Evolution of metazoan collagens. *Prog. Mol. Subcell Biol.* 1998; 21: 119–139.
50. Vrhovski B., Weiss A.S. Biochemistry of tropoelastin. *Eur. J. Biochem.* 1998; 258: 1–18.
51. Li B., Daggett V. Molecular basis for the extensibility of elastin. *J. Muscle Res. Cell Motil.* 2002; 23: 561–573.
52. Rodgers U.R., Weiss A.S. Cellular Interactions with Elastin. *Pathol. Biol. (Paris)* 2005; 53: 390–398.
53. Francis G., John R., Thomas J. Biosynthetic pathway of desmosines in elastin. *Biochem. J.* 1973; 136: 45–55.
54. Kielty C.M., Sherratt M.J., Shuttleworth C.A. Elastic fibres. *J. Cell Sci.* 2002; 115: 2817–2828.
55. Floquet N., et al. Structural characterization of VGVAPG, an elastin-derived peptide. *Biopolymers* 2004; 76: 266–280.
56. Senior R.M., et al. Val–Gly–Val–Ala–Pro–Gly, a repeating peptide in elastin, is chemotactic for fibroblasts and monocytes. *J. Cell Biol.* 1984; 99: 870–874.
57. Raman R., Sasisekharan V., Sasisekharan R. Structural insights into biological roles of protein–glycosaminoglycan interactions. *Chem. Biol.* 2005; 12: 267–277.
58. Taylor K.R., Gallo R.L. Glycosaminoglycans and their proteoglycans: host-associated molecular patterns for initiation and modulation of inflammation. *FASEB J.* 2006; 20: 9–22.
59. Toole B.P. Hyaluronan: from extracellular glue to pericellular cue. *Nat. Rev. Cancer* 2004; 4: 528–539.
60. Lander A.D. Extracellular matrix molecules: proteoglycans. In: Kreis T, Vale R, editors. *Guidebook to the Extracellular Matrix, Anchor, and Adhesion Proteins*. 2-nd ed. Oxford University Press; N–Y: 1999; 351–356.
61. Iozzo R.V., Murdoch A.D. Proteoglycans of the extracellular environment: clues from the gene and protein side offer novel perspectives in molecular diversity and function. *FASEB J.* 1996; 10: 598–614.
62. Iozzo R.V. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. *Annu. Rev. Biochem.* 1998; 67: 609–652.

63. Iozzo R.V., Cohen I.R., Grassel S., Murdoch A.D. The biology of perlecan: the multifaceted heparan sulphate proteoglycan of basement membranes and pericellular matrices. *Biochem. J.* 1994; 302 (Pt 3): 625–639.
64. Bhide V.M., et al. Collagen phagocytosis by fibroblasts is regulated by decorin. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 23103–23113.
65. Danielson K.G., et al. Targeted disruption of decorin leads to abnormal collagen fibril morphology and skin fragility. *J. Cell Biol.* 1997; 136: 729–743.
66. Lin X. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 2004; 131: 6009–6021.
67. Hynes R. Molecular biology of fibronectin. *Annu. Rev. Cell Biol.* 1985; 1: 67–90.
68. Leahy D.J., Aukhil I., Erickson H.P. 2.0 Å crystal structure of a four-domain segment of human fibronectin encompassing the RGD loop and synergy region. *Cell* 1996; 84: 155–164.
69. Groves J.T. Learning the chemical language of cell-surface interactions. *Sci. STKE* 2005; 2005: E 45. 70. Velling T., Risteli J., Wennerberg K., Mosher D.F., Johansson S. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11 beta-1 and alpha-2 beta-1. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 37377–37381.
70. Velling T., Risteli J., Wennerberg K., Mosher D.F., Johansson S. Polymerization of type I and III collagens is dependent on fibronectin and enhanced by integrins alpha 11 beta 1 and alpha 2 beta 1. *J. Biol Chem* 2002; 277: 37377–37381.
71. Dallas S.L., et al. Fibronectin regulates latent transforming growth factor-beta (TGF beta) by controlling matrix assembly of latent TGF beta-binding protein-1. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 18871–18880.
72. Nordahl J., Mengarelli-Widholm S., Hulthenby K., Reinholdt F.P. Ultrastructural immunolocalization of fibronectin in epiphyseal and metaphyseal bone of young rats. *Calcif. Tissue Int.* 1995; 57: 442–449.
73. Globus R.K., et al. Fibronectin is a survival factor for differentiated osteoblasts. *J. Cell Sci.* 1998; 111(Pt 10):1385–1393.
74. Miner J.H., Yurchenco P.D. Laminin functions in tissue morphogenesis. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2004; 20: 255–284.
75. Jones J.C., Dehart G.W., Gonzales M., Goldfinger L.E. Laminins: an overview. *Microsc. Res. Tech.* 2000; 51: 211–213.
76. Cheng Y.S., Champlaud M.F., Burgeson R.E., Marinkovich M.P., Yurchenco P.D. Self-assembly of laminin isoforms. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 31525–31532.
77. Mayer U., Kohfeldt E., Timpl R. Structural and genetic analysis of laminin–nidogen interaction. *Ann. N-Y. Acad. Sci.* 1998; 857: 130–142.
78. Yurchenco P.D., Amenta P.S., Patton B.L. Basement membrane assembly, Stability and activities observed through a developmental lens. *Matrix Biol.* 2004; 22: 521–538.
79. Timpl R., et al. Structure and function of laminin Ig modules. *Matrix Biol.* 2000; 19: 309–317.
80. Timpl R., Brown J.C. The laminins. *Matrix Biol.* 1994; 14: 275–281.
81. Quinn T.M., Hunziker E.B., Hauselmann H.J. Variation of cell and matrix morphologies in articular cartilage among locations in the adult human knee. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 672–678.
82. Wong M., Carter D.R. Articular cartilage functional histomorphology and mechanobiology: a research perspective. *Bone* 2003; 33: 1–13.
83. Poole A.R., et al. Composition and structure of articular cartilage: a template for tissue repair. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2001; 26–33.

84. Almarza A.J., Athanasiou K.A. Design characteristics for the tissue engineering of cartilaginous tissues. *Ann. Biomed. Eng.* 2004; 32: 2–17.
85. Meachim G., Stockwell R.A. The Matrix. In: Freeman MAR, editor. *Adult Articular Cartilage*. Pitman; London: 1973; 1–50.
86. Stockwell R.A., Meachim G. The chondrocytes. In: Freeman MAR, editor. *Adult Articular Cartilage*. Pitman; London: 1973; 51–99.
87. Darling E.M., Hu J.C., Athanasiou K.A. Zonal and topographical differences in articular cartilage gene expression. *J. Orthop. Res.* 2004; 22: 1182–1187.
88. Bottaro D.P., Liebmann-Vinson A., Heidaran M.A. Molecular signaling in bioengineered tissue microenvironments. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2002; 961: 143–153.
89. Ramirez F., Rifkin D.B. Cell signaling events: a view from the matrix. *Matrix Biol.* 2003; 22: 101–107.
90. Hyytiäinen M., Penttinen C., Keski-Oja J. Latent TGF-beta binding proteins: extracellular matrix association and roles in TGF-beta activation. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2004; 41: 233–264.
91. Maurer P., Hohenester E. Structural and functional aspects of calcium binding in extracellular matrix proteins. *Matrix Biol.* 1997; 15: 569–580.
92. Cybulsky A.V., McTavish A.J., Cyr M.D. Extracellular matrix modulates epidermal growth factor receptor activation in rat glomerular epithelial cells. *J. Clin. Invest.* 1994; 94: 68–78.
93. Taipale J., Keski-Oja J. Growth factors in the extracellular matrix. *FASEB J.* 1997; 11: 51–59.
94. Bergers G., et al. Matrix metalloproteinase-9 triggers the angiogenic switch during carcinogenesis. *Nat. Cell Biol.* 2000; 2: 737–744.
95. Schenk S., et al. Binding to EGF receptor of a laminin-5 EGF-like fragment liberated during MMP-dependent mammary gland involution. *J. Cell Biol.* 2003; 161: 197–209.
96. Davis G.E., Senger D.R. Endothelial extracellular matrix: biosynthesis, remodeling and functions during vascular morphogenesis and neovessel stabilization. *Circ. Res.* 2005; 97: 1093–1107.
97. Eliceiri B.P., Cheresh D.A. Adhesion events in angiogenesis. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2001; 13: 563–568.
98. Serini G., Valdembri D., Bussolino F. Integrins and angiogenesis: a sticky business. *Exp. Cell Res.* 2006; 312: 651–658.
99. Stupack D.G., Cheresh D.A. ECM remodeling regulates angiogenesis: endothelial integrins look for new ligands. *Sci. STKE* 2002; 2002: E 7.
100. Stupack D.G., Cheresh D.A. Apoptotic cues from the extracellular matrix: regulators of angiogenesis. *Oncogene* 2003; 22: 9022–9029.
101. Koli K., Saharinen J., Hyytiäinen M., Penttinen C., Keski-Oja J. Latency, activation, and binding proteins of TGF-beta. *Microsc. Res. Tech.* 2001; 52: 354–362.
102. Yu Q., Stamenkovic I. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 2000; 14: 163–176.
103. Takagi J. Structural basis for ligand recognition by RGD (Arg-Gly-Asp)-dependent integrins. *Biochem. Soc. Trans.* 2004; 32: 403–406.
104. Lightner V.A., Erickson H.P. Binding of hexabrachion (tenascin) to the extracellular matrix and substratum and its effect on cell adhesion. *J. Cell Sci.* 95: 1990; (Pt 2): 263–277.

105. Maheshwari G., Brown G., Lauffenburger D.A., Wells A., Griffith L.G. Cell adhesion and motility depend on nanoscale RGD clustering. *J. Cell Sci.* 2000; 113 (Pt 10): 1677–1686.
106. Aota S., Nomizu M., Yamada K.M. The short amino acid sequence Pro–His–Ser–Arg–Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 24756–24761.
107. Johansson S., Svineng G., Wennerberg K., Armulik A., Lohikangas L. Fibronectin-integrin interactions. *Front. Biosci.* 1997; 2: 126–146.
108. Schenck S., Quaranta V. Tales from the crypt [ic] sites of the extracellular matrix. *Trends Cell Biol.* 2003; 13: 366–375.
109. Maquart F.X., Pasco S., Ramont L., Hornebeck W., Monboisse J.C. An introduction to matrikines: extracellular matrix-derived peptides which regulate cell activity, implication in tumor invasion. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2004; 49: 199–202.
110. Ingham K.C., Brew S.A., Erickson H.P. Localization of a cryptic binding site for tenascin on fibronectin. *J. Biol. Chem.* 2004; 279: 28132–28135.
111. Marneros A.G., Olsen B.R. The role of collagen-derived proteolytic fragments in angiogenesis. *Matrix Biol.* 2001; 20: 337–345.
112. Keselowsky B.G., Collard D.M., Garcia A.J. Integrin binding specificity regulates biomaterial surface chemistry effects on cell differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2005; 102: 5953–5957.
113. Curtis A., Wilkinson C. New depths in cell behaviour: reactions of cells to nanotopography. *Biochem. Soc. Symp.* 1999; 65: 15–26.
114. Andersson A.S., et al. Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production. *Biomaterials* 2003; 24: 3427–3436.
115. Orgel J.P., et al. The in situ supermolecular structure of type I collagen. *Structure* 2001; 9: 1061–1069.
116. Curtis A.S., et al. Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings. *IEEE Trans. Nanobioscience* 2004; 3: 61–65.
117. Cukierman E., Pankov R., Yamada K.M. Cell interactions with three-dimensional matrices. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002; 14: 633–639.
118. Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M. Taking cell–matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001; 294: 1708–1712.
119. Bershadsky A.D., Balaban N.Q., Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003; 19: 677–695.
120. Alenghat F.J., Ingber D.E. Mechanotransduction: all signals point to cytoskeleton, matrix, and integrins. *Sci. STKE* 2002; 2002: E 6.
121. Ingber D.E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 2006; 20: 811–827.
122. Giancotti F.G. Integrin signaling: specificity and control of cell survival and cell cycle progression. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1997; 9: 691–700.
123. Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110: 673–687.
124. Zimmermann P., David G. The syndecans, tuners of transmembrane signaling. *FASEB J.* 1999; (13 Suppl.): 91–100.
125. Hynes R.O. Integrins: versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell.* 1992; 69: 11–25.
126. Zamir E., Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell–matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 3583–3590.

127. Giancotti F.G., Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science* 1999; 285: 1028–1032.
128. Emsley J., Knight C.G., Farndale R.W., Barnes M.J., Liddington R.C. Structural basis of collagen recognition by integrin alpha-2 beta-1. *Cell* 2000; 101: 47–56.
129. Geiger B., Bershadsky A., Pankov R., Yamada K.M. Transmembrane crosstalk between the extracellular matrix–cytoskeleton crosstalk. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2: 793–805.
130. Gilmore A.P., Anoikis. *Cell Death Differ.* 2005; 12 (2 Suppl.): 1473–1477.
131. Hynes R.O. Cell adhesion: old and new questions. *Trends Cell Biol.* 1999; 9: 33–37.
132. Zamir E., Geiger B. Components of cell–matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 2001; 114: 3577–3579.
133. Lin C.Q., Bissell M.J. Multi-faceted regulation of cell differentiation by extracellular matrix. *FASEB J.* 1993; 7: 737–743.
134. Zhang Z., Vuori K., Reed J.C., Ruoslahti E. The alpha-5 beta-1 integrin supports survival of cells on fibronectin and up-regulates Bcl-2 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1995; 92: 6161–6165.
135. Moro L., et al. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP-kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 1998; 17: 6622–6632.
136. Stamenkovic I. Extracellular matrix remodelling: the role of matrix metalloproteinases. *J. Pathol.* 2003; 200: 448–464.
137. Vu T.H., Werb Z. Matrix metalloproteinases: effectors of development and normal physiology. *Genes Dev.* 2000; 14: 2123–2133.
138. Sternlicht M.D., Werb Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2001; 17: 463–516.
139. Werb Z. ECM and cell surface proteolysis: regulating cellular ecology. *Cell* 1997; 91: 439–442.
140. Fini M.E., Cook J.R., Mohan R., Brinckerhoff C.E. Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. In: Mecham. R.P., Parks W.C., editors. *Matrix Metalloproteinases*. Academic Press; N–Y: 1998; 299–356.
141. Nakahara H., et al. Transmembrane/cytoplasmic domain-mediated membrane type 1-matrix metalloprotease docking to invadopodia is required for cell invasion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997; 94: 7959–7964.
142. Giannelli G., Falk-Marzillier J., Schiraldi O., Stetler-Stevenson W.G., Quaranta V. Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 1997; 277: 225–228.
143. Mannello F., Luchetti F., Falcieri E., Papa S. Multiple roles of matrix metalloproteinases during apoptosis. *Apoptosis* 2005; 10: 19–24.
144. Imai K., Hiramatsu A., Fukushima D., Pierschbacher M.D., Okada Y. Degradation of decorin by matrix metalloproteinases: identification of the cleavage sites. Kinetic analyses and transforming growth factor-beta1 release. *Biochem. J.* 1997; 322 (Pt 3): 809–814.

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ КЛЕТОК С НАНОСТРУКТУРНЫМИ ПОВЕРХНОСТЯМИ

Сангамеш Г. Кумбар, Мишель Д. Кофрон, Лакшми С. Наир и Като Т. Лоренсин

10.1. Введение

Исследование законов и механизмов взаимодействия на поверхности раздела клетка–биоматериал очень важно для развития тканевой инженерии и других биомедицинских направлений. К настоящему времени уже установлено, что клетки способны «воспринимать» топографические особенности поверхностей культивирования, следовательно, взаимодействия с подложкой должны обязательно учитываться при проведении экспериментов [1]. Такие исследования помогают предсказывать поведение клеток *in vivo* и объясняют многие явления при протекании важных биологических процессов — эмбриогенеза, ангиогенеза, образования метастаз и т. п.

Понимание природы данных явлений может оказаться полезным при создании биологических структур и поверхностей различной топологии с целью создания имплантатов, применение которых неизбежно вызывает соответствующий клеточный ответ, например отторжение. Кроме того, изучение взаимодействий клеток с топографическими поверхностями имеют самостоятельную ценность в смежных областях медицины при производстве фармакологических препаратов, токсикологическом скрининге веществ или проектировании оболочек протезов, работающих внутри организма и др. [2–4].

Внеклеточные матрицы (ВКМ), как правило, построены из белков, резервуаров для факторов роста, а также большого числа специальных агентов, необходимых для работы клетки. Уже установлено, что многие процессы (адгезия, пролиферация, движение, дифференциация), да и клеточные свойства вообще сильно зависят от особенностей ВКМ, внутри которых расположены клетки [5–9]. В состав ВКМ входят коллагены с иерархическим внутренним строением, ламинин и некоторые другие волокна, протеогликаны, которые совместно с волокнами образуют наноструктуру с очень сложной топографией.

Базальные мембраны представляют собой уникальный тип внеклеточных мембран, участвующих в клеточной адгезии и обеспечивающих взаимодействие клеток с микроокружением. Образец нанотопографического строения и особенностей базальной мембраны *in vivo* представлен на рис. 10.1, в. Толщина

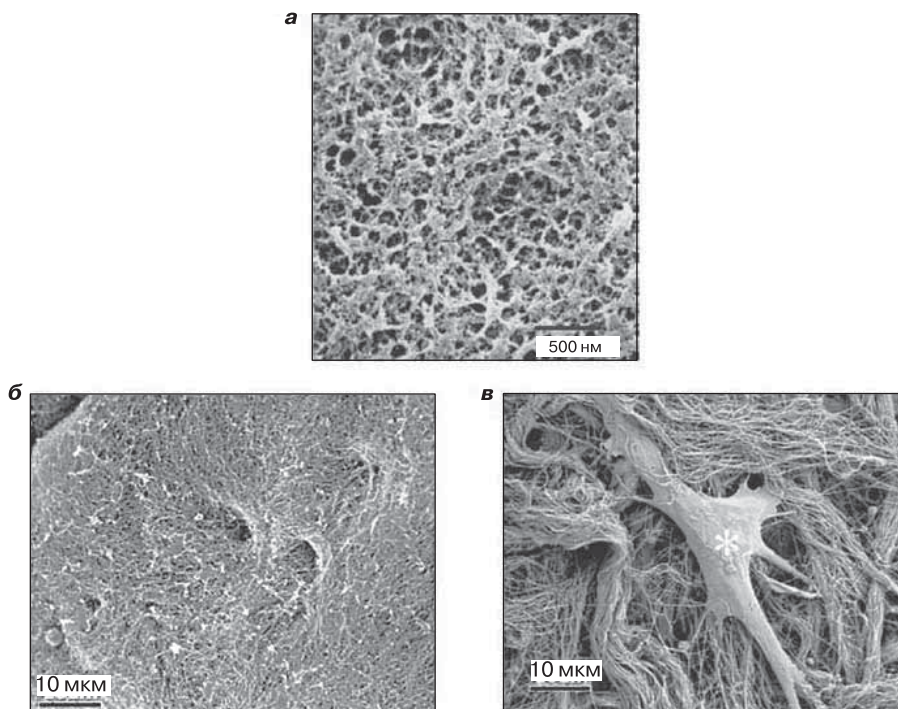


Рис. 10.1. Полученные на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) микрофотографии строения базальных мембран различных тканей: *a* – базальная мембрана рогиовицы макаки-резуса, поверхность которой содержит наноразмерные гребни, поры и волокна. СЭМ-изображения базальных мембран тканей мышцы (*б*) и кожи человека (*в*) показывают наличие на их поверхности плотной сетки из коллагенов, содержащей наноразмерные волокна и пористые структуры. На снимке (*в*) звездочкой выделена точка прикрепления фибробласта к коллагеновой сетке. Микрофотографии объясняют роль реальных особенностей топографии поверхности, возникающих в микрометрическом масштабе клеток *in vivo*. Снимки (*a*) и (*б, в*) перепечатаются с разрешения авторов из работ [11] и [12] соответственно

показанных на рисунке базальных мембран — основного и объединяющего компонента внеклеточных матриц составляет около 20 нм. В организме базальные мембраны (БМ) отделяют специализированные ткани (эпителий, эндотелий, мышечные волокна и клетки нервной системы) от соединительных; поверхности БМ обычно состоят из переплетенных наноразмерных волокон, гребней и пор (рис. 10.1, *a–в*). Наглядным примером служит представленный на рис. 10.1, *a* участок мембраны клетки сердечной мышцы макаки-резуса [10, 11], где отчетливо выделяются топографические особенности тканевой структуры. Толщина базальных мембран составляет 178 ± 57 нм, расстояния между порами на поверхности БМ — 127 ± 57 нм, а диаметры волокон и самих пор — 52 ± 28 нм и 82 ± 49 нм соответственно [10, 11]. Данные особенности строения

мембран очень близки к таковым в тканях других типов, что легко прослеживается на микрофотографиях. На снимках (б) и (в), полученных с использованием сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), показаны базальные мембраны тканей человека [12, 13] и плотные пучки волокон коллагена, характерные для БМ и кожного покрова тканей мышцы, причем коллагеновая сетка клеток кожи (рис. 10.1, в) обладает небольшой плотностью. На снимке можно различить закрепление фибробластов на наноразмерных волокнах коллагена.

Сложная трехмерная топография поверхности ВКМ обеспечивает не только химические и стимулирующие реакции, но и биофизические функции клеток, присоединенных к поверхности. Микрофотографии позволяют рассмотреть компоненты ВКМ и их топографические особенности, но, к сожалению, непригодны для объяснения и предсказания взаимодействий в системе клетка–ВКМ. Пока достаточно подробно описаны лишь механизмы работы интегринсодержащих рецепторов, присоединенных к клеточным мембранам последовательностями RGD (аргинин — глицин — участок аспарагиновой кислоты) [14–17].

В ходе взаимодействия с поверхностью роста культивируемые клетки секретируют белки, из которых построены ВКМ, затем данные белки выступают в качестве трансдукторов при передаче физических и химических межклеточных сигналов. Трансдукция происходит с участием цитозольных мембран при помощи фокальных контактов [18–20].

Необходимые взаимодействия в системе клетка–ВКМ–подложка «распределяются» по клеточным структурам за счет межклеточных связей, причем именно взаимодействия в системе клетка–подложка особенно важны для интеграции и усиления внеклеточных сигналов [21, 22]. Показано, что изменения свойств поверхности (химического состава, энергии, шероховатости и топографического строения) могут существенно менять характер связей на поверхности раздела клетка–подложка [23]. Следует также учитывать, что в природных тканях производимые клетками сигналы определяются сложными химическими и топографическими особенностями локального окружения в отличие от стандартных условий синтетических поверхностей. Различия в топографии поверхности используемых подложек могут иметь самые разные масштабы (от макроскопических до нанометрических), и все они как-то отражаются на форме и особенностях клеток, растущих на данных подложках. Так, наглядные примеры разномасштабного воздействия особенностей топографии структуры приводятся в работе [24], где макротопографические характеристики поверхности влияют на форму клеток костей и связок, микротопографические — на форму клеток других видов, а нанотопографические — на фолдинг белков и связывание коллагена.

В ранних работах [25–32] показано, что топография поверхности и наличие соответствующих биохимических раздражителей могут существенно изменять поведение клеток при их развитии (адгезию, ориентацию, активирование и миграцию). Установлено также, что биохимические раздражители влияют не только на поведение клеток (адгезию, последующие изменения формы, рост и апоптоз), но даже на экспрессию некоторых генов [28, 29, 33–35]. Например,

вытянутые в ряд фибробласты на топографической поверхности с микроскопическими канавками способны выделять больше адгезионного белка, фибронектина, чем аналогичные клетки, расположенные без всякого вытягивания на плоских контрольных подложках [35, 36, 38].

То, что нанотопографические особенности строения ВКМ способны существенно изменять поведение клеток, побудило исследователей к поиску особо предпочтительных наноразмерных характеристик, необходимых при проектировании новых искусственных тканей и биомедицинских имплантатов. В литературе есть сведения о воздействии нанотопографии поверхности на определенные морфологические изменения [25, 30], адгезию [26], подвижность [34], пролиферацию [36], эндцитологическую активность [37] и регулирование генов [35] при выращивании клеток различных типов. В частности, было изучено поведение фибробластов [36–38], остеобластов [39], остеокластов [40], эндотелия [41], гладких мышц [42], эпителия [43–44] и эпитеинона [45]. Назрела необходимость тщательного изучения тонкостей взаимодействия поверхностей с особенностями клеток-прекурсоров при дифференциации. Проблемы взаимодействий на границе клетка — нанотопографическая поверхность представляют интерес не только для фундаментальной науки, но и для многих прикладных биомедицинских задач.

10.2. Поведение клеток на различных нанотопографических поверхностях

Большинство экспериментов сейчас проводятся с использованием плоских поверхностей по общепринятой методике выращивания культур тканей на полистироле. С использованием данной технологии можно изучать взаимодействия между клетками и субстратом, однако из-за гладкости подложек она не позволяет проводить исследование сложной топографии ВКМ или ее nanoособенностей. В более ранних опытах было выявлено наличие воздействия микро- и наномасштабных характеристик поверхностей на жизнедеятельность клеток, включая морфологию, адгезию, подвижность, пролиферацию и регулирование генов [25–35]. В некоторых работах показана возможность создания на подложках различных топографических особенностей (пор, гребней, волокон, узлов и т. д.) [1, 46–54].

Развитие нанотехнологии привело к разработке новых методик создания поверхностных наноструктур с разнообразным строением (от тонких пленок до генетических конструкций), которые уже применяются для создания биологических молекул. Все существующие методики разделены на две основные группы, с устоявшимися названиями — «сверху–вниз» и «снизу–вверх».

Подход «сверху–вниз» включает ряд литографических методик (мягкую фото-, коллоидную и электронно-лучевую литографию), электрическое формование волокон, расслоение полимеров и разделение фаз, напыление, химическое травление и т. п. Подход «снизу–вверх» объединяет самые разные подходы: супрамолекулярную сборку, соединение молекул (в виде ансамблей или мономоле-

кулярных слоев) и управляемую самосборку. Образующиеся при этом наноструктуры позволяют получать разнообразные поверхности, топография которых может меняться от почти упорядоченной до хаотической. Как уже отмечалось, топография поверхности сама начинает влиять на свойства и функции выращиваемых клеток. При этом некоторые из существующих способов обработки (фотолитография и электронно-лучевая литография) позволяют получать высокоупорядоченные нанотопографические структуры. В последнее время распространен метод электрического формования волокон, позволяющий создавать сложные поверхностные структуры [54]. С другой стороны, есть ряд методик (полимерное расслоение, коллоидная литография, самосборка и т. п.), формирующие подложки с почти хаотической топографией (под хаотичностью подразумевается отсутствие организации, правильной геометрии и возможности воспроизведения). На практике такая топография обычно создается случайно в процессе формирования или обработки, и следует отметить, что появление поверхностей хаотического строения обычно связано с применением простых и дешевых методик. Наоборот, формирование поверхностей с более сложной упорядоченной нанотопографией почти всегда требует сложного и дорогого оборудования, технического контроля и т. п. Особенности и характеристики наиболее популярных методик получения нанотопографических поверхностей приводятся в табл. 10.1, где указаны преимущества и недостатки конкретных технологий, а также изменения поведения клеток при культивировании.

10.2.1. Поверхности, полученные методом электронно-лучевой литографии

В настоящее время электронно-лучевая литография — одна из наиболее привлекательных и перспективных методик формирования поверхностей с заданными геометрическими особенностями. Данный метод можно сочетать с компьютерным (автоматическим) управлением, что позволяет получать подложки с высокой геометрической точностью без использования масок или фотосаблонов. Суть метода заключается в следующем: для создания поверхности с заданными топографическими особенностями на исходный образец наносится слой так называемых положительных или отрицательных фоторезистов — покрытий, способных реагировать на воздействие пучка высокоэнергетических электронов. При облучении положительные резисты разлагаются на низкомолекулярные фрагменты, а в отрицательных резистах формируются сетки из нерастворимых сшитых полимеров. Затем резисты обрабатываются в проявляющих средах, в результате образуются поверхности с заранее заданными топографическими особенностями. Точность обработки определяется сечением пучка, но при использовании отрицательных резистов разрешение ограничивается возможным набуханием проявителя. Из недостатков метода стоит отметить высокую стоимость и большие временные затраты. Современная электронно-лучевая литография позволяет получать поверхности с разнообразными нанотопографическими особенностями (канавки квадратного сечения, гребни и стержни), которые затем могут использоваться для изучения поведе-

Таблица 10.1

Обзор нанотопографических поверхностей, получаемых различными методиками, и наблюдаемые изменения поведения клеток

Методики изготовления поверхностей и ссылки на работы с их описанием	Формируемые топографические особенности	Достоинства	Недостатки	Изученные типы клеток	Наблюдаемые изменения в поведении клеток
<i>Упорядоченные нанотопографические поверхности</i>					
Электронно-лучевая литография [52, 55–62]	Квадратные канавки и наноколонки с размерами от 14 нм до нескольких микрометров	Использование компьютеров позволяет создавать точные геометрические фигуры и рисунки без применения фасок	Метод требует дорогого оборудования и низкопроизводительен. Низкое разрешение. Трудно создавать особенности на больших участках поверхности	Фибробласты десны, эмбриональные клетки спинного мозга <i>Xelopus</i> , клетки нейронов гиппокампа крысы, эпителиальные клетки ротовицы, кератоциты	Усиление выстраивания, миграции и ориентации
Фотолитография (а) в сочетании с травлением (б) [63–69]	а) Канавки с квадратным и V-образным сечением, гребни, круглые углубления. Размеры от 30 нм до нескольких микрометров, но чаще создаются микронные неоднородности. б) Размеры особенностей зависят от времени травления и используемого агента травления	а) Позволяет создавать точные геометрические фигуры и рисунки. б) Быстрый, простой и дешевый метод	а) Дорогое и сложное оборудование. б) Трудно создавать сложные геометрические особенности	Дермальные фибробласты крысы, макрофаги P388D, клетки ВНК и МДСК, церебральные нейроны куриных зародышей, грибы <i>Uromyces appendiculatus</i> , макрофаги мышей, астроциты крысы	Повышение ориентации, ускорение распространения, миграция в структуре, выстраивание в линию

Продолжение табл. 10.1

Методики изготовления поверхностей и ссылки на работы с их описанием	Формируемые топографические особенности	Достоинства	Недостатки	Изученные типы клеток	Наблюдаемые изменения в поведении клеток
Электроформование (ориентирование нановолокон) [70–77]	На поверхность наносятся ориентированные волокна диаметром несколько нанометров, толщина которых может быть увеличена до нескольких микрометров	Простота, удобство и широкий выбор используемых материалов. Возможность работы с биологическими молекулами	Метод позволяет создавать только «нетканые» структуры	Эндотелиальные клетки, стволовые клетки, фибробласты связок, клетки гладких мышц, хондроциты (НТВ-94), остеобласты (MG-63)	Усиление распространения, выстраивания, миграции, экспрессии фенотипа и пролиферации
Нанопечать [78–80]	Широкий диапазон структур (колонки, канавки, гребни) с нанометрическими размерами	Возможность получения многослойных трехмерных структур при меньших денежных затратах, чем при использовании электронно-лучевой литографии	Дорогое оборудование, длительный процесс обработки	Остеобласты, клетки гладких мышц	Усиление распространения, выстраивания, миграции, дифференциации и экспрессии фенотипа

Продолжение табл. 10.1

Методики изготовления поверхностей и ссылки на работы с их описанием	Формируемые топографические особенности	Достоинства	Недостатки	Изученные типы клеток	Наблюдаемые изменения в поведении клеток
Самосборка [81–95]	Волокна любых размеров из исходного материала	Простой и удобный процесс, не требующий сложных технологий. Возможность получения сложных функциональных структур, не имеющих дефектов и способных к восстановлению поврежденных	Невозможен прямой контроль над процессом; в отличие от литографии трудно получить особенности сложной формы	Клетки МСТ3Т3-Е1, нейральные, мочевого пузыря, гладких мышц, эндотелия, аорты и невральные клетки-предшественники. Проведены исследования <i>in vivo</i> на сирийских хомячках (<i>Syrian hamster</i>)	Усиление адгезии, пролиферации, дифференциации и экспрессии фенотипа
Разделение фаз [81, 96–99]	Широкий выбор параметров особенностей по размерам и геометрии, включая ямки, островки, волокна и нерегулярные пористые структуры	Простой и удобный процесс, не требующий специального оборудования. Можно получать высокопористые каркасы с регулируемым размером пор на больших площадях	Неупорядоченная нанотопография особенностей	Клетки ОСЕ-1 типа остеобластов, стволы клетки нервов, протеобласты МСТ3Т3-Е1	Адгезия, дифференциация и пролиферация

Неупорядоченные нанотопографические поверхности

Продолжение табл. 10.1

Методики изготовления поверхностей и ссылки на работы с их описанием	Формируемые топографические особенности	Достоинства	Недостатки	Изученные типы клеток	Наблюдаемые изменения в поведении клеток
Коллоидная литография [37, 43, 44, 100–105]	Колонки и островки нанометрических размеров	Относительно дешевый и быстрый метод, позволяющий легко создавать нанотопологические особенности на больших площадях	Трудно создавать особенности со сложной геометрией	Клетки эпителия, панкреатические эпителиальные клетки (AR4-2J), эпителиальные клетки молочной железы (NC11), клетки карциномы мочевого пузыря HTB-4, первичные остеобласты человека, фибробласты человека макрофаги/моноциты	Взаимодействия, распространение, выстраивание в ряд, миграция, экспрессия фенотипа и пролиферация
Электроформование (случайное расположение нановолокон) [106–123]	Наноразмерные волокна, толщина которых может быть увеличена до нескольких микрометров	Простой и удобный процесс с большим выбором материалов для формирования. Позволяет инкорпорировать биоактивные молекулы	Позволяет создавать особенности только в виде волокон	Фибробласты, клетки MC3T3-E1 типа остеобластов, клетки гладких мышц человека, NIH3T3, клетки стромы костного мозга	Распространение, пролиферация, экспрессия фенотипа, ориентация

Продолжение табл. 10.1

Методики изготовления поверхностей и ссылки на работы с их описанием	Формируемые топографические особенности	Достоинства	Недостатки	Изученные типы клеток	Наблюдаемые изменения в поведении клеток
Химическое травление [124–127]	Особенности зависят от времени процесса и вида используемого травящего агента	Быстрый, простой и дешевый метод	Трудно обеспечить требуемую геометрию особенностей	Остеобласты человека CRL-11372, клетки гладких мышц аорты, клетки гладких мышц грудной аорты крыс, клетки мочевого пузыря и корковые, опухольные клетки LRM55 CNS	Адгезия, миграция, пролиферация и экспрессия фенотипа
Углеродные нанотрубки/нановолокна [128–138]	Волокна длиной несколько микрометров и диаметром от 5 нм до нескольких микрометров с различной формой (прямые, спиральные, «рыбий скелет»)	Позволяет получать особенности с преобладающими механическими, электрическими и поверхностными характеристиками	Позволяет получать особенности только в виде волокон и трубок. Не позволяет формировать особенности со сложной геометрией	Остеобласты человека, кератиноциты эпидермы, макрофаги и астроциты кожных фибробластов крыс, клетки гладких мышц аорты, сердца и корковые клетки, фибробласты кожи мыши, клетки гладких мышц быка	Совместимость, адгезия, пролиферация, дифференциация, морфология

Окончание табл. 10.1

Методики изготовления поверхностей и ссылки на работы с их описанием	Формируемые топографические особенности	Достоинства	Недостатки	Изученные типы клеток	Наблюдаемые изменения в поведении клеток
Расслоение полимерной смеси [139–149]	Нанотопографические особенности в виде ямок, островков и лент в широком диапазоне линейных размеров и глубины	Легкий, дешевый и высокоэффективный метод для получения особенностей на больших площадях	Позволяет получать особенности только в виде волокон, трубок и лент. Не позволяет формировать особенности другой геометрии	Фибробласты, остеобласты и клетки эндотелия человека	Адгезия, морфология, пролиферация, дифференциация, экспрессия гена

ния клеток *in vitro*. Проведенные исследования наглядно показали важность этих особенностей для биомедицинского применения [52, 55–62].

В качестве примера можно привести работу [55], где подробно изучались процессы миграции и выстраивания первичной структуры из SV40-клеток эпителия человеческой сердечной мышцы, изменяемые посредством выращивания на поверхностях с многочисленными особенностями в виде канавок и гребней, размеры которых изменялись в широких пределах (400–4000 нм). Результаты исследований показали, что миграция клеток обычно происходит вдоль канавок и гребней в виде круговых зон, хотя иногда наблюдалась миграция, перпендикулярная направлению гребней (во всех случаях и для всех направлений проводились контрольные опыты на плоских поверхностях). Также было обнаружено, что так называемые стрессорные волокна и локальные центры адгезии преимущественно развиваются вдоль канавок и гребней. Интересно, что кератоциты на таких подложках проявляют большую склонность к линейному выстраиванию и ориентации, чем клетки сердечной мышцы [20]. На поверхностях с наноразмерными особенностями кератоциты образуют меньше стрессорных волокон и локальных адгезий, чем на контрольных (плоских или с микрометрическими особенностями) поверхностях [56].

Авторы работы [57] исследовали поведение клеток на подложках с канавками и гребнями разной ширины (от нано- до микрометров), причем данные особенности рассматривались как стимулы или раздражители для роста клеточных колоний эпителия сердечной мышцы человека. Результаты эксперимента показали, что располагающиеся вдоль наноканавок и гребней клетки образуют удлинённые структуры (рис. 10.2, *а* и *б*), в то же время на гладких поверхностях они формируют круги (рис. 10.2, *в*). При изменении среды культивирования (с DMEM/F12 на *Epifile*) клетки эпителия сердечной мышцы человека изменяют «поведение» и начинают выстраиваться перпендикулярно наноособенностям поверхности (рис. 10.2, *г*). При этом они одновременно располагаются параллельно топографическим структурам микрометрического масштаба [58]. Подобные вариации первичной структуры растущих клеточных колоний могут быть объяснены изменениями строения фокальной адгезии. Фибробласты ганглиозных клеток человека и нейронов крыс на поверхностях с канавками образуют фокальные адгезионные контакты и располагаются вдоль канавок [59, 60]. Нервные клетки *Xenopus* выстраиваются параллельно канавкам всех размеров, тогда как нервные клетки гиппокампа перпендикулярны узким и неглубоким канавкам [60, 61]. Была обнаружена зависимость адгезии клеток от типа и формы наноособенностей в виде колонок, углублений, выступов или случайным образом расположенных коллоидных частиц золота. Наблюдалось усиление адгезии (по сравнению с плоскими или покрытыми коллоидными частицами поверхностями) на упорядоченных выступах и их гранях, и одновременно — ослабление адгезии на колонках и ямках [52]. На полиуретановых поверхностях с особенностями с широким распределением по размерам (200–2000 нм) с уменьшением неоднородностей происходило ослабление пролиферации клеток эпителия сердечной мышцы по сравнению с пролиферацией на плоской поверхности [62].

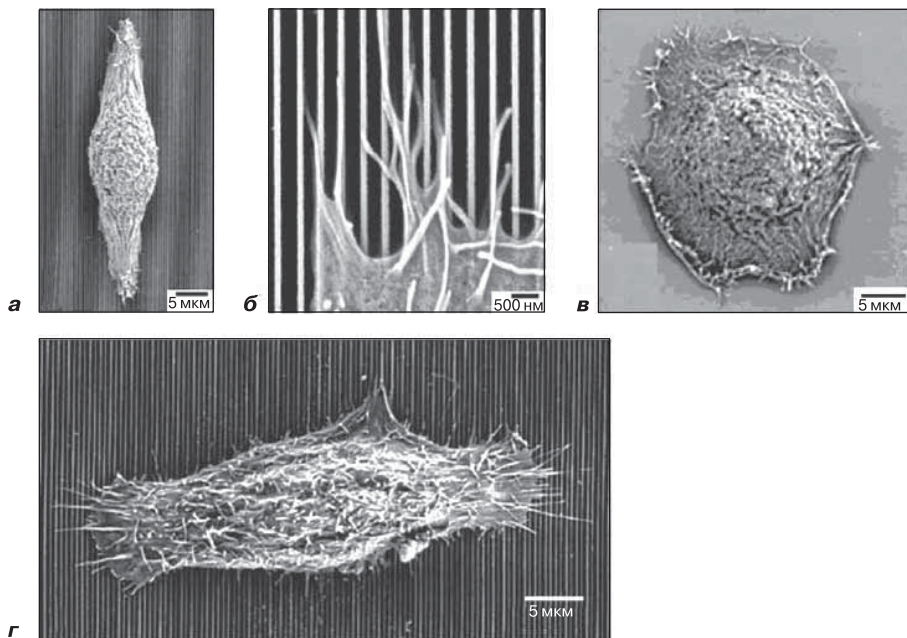


Рис. 10.2. Полученные на сканирующем электронном микроскопе микрофотографии строения клеток эпителия роговицы человека, выращенных на различных поверхностях и с использованием разных питательных сред (DMEM/F12). На топографических поверхностях рост клеток характеризуется удлинением (*a*), а также ориентацией и усиленным развитием филоподий в направлении особенностей (*b*). Для сравнения показана колония, выращенная на гладкой поверхности, обладающая обычной, округлой морфологией (*c*). Также показана культура, выращенная на питательной среде *Epifile*, клетки которой ориентированы перпендикулярно направлению нанотопографических особенностей (*d*)

10.2.2. Поверхности, полученные методом фотолитографии

Путем фотолитографии можно создавать большое число геометрических особенностей разного типа, включая канавки, гребни и узлы с размерами от нанометров до нескольких микрон. Данный метод состоит из ряда последовательных процессов, главными из которых являются очистка поверхности кремниевых чипов (пластинок), покрытие их фоторезистом и так называемая мягкая сушка, позволяющая удалить с резиста остатки растворителя и восстановить его фоточувствительность. Фотолитография основана на нанесении фотомаски в виде геометрического рисунка на поверхность резиста, которая затем подвергается воздействию света, травлению и проявке, вследствие всех перечисленных процедур на поверхности формируется рисунок. При этом некоторые режимы сушки могут повышать адгезию между резистом и кремниевым

чипом, упрочняя нанесенный слой. Данный метод позволяет создавать высокоточные геометрические изображения, но, к сожалению, требует дорогостоящего оборудования, поэтому фотолитография чаще используется при формировании поверхностей с микрометрическими особенностями.

Полученные топографические подложки заметно изменяют поведение и функции культивируемых на них клеток (ориентацию, взаимодействия, морфологию и дифференциацию) [63–69].

Исследование поверхности имплантатов с неоднородностями интересующих размеров (диаметр — 2–5 мкм, высота — несколько нанометров), помещенных в организм кроликов, показало, что на них оседает меньше одноядерных клеток и мелких фиброзных капсул, чем на контрольных подложках (гладких или с круглыми канавками диаметром 8 мкм) [68]. Обнаружено, что клетки, выпадающие в осадок на описываемых наноструктурах, имели удлиненную форму и большее число филоподий, хотя ранее считалось, что именно округлые клетки с малым числом филоподий более «склонны» к оседанию [68]. Зависимость адгезии астроглиальных клеток крысы от состояния поверхности описана в работе [69], где изучалось осаждение астроцитов на кремниевой пластине с грубой поверхностью, на которой с помощью реакционного ионного травления и мягкого мокрого травления дополнительно создали нанотопографические особенности. При этом обнаружилось, что трансформированные астроциты на поверхностях, полученных мокрым травлением, осаждаются сильнее и имеют «растянутую» форму, в то же время на подложках с колонками, сформированными ионным травлением, образуются округлые клетки с рыхлыми соединительными структурами [69]. Ниже приводится ряд примеров влияния формы поверхностных неоднородностей на поведение культивируемых клеток.

Фибробласты крысы при выращивании на поверхности с квадратными канавками (субмикронных размеров) не только ориентируются вдоль канавок, но и удлиняются [63]. Степень ориентации и скорость роста клеток макрофагов крысы P388D1 и церебральных нейронов куриных зародышей на подложках с канавками возрастают с увеличением глубины канавок [64–65]. В некоторых работах отмечалось и подробно описывалось накопление вдоль краев канавок клеток цитоскелета, F-актина и винкулина [64, 66]. Растущие клетки грибов *Uromices appendiculatus* проявляют высокую степень ориентации вдоль наноразмерных гребней (расстояние между гребнями 0,5–6,7 мкм, высота около 500 нм). Интересно, что дифференциация клеток на гребнях высотой более 500 нм достигает максимума по сравнению с ростом на поверхностях с высотой гребней более 1 мкм или менее 0,25 мкм [67].

10.2.3. Поверхности с нановолокнами

Полимерные нановолокна изготавливают разными способами, включая синтез на шаблоне, разделение фаз, вытягивание, самосборку и электроформование. В последние годы большую популярность приобретает использование воло-

кон, полученных электроформованием, что связано с простотой и удобством данного метода. Путем электроформования на одной и той же установке можно получать полимерные волокна разного диаметра (от нескольких нанометров до нескольких микрометров) [70–77]. При создании поверхностей заданного типа волокна формируются в электрическом поле, а затем осаждаются на заземленной подложке, в результате образуются поверхности с хаотической топографией. Методика позволяет также придавать подложке некоторый элемент упорядоченности, но это требует воздействия вспомогательного внешнего электрического поля, для чего необходимы коллекторы специального типа. Технические сложности связаны с тем, что коллектор должен не только вращаться с высокой скоростью, но и иметь особую форму в виде колеса с острыми краями или рамки [71–76].

Образующиеся наноструктурные поверхности довольно необычны: одновременно являются и хаотическими, и частично упорядоченными вдоль некоторых линий. Особенности клеток, культивируемых на подобных подложках, рассматривались в работах [71–76].

В работе [71] сравнивалось поведение эндотелиальных клеток коронарной артерии человека на поверхностях из частично ориентированных или полностью хаотических нановолокон диаметром 200–1000 нм, изготовленных из модифицированного желатином поликапролактона (ПКЛ). Выяснилось, что основные процессы (адгезия, рост, распространение, пролиферация) на поверхности с частично ориентированными волокнами происходят интенсивнее, чем на контрольных подложках из ПКЛ и хаотически расположенных волокон.

Наличие «направленных» нановолокон способствует росту эндотелиальных клеток параллельно структурам, напоминающим по форме веретено; также регистрировались появление цитоскелетов и фенотипическая экспрессия. Жидкостные сдвиговые напряжения, возникающие при протекании крови по сосудам, располагают эндотелиальные клетки в направлении потока, следовательно, ориентированные волокна на модифицированных поверхностях описываемого типа фактически моделируют условия *in vivo* растущей культуры [71]. Стволовые клетки мозжечка C17-2 новорожденных мышей (NCS) легко присоединяются к волокнам обоих типов (с ориентированным и с хаотическим расположением), но при росте изменяют обычные округлые очертания, принимая удлиненную, веретенообразную форму, что свидетельствует о морфологической дифференциации. Удлинение форм клеток NCS (а также их нейритов) наблюдается параллельно ориентации нановолокон, в этом же направлении фиксируется и более высокая скорость дифференциации NCS по сравнению с контрольным образцом. На упорядоченных волокнах также усиливается взаимодействие между волокнистыми структурами из NCS, отсутствующее на поверхностях с хаотически расположенными особенностями (рис. 10.3) [72]. Аналогичная ориентация растущих клеток (с образованием веретенообразных структур вдоль полиуретановых волокон) наблюдалась и для фибробластов связок человека HLF [73]. При этом фибробласты на ориентированных волокнах синтезировали заметно больше коллагена и в дальнейшем обладали высо-

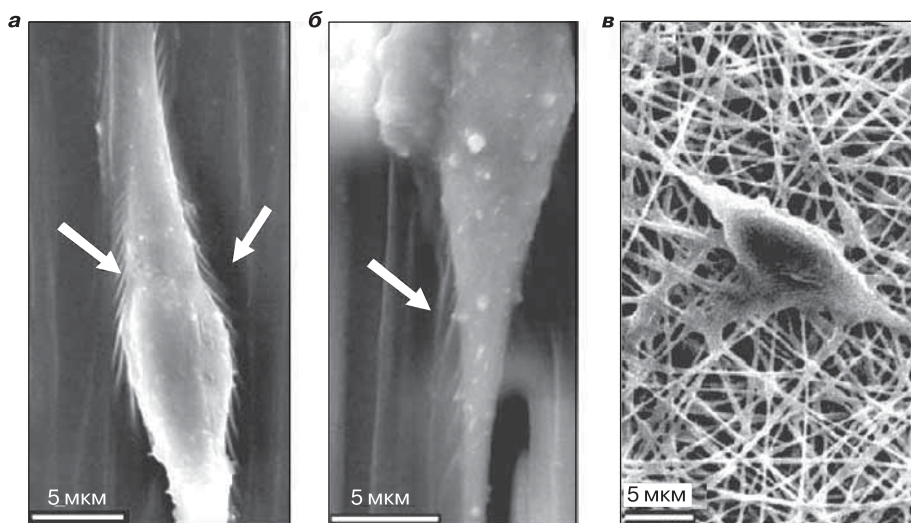


Рис. 10.3. Клетки гладких мышц, выращенные на ориентированных волокнах поли-*L*-молочной кислоты (PLLA), имеют отчетливо выраженную биполярную морфологию. Стрелками указаны волокнистые структуры (*а*) и микроволокна (*б*). Такие структуры отсутствуют на снимке (*в*), где представлена культура, выращенная на поверхности с хаотическим расположением нановолокон. Перепечатывается с разрешения из работы [72]

кой чувствительностью к растягивающим напряжениям, что связано с большим содержанием коллагена [73]. Клетки гладких мышц (SMC) сердечной артерии человека способны прикрепляться к поверхности упорядоченных нановолокон из сополимера *L*-молочной кислоты и ϵ -капролактона, а затем мигрировать вдоль них с образованием веретенообразных структур [74, 76]. SMC, возникающие при повышенной адгезии и пролиферации вдоль нановолокон, параллельны направлению волокон. В работе [75] показано, что остеобласты и хондроциты человека активнее присоединяются к хитозановым и ориентированным нановолокнам, приобретая при росте характерные морфологические особенности подложки. То, что растущие на ориентированных волокнах клетки «следуют» структуре субстрата, по-видимому, подтверждает так называемую теорию управляющего контакта, согласно которой миграция растущих клеток должна происходить в направлениях, определяемых химическими, структурными и механическими характеристиками подложки [77].

10.2.4. Поверхности, полученные методом нанопечати

Нанопечать — особый вид литографии, позволяющий создавать поверхности с упорядоченными наноразмерными топографическими особенностями (колонки, канавки и гребни). Метод основан на вдавливании твердого шаблона с элементами рисунка в слой полимера, покрывающего кристалл-подложку, что создает

в полимерном слое разность толщин, соответствующую требуемой структуре. Получение многослойных трехмерных структур путем нанопечати несколько дешевле электронно-лучевой литографии, однако оборудование для него дороже, а времени затрачивается больше. Экспериментально подтверждено, что изготовленные по данной технологии топографические поверхности способны изменять поведение клеток *in vitro* [78–80].

В работе [78] изучалось поведение SMC-клеток легочной артерии теленка на поверхностях из полиметилметакрилата (ПММА) и полидиметилсилоксана (ПДМС) с нанесенной с помощью нанопечати «сеткой» (ширина линий — 350 нм, шаг — 700 нм, глубина — 350 нм). При сравнении с культурами, выращенными на плоской поверхности, обнаружилось, что на подложке с сеткой пролиферация клеток заметно ослаблена, а более 90% цитоскелетов и клеточных ядер имеют удлиненную структуру (рис. 10.4, см. цв. вклейку) [78]. В экспериментах по заживлению тканей *in vitro* установлено, что поляризация микротрубочек (образуемых центрами SMC при миграции) свидетельствует о наличии преимущественной ориентации их осей вдоль линий роста. В работе [79] изучалась возможность использования полистирольных поверхностей (с наноколонками диаметром 160–1000 нм и высотой 1000 нм) в качестве альтернативной подложки для культивирования тканей *in vitro*. Опыты с клетками линии HeLa показали, что клетки прикрепляются лишь к вершинам нанокколонок, причем в существенно меньшем количестве по сравнению с контрольным образцом. Другие исследования на аналогичной поверхности выявили, что в ближайшем окружении вершин нанокколонок локализуются молекулы актина, а в отдаленных от колонок плоских участках формируются однородно распределенные молекулы винкулина [79]. На основании полученных результатов можно заключить, что изучаемые клетки характеризуются низкой адгезивностью, поэтому на основе материалов с описанной выше топографией можно создавать новый тип подложек для культивирования, не требующий стандартной обработки трипсином. Также было обнаружено, что при росте первичных остеобластов на полистирольных наноструктурных поверхностях (с канавками глубиной 50 и 150 нм, периодичность 500 ± 100 нм) наблюдаются ярко выраженное выстраивание и ориентация клеток вдоль канавок [80]. Экспонирование подложек с подобной топографией активизирует удлинение клеток, причем молекулы актина и актинина в цитоскелете выстраиваются вдоль канавок, а молекулы винкулина (белка фокальных адгезий) концентрируются на противоположном конце удлиненных клеток, возможно, для компенсации напряжений, создаваемых анизотропией поверхности [80].

10.2.5. Поверхности, полученные самосборкой

Молекулярная самосборка вещества, обусловленная наличием у реагентов слабых нековалентных химических связей (водородных, электростатических, гидрофобных и сил Ван-дер-Ваальса), — одна из самых важных методик создания наноструктур из различных полимерных и биологических соединений. Почти все биологические макромолекулы могут взаимодействовать по указанным

механизм, образуя в результате самосборки практически бездефектные и даже способные к самовосстановлению сложные функциональные структуры. Процессы молекулярной самосборки являются (или кажутся) простыми, удобными и легко масштабируемыми, однако стоит отметить, что ученым пока не удалось разработать методики управления данными межклеточными взаимодействиями, не говоря уже о создании структур строго определенной геометрической формы. Впрочем, использование подходов «снизу–вверх» (см. выше) уже привело к получению большого числа наноструктур, применяемых в качестве каркасов или заготовок при создании соединений для различных биомедицинских целей [81–95].

Например, изучение самосборки пептидных нановолокон (SAPNS) из разветвленных или линейных амфифильных к пептидам молекул на поверхности полигликольных каркасов с первичными примордиальными клетками гладкой мышцы человека показало, что такие клетки избирательно связываются с разветвленными, а не с линейными амфифильными пептидами, что создает некие предпосылки для управления их поведением [88]. Использование волокон SAPNS седалищного нерва в качестве элементов трансплантатов позволяет частично восстанавливать зрительные пути и даже зрение у подопытных взрослых животных *in vivo* [94]. Мезенхимные стволовые клетки крысы при культивировании на SAPNS с последовательностью RGD обладают повышенным сродством к поверхности, более высокой активностью щелочной фосфатазы и большим содержанием остеокальцина по сравнению с поверхностями SAPNS без RGD-последовательности [95]. Гибридные каркасы SAPNS также способны удерживать клетки, что приводит к образованию однородной костной ткани *in vivo* в модельных экспериментах на крысах. При перфузии в культуре *in vitro* регистрируют более высокую активность щелочной фосфатазы и повышение содержания остеокальцина, что свидетельствует об активации дифференциации клеток в остеогенезе по сравнению с контрольными образцами [84]. Содержащие пентапептидный эпипептид ILVAV (изолицин–лизин–валин–аланин–валин) SAPNS поддерживают нейтральные клетки-предшественники и приводят к быстрой дифференциации нейронов с уменьшенным числом астроцитов [87]. ILVAV-содержащие SAPNS связываются с биоактивным эпипептидом, что подтверждает преимущества топографических поверхностей [87]. При этом наблюдаются не только выживание и пролиферация клеток MC3T3-E1 на SAPNS, но и способность данных клеток к использованию молекул ILVAV в метаболизме [89]. Функционализированные и биомиметические SAPNS участвуют во многих клеточных процессах, включая заживление повреждений и регенерацию тканей за счет создания распознающих доменов ВКМ с наноразмерными структурами [86].

10.2.6. Поверхности, полученные методом разделения фаз

Метод разделения фаз широко используется для получения высокопористых каркасов с регулируемым коэффициентом пористости. Материалы, включая пористые среды с волокнами и сложной структурой внутренних каналов, различаются геометрией и размерами элементов [81, 96–99]. Разделение фаз

в системах твердое тело–жидкость и жидкость–жидкость обычно происходит за счет понижения температуры растворения. В самых общих чертах метод основан на добавлении очень небольшого количества воды к раствору полимера (растворитель с низкой температурой плавления), которое приводит к мгновенному разделению на фазы с очень высоким и очень низким содержанием полимера. После охлаждения ниже температуры растворения такие системы подвергают вакуумной сушке с испарением растворителя, в результате возникают пористые полимерные каркасы с микро- или наноразмерными особенностями. Процесс достаточно прост, удобен для применения и не требует дорогостоящего оборудования. Основное ограничение метода разделения фаз — невозможность создания высокоупорядоченных материалов сложной геометрической формы.

Получаемые по данной технологии поверхности с наноразмерной топографией активируют адгезию, пролиферацию и дифференциацию клеток. Например, упоминавшиеся выше клетки MC3T3-E1 на поверхности каркасов из нановолокон поли-*L*-молочной кислоты (PLLA) проявляют большую активность, чем на контрольных поверхностях из того же материала, полученных методом твердофазного формования с термическим разделением фаз [96]. Выращенные на описанных каркасах культуры отличает большое число клеток и высокая экспрессия остеокальцина и сиалопротеина. Одновременно на нановолокнах наблюдается пониженная экспрессия коллагенов типа I, что, возможно, объясняется более быстрой дифференциацией преостеобластов [96]. В работе [99] показано, что на поверхности каркасов из волокон PLLA диаметром 200 нм, полученных методом разделения фаз, усиливается дифференциация стволовых нервных клеток и рост нейритов. На рис. 10.5 представлены микрофотографии стволовых клеток С17-2 мозжечка новорожденных мышей на поверхности кар-

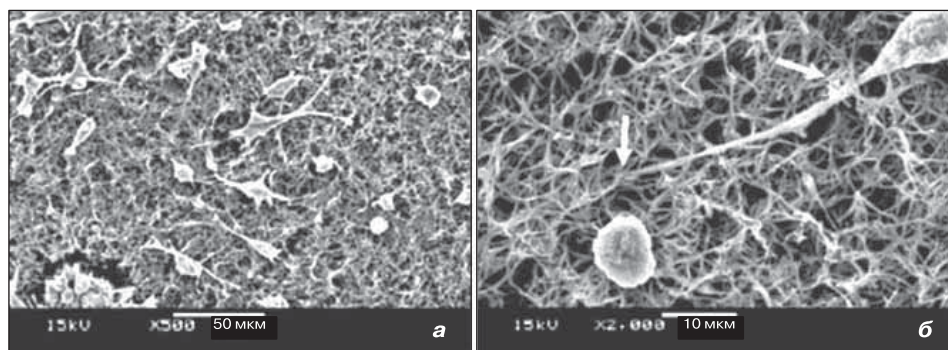


Рис. 10.5. СЭМ-микрофотографии стволовых клеток мозжечка новорожденных мышей, выращенных на каркасах из нановолокон поли-*L*-молочной кислоты, полученных методом разделения фаз: *a* — общий вид культуры через 1 день после посева (увеличение 500×); *б* — дифференцированные клетки с нейритами, проникающими внутрь каркасов из нановолокон (показаны стрелками, увеличение 2000×). Перепечатывается с разрешения из работы [99]

касов, где четко различимы дифференцирующиеся клетки с нейритами, проникающими внутрь каркасов [99]. Таким образом, волоконные структуры могут заменять (имитировать) внеклеточные матриксы и поддерживать адгезию, пролиферацию и экспрессию фенотипа культивируемых клеток.

10.2.7. Поверхности, полученные методом коллоидной литографии

Путем коллоидной литографии можно легко формировать поверхности с выпуклостями и углублениями заданных размеров. В этой технологии вместо масок при травлении используются наносимые на поверхность коллоидные растворы. Входящие в их состав частицы под воздействием электростатических сил образуют на подложке участки мономолекулярного слоя. Эти участки вместе с поверхностным слоем затем протравливают, в результате образуется поверхность требуемой топографии. Для травления могут использоваться методы электронно-лучевой обработки (с применением химических реагентов), ионная бомбардировка поверхности с испарением пленки на неровностях и т. д.

Свойства и характеристики получаемой топографической подложки регулируются несколькими параметрами: размером коллоидных частиц, ионной силой раствора, степенью покрытия монослоем и т. д. Коллоидная литография — относительно дешевый, легкий и достаточно быстрый метод формирования крупных топографических особенностей, но с ее помощью трудно получить геометрические структуры со сложной геометрией, поэтому применение коллоидной литографии, как правило, ограничивается созданием обычных колонок и канавок. Впрочем, выращивание клеток разных типов на поверхностях со столь простыми особенностями уже позволило выявить интересные структурные, морфологические и фенотипические закономерности [37, 43, 44, 100–105].

Например, обнаружено, что на полученных данным методом поверхностях с наностолбиками (средняя высота — 160 нм, диаметр — 100 нм, расстояние между столбиками — 230 нм) фибробласты человека типа h-tert VJ1 распространяются хуже, чем на контрольных плоских подложках [100]. При этом снижается уровень экспрессии генов по сравнению с клетками, культивируемыми на обычных поверхностях. Кроме того, экспрессия некоторых генов (в частности, ответственных за передачу сигналов между клетками, заживление повреждений, пролиферацию и дифференциацию) активизируется, а некоторых других (ответственных за синтез коллагена и формирование цитоскелета), наоборот, ослабляется. Предполагается, что наблюдаемые различия в уровне экспрессии обусловлены вышеупомянутым слабым распространением клеток на поверхностях с наноособенностями [100]. Дело в том, что образующиеся на вершинах колонок фибробласты приобретают форму звезд и обладают менее развитой морфологией. У таких фибробластов более длинные филоподии, позволяющие клеткам сильнее взаимодействовать с наноколонками [103].

Попытка провести эндоцитоз фибробластов на колонках закончилась неудачей [37]. При кратковременном культивировании (180 мин) на поверхностях с колон-

ками фибробласты человека менее адгезивны и распространяются с малой скоростью по сравнению с ростом на плоских подложках [101]. При этом у фибробластов на колонках наблюдается меньше высокоорганизованных цитоскелетов актина и виментина, хотя цитоскелеты тубулина сохраняют упорядоченную структуру [101]. В работе [102] поверхность кремниевой пластины модифицировали путем нанесения 50-нанометрового слоя коллоидных частиц золота, что позволило осуществить прямой контакт первичных клеток эпитеинона крысы с клетками периферической мембраны. На поверхности колонок с диаметрами 58, 91, 111 и 166 нм панкреатические эпителиальные клетки крыс развиваются быстрее, чем на контрольных плоских подложках, причем скорость развития возрастает пропорционально увеличению диаметра колонок [44]. Также наблюдалось выстраивание в ряд растущих эпителиальных клеток НТВ4 (рак мочевого пузыря) вдоль длинных канавок глубиной 184 нм [43]. Затем были проведены опыты с клетками, культивируемыми на топографических поверхностях с полусферами высотой 100 нм и диаметром 167 нм. Ранее предполагалось, что на таких подложках рост клеток происходит с меньшей скоростью и повышенным содержанием звездообразных (а не округлых) форм по сравнению с контрольными образцами. В экспериментах с клетками цитокина на поверхностях с нанотопографическими особенностями обоих типов (колонок и полусфер) в поведении культуры не зарегистрировали никаких изменений, однако было выявлено ослабление роста клеток IL-6 и IL-8 [43]. Заметное выстраивание клеток вдоль канавок наблюдалось при выращивании эпителиальных клеток HC11 молочной железы мышей на поверхностях с углублениями 40–400 нм с непрерывными или прерывистыми кромками: на поверхностях с непрерывными кромками также происходили повышенная ориентация и заметное удлинение клеток [104]. Для наблюдения химических эффектов в работе [105] проводилось культивирование клеток на нескольких поверхностях с полусферами, распределенными с разной плотностью, высотой 110 нм, покрытых тонкой пленкой оксида титана. Данные поверхности индуцируют выделение агентов, активирующих хемотаксические макрофаги, что влечет за собой образование стрессорных волокон и фибронектина из первичных макрофагов. В этой же работе показано, что на таких поверхностях клетки первичных остеобластов человека мигрируют, удаляясь от нанотопографических особенностей, которые, по-видимому, вызывают соответствующие клеточные реакции (удлинение форм, усиление или ослабление межклеточной адгезии и пролиферации, изменение дифференциации и увеличение подвижности).

10.2.8. Поверхности с хаотическим расположением нановолокон, полученные электроформованием

Пористая матрица или подложка со случайно распределенными нановолокнами способны заметно влиять на межклеточную адгезию, рост, пролиферацию и экспрессию генов при культивировании клеток разного типа. Например, фибробласты мыши прикрепляются к таким подложкам, мигрируют по порам и легко интегрируются в состав нановолокон на основе сополимера молочной

и гликолиевой кислот (ПГМК), поэтому дальнейшее развитие клеток определяется архитектурой матрицы и подложки [106]. У фибробластов изменяется морфология (они превращаются из сплюснутых и плоских в округлые и веретенообразные), особенно на поверхностях, прилегающих к плоским участкам волокон [107]. На химически модифицированных нановолокнах из желатина, обладающих повышенной механической прочностью и термостабильностью, наблюдалось усиление пролиферации фибробластов клеток кожи человека, а также линейное возрастание их числа [108]. На каркасе из полистирольных волокон отмечено заметное (по сравнению с контрольными образцами) увеличение прикрепления клеток гладких мышц, причем ECN, получаемый на поверхности ориентированных волокон, напоминает нативную ткань цисты мочевого пузыря [109]. При длительном выращивании клеток MC3T3-E1 на нановолокнах фиброина шелка наблюдалось увеличение числа клеток, а также количества остеокальцина и щелочной фосфатазы [110, 111]. Каркасы нановолокон фиброина шелка *in vivo* были биологически совместимы и способствовали регенерации костной ткани без каких-либо воспалительных реакций [111]. Клетки гладких мышц (SMC) венечной артерии человека, выращенные на нановолокнах из поликапролактона и коллагена, имели нормальный фенотип, а дополнительное покрытие волокон коллагеном способствовало миграции SMC внутрь каркасов с дальнейшим образованием ткани гладких мышц [112–114]. Морфология и основные характеристики выращенных на полиамидных волокнах фибробластов NIH 3T3 и нормальных клеток крысиной почки совпадают с нативными характеристиками данных клеток, культивируемых *in vivo* [115]. В работе [116] показано, что на нановолокнах состава желатин–поликапролактон активируются прикрепление и пролиферация стромальных клеток костного мозга, причем клетки способны мигрировать внутрь каркасов. Усиление пролиферации миобластов H9c2 сердечных клеток крысы при выращивании на нановолокнах состава полианилин–желатин было зарегистрировано в работах [117, 118]. Интересно, что в начале культивирования наблюдалось большое разнообразие в дифференциации клеток, однако через неделю распределение клеток по видам и морфологии на всех волоконных каркасах выровнялось.

Гепатоциты, выращенные на галактозилированных нановолокнах PCLEEP сложного состава, сополимеры ϵ -капролактона и эфиров этиленфосфата по своим характеристикам не отличаются от контрольных клеток, однако у них наблюдаются некоторые морфологические изменения. Культивируемые на плоских поверхностях гепатоциты обычно имеют сферическую форму с диаметром 50–300 мкм, а на поверхности нановолокон формируются более мелкие образования размером 20–100 мкм [119]. На подложках с более случайной и перемешанной топографией (волокна диаметром от 140 нм до 2,1 мкм) наблюдается повышенная плотность клеток-предшественников костной ткани MC3T3-E1 и факторов роста по сравнению с аналогичной культурой, выращенной на гладкой поверхности. Плотность данных клеток возрастает с увеличением диаметра волокон, хотя экспрессия APL (щелочной фосфатазы) не зависит от топографии поверхности [120]. Интересные морфологические особенности наблюдались

при культивировании клеток остеобластов на микро- и нановолокнах из смеси крахмала и поликапролактона [121]. Вводимые в такие микроволоконные каркасы остеобласты начинают формировать «мостики» между волокнами, причем клетки внутри мостиков более плоские и вытянутые. В работе [122] изучалось поведение стромальных клеток костного мозга свиньи на подложках в виде нано- и микрокаркасов (из переплетенных нановолокон, полученных электроформованием), и было обнаружено, что на данных структурах клетки развиваются активнее, чем в контрольных образцах. В частности, наблюдались более интенсивное присоединение клеток к подложке и быстрая пролиферация, а также повышенная экспрессия коллагенов типа I, декорина и генов бигликана. При исследовании эндотелиальных клеток пупочной вены человека на матрице из нановолокон сополимера *L*-молочной кислоты и ϵ -капролактона показано, что клеточная адгезия и распространение клеток по поверхности волокон диаметром 0,3–1,2 мкм подавлены по сравнению с аналогичными процессами на волокнах большего диаметра — 7,0 мкм [123].

10.2.9. Поверхности, полученные химическим травлением

Химическое травление издавна применяется для модификации поверхностей, позволяя изменять степень их шероховатости и создавать нанометрические топографические особенности. Травление обычно происходит путем нанесения на поверхность гидроксида натрия NaOH, азотной кислоты HNO₃, плавиковой кислоты HF и т. п., а вид травящих агентов зависит от свойств материала [124–127]. Структура обрабатываемой поверхности нарушается, и на ней образуются ямки или другие неровности разных размеров, вплоть до нанометрических. Шероховатость создаваемой подложки регулируется по-разному: временем воздействия, видом и концентрацией травящих агентов и т. д. Технологическими удобствами процесса являются скорость, простота и экономичность, а к недостаткам относят невозможность получения точных особенностей. Экспериментально доказано, что образующиеся с помощью этой методики нанометрические структуры могут влиять на поведение культивируемых клеток [124–127].

В работе [124] изучались свойства поверхностей из так называемых компактов с нанесенными на них металлическими частицами селена микро- и нанометровых размеров, интерес к которым вызван их возможным применением в качестве покрытий с антиканцерогенными свойствами в ортопедических устройствах. В опытах изучалось поведение клеток на подложках из вышеупомянутых материалов с дополнительной обработкой: на первом этапе поверхности придавали наномасштабную шероховатость (путем химического травления растворами гидроксида натрия различной концентрации), на втором — наносили частицы селена микро- и нанометровых размеров. Данные по культивированию клеток на таких подложках сравнивались с контрольными образцами, где в качестве подложки использовались обычные поверхности с нанесенными микрочастицами селена и титана. Эксперименты по выращи-

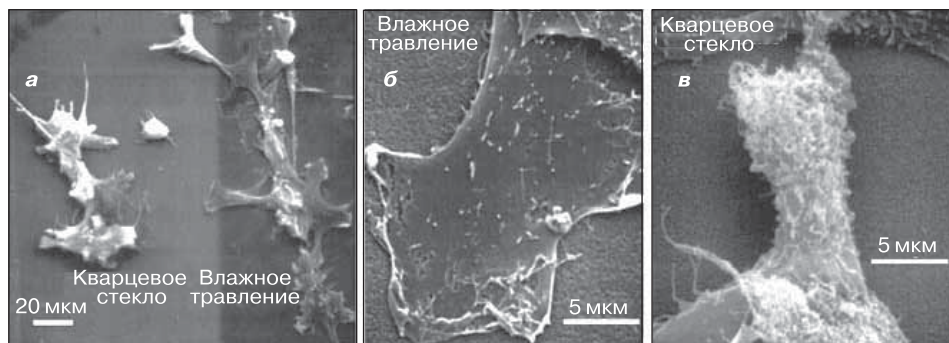


Рис. 10.6. Трансформация клеток астроцитов линии LRM55 на немодифицированной поверхности кварцевого стекла (*a, слева*) и на той же поверхности, подвергнутой влажному травлению (*a, справа*). При увеличении (*б* и *в*) видно, что на поверхности, подвергнутой влажному травлению, клетки более плоские и их фиксация на подложке прочнее, в то время как на необработанной поверхности клетки закреплены слабее. Перепечатывается с разрешения из работы [125]

ванию остеобластов *in vitro* (в течение 24 часов при стандартных условиях) показали, что плотность остеобластов в протравленных образцах была выше [124]. В работе [125] особенности культивирования изучались на кремниевых пластинах с колонками, подвергнутыми мокрому химическому травлению для создания наномасштабной шероховатости. При выращивании астроцитов на этих поверхностях наблюдалась высокая степень трансформации (по сравнению с контрольными опытами на немодифицированных кремниевых поверхностях), что хорошо видно на микрофотографиях (рис. 10.6) [125].

Также обнаружено, что увеличение времени травления усиливает селективную адгезию и расплывание астроцитов по поверхности, что объясняется большей площадью контакта. С другой стороны, первичные корковые астроциты новорожденных крысят развиваются на обычном стекле интенсивнее, чем на протравленных поверхностях, возможно, по причине различия типов изучаемых клеток [125]. Клетки гладких мышц мочевого пузыря, культивируемые на поверхностях ПМГК и полиуретане (ПУ) с нанесенными травлением наноструктурами, отличаются повышенной адгезией и пролиферацией, что, конечно, вызвано изменениями химических свойств поверхности и ее шероховатости, обусловленной длительным травлением [126]. При выращивании клеток на поверхностях ПМГК с наноструктурными особенностями (создаваемыми травлением) число регистрируемых клеток значительно выше, чем на поверхностях с субмикронными структурами, а также на контрольных подложках из необработанного стекла. Неоднозначно ведут себя клетки и на поверхностях ПУ, где увеличение наноразмерных неоднородностей не приводит к усилению пролиферации, хотя на химически обработанных поверхностях с субмикронной ше-

роховатостью число клеток выше, чем на контрольных плоских подложках [126]. Придание дополнительной шероховатости поверхности ПМГК значительно увеличивает число клеток витронектина и фибронектина, абсорбируемых из сыворотки, по сравнению с необработанной плоской подложкой ПМГК [127]. Адсорбция повышенного количества белков (фибронектина и витронектина) и возрастание плотности клеток гладких мышц сосудов и эндотелиальных клеток могут быть объяснены наличием на этих белках сайтов узнавания. Также обнаружено, что блокировка связывающих клетки эпитопов фибронектина и витронектина приводит к значительному уменьшению адгезии сосудистых клеток на поверхностях с наноразмерными шероховатостями [127].

10.2.10. Поверхности углеродных нанотрубок и нановолокон

Углеродные наноструктуры в виде нанотрубок и нановолокон обладают очень интересными физико-химическими свойствами и уже нашли множество любопытных технических применений. Углеродные нановолокна с волокнистой структурой уже производятся в разных формах (прямых, спиральных или даже в виде так называемых рыбьих скелетов), зависящих от типа используемых при синтезе металлических катализаторов.

В настоящее время есть три основных метода изготовления углеродных наноструктур в промышленном масштабе. Это дуговой электрический разряд, лазерная абляция и каталитическое осаждение из паровой фазы. Обычно при протекании этих процессов образуется смесь различных углеродных наноструктур (многослойных и однослойных углеродных нанотрубок, фуллеренов, а также большое количество сажи и углеродных наночастиц), так что конечные продукты необходимо очищать, а затем проводить разделение компонентов. Производительность (выход требуемого типа наноструктур) зависит от применяемого метода и условий процесса. На сегодняшний день разработаны методики, позволяющие получать углеродные наноструктуры диаметром 5–100 нм и длиной несколько микрометров с очень высокими механическими, электрическими и поверхностными свойствами, используемые в различных биомедицинских областях, включая создание клеточных каркасов [128–138].

В опытах с культивированием остеобластов (в течение 21 дня *in vitro*) обнаружено, что многослойные углеродные нановолокна (диаметром 60–200 нм) заметно влияют на размеры и другие особенности растущих клеток. Сравнение проводилось с аналогичными культурами, выращиваемыми на тонком слое углерода (использовали более толстую подложку из боросиликатного стекла). В частности, показано, что уменьшение диаметра углеродных волокон усиливает пролиферацию остеобластов и синтез щелочной фосфатазы, а также вызывает отложение кальция [129]. При изучении зависимости характеристик культивируемых клеток разных типов (osteoblastы, fibroblastы, хондроциты, клетки гладких мышц) от диаметра углеродных нановолокон (60–200 нм) было отмечено [130] повышение адгезии остеобластов, вызванное уменьшением диаметра волокна, что подтверждало результаты работы тех же авторов [129],

впрочем, данная зависимость не свойственна другим типам клеток. Более того, в некоторых системах регистрировалась обратная зависимость, например, адгезия фибробластов, хондроцитов и клеток гладких мышц с утоньшением волокон уменьшалась. Дальнейшие эксперименты, проведенные на композитных материалах ПМГК с углеродными волокнами, подтвердили усиление адгезии остеобластов при уменьшении дисперсии величины диаметра волокон [130]. Опыты с многослойными наноуглеродными трубками показали биосовместимость нанотрубок с кардиомиоцитами в культуре, хотя путем микроскопических исследований были выявлены незначительные модификации формы клеток, вызванные связыванием углеродных структур с клеточными мембранами. Отметим, что некоторые отклонения в числе и форме клеток начинали проявляться лишь на третий день роста [128]. В работах [131, 132] изучался рост астроцитов и остеобластов на углеродных волокнах, входящих в состав поликарбонатуретановых композитов; была обнаружена зависимость адгезии данных клеток от диаметра волокон. Осаждение и размножение астроцитов преимущественно происходят на углеродных нановолокнах большого диаметра. Иногда зависимости носят более сложный характер, например остеобласты в основном разрастаются на композитах с высоким процентным содержанием углеродных волокон, в то же время адгезия и пролиферация астроцитов на этих композитах ослаблены [131, 132], а аналогичные процессы в нейронах усиливаются [131].

При культивировании клеток саркомы ROS 17/2.8 на поверхности химически модифицированных однослойных и многослойных нанотрубок была обнаружена повышенная пролиферация остеобластов. На электрически нейтральных нанотрубках наблюдался усиленный рост клеток и образование пластинчатых кристаллов.

Особенно сильные и заметные изменения морфологии происходили при выращивании остеобластов на многослойных нанотрубках [133]. Было показано также, что варибельность остеобластов и фибробластов возрастает на многослойных нанотрубках высокой химической чистоты, а сами нанотрубки способствуют усилению экспрессии коллагена на этих клетках [135]. Установлено, что высокая чистота многослойных нанотрубок и фуллеренов существенно понижает токсичность материалов по отношению к человеческим макрофагам и не вызывает выделения оксида азота из мышинных макрофагов *in vitro* [134]. Наличие многослойных нанотрубок вызывает выделение провоспалительного цитокин-интерлейкина-8 из кератиноцитов кожи человека [136]. Интересно, что композиты, в состав которых входят коллаген и гели многослойных нанотрубок, сохраняют биосовместимость и поддерживают жизнеспособность клеток гладких мышц *in vitro* на уровне более 85% в течение 7 дней [137]. Опыты с применением многослойных нанотрубок и структур в виде так называемых нанолуковиц показали, что последние позволяют повысить соотношение апоптоз/некроз у фибробластов кожи. Этот факт подтверждает сильное иммунное и противовоспалительное воздействие нанолуковиц, что также согласуется с данными по изменению экспрессии генов, ответственных

за клеточный перенос, метаболизм, регулирование жизненных циклов и реакции на стресс [138].

10.2.11. Поверхности, полученные методом расслаивания полимеров

На расслаивании полимеров основан один из распространенных нанотехнологических приемов, позволяющих относительно низкозатратно и эффективно создавать большие по площади структурированные поверхности [139, 140]. Очень кратко поясним, что основная идея метода состоит в спонтанном разделении фаз полимерной смеси на поверхности кремниевой пластинки. При этом возникают разнообразные нанотопографические особенности (углубления, островки или ленты разной глубины и рельефа), форма которых определяется концентрацией и составом смеси. Изменяя соотношение компонентов в исходной полимерной смеси, можно создавать поверхности с разным типом и размерами особенностей, включая подложки с хаотическим покрытием. Методика позволяет точно регулировать размеры рельефа создаваемой поверхности только по вертикали, но не по горизонтали, что приводит к созданию наноструктур заданной высоты и глубины со случайно распределенными особенностями: островками, углублениями или лентами. В ряде работ показано, что данные поверхности могут заметно изменять поведение культивируемых клеток [38, 41, 53, 139–149].

Группа исследователей во главе с М. Дэлби опубликовала ряд работ, посвященных взаимодействию фибробластов с подложками в виде поверхности с островками различной высоты [141–145, 149]. Тщательное изучение позволило выявить влияние нанотопографических поверхностей на экспрессию различных генов. Наблюдение за ростом фибробластов человека на полимерных подложках с островками высотой 13 нм, формируемыми данным методом, проводилось с использованием методики анализа по микрообласти из 1718 генов, в результате было установлено, что многие генетические изменения связаны с процессами передачи сигналов, поведением цитоскелетов, транскрипцией генов ВКМ и трансляцией протеинов. Всего было выявлено 584 гена, экспрессия которых подвергалась положительной регуляции (обратной связи), т. е. дифференциация фибробластов на поверхностях с описанными особенностями происходила интенсивнее, чем на контрольных плоских подложках. В работе [53] показано, что фибробласты на поверхностях схожей топографии развиваются с помощью большего числа филоподий, возникающих из клеточных мембран (рис. 10.7). Необычное поведение клеток наблюдалось в работе [38] при взаимодействии фибробластов с нанесенными на поверхность наноструктурами различной высоты (13, 35 и 95 нм), где взаимодействие фибробластов усиливалось с увеличением размера островков, о чем свидетельствуют особо крупные выпуклости филоподий на островках высотой 95 нм. С другой стороны, наиболее интенсивная пролиферация (с образованием высокоразвитых цитоскелетов актина, тубулина и виментина) происходила во время роста клеток на поверхнос-

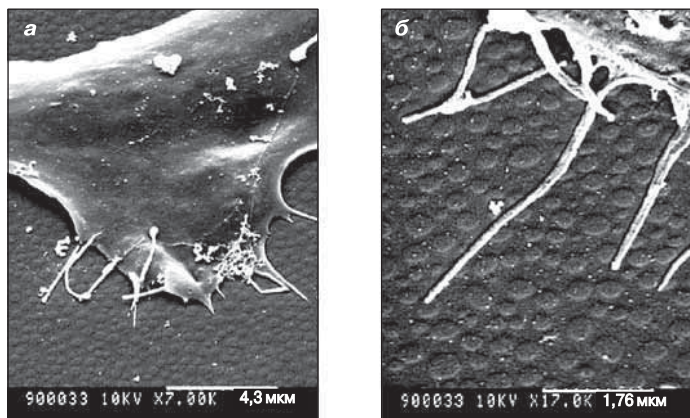


Рис. 10.7. СЭМ-микрофотографии фибробластов человека на поверхности с островками высотой 13 нм, полученной методом расщипывания полимерных смесей полистирол/поли(4-бромстирол). Сильное взаимодействие филоподий с nanoостровками отчетливо проявляется на снимках низкого (*a*) и высокого (*б*) разрешения изображения. Перепечатывается с разрешения из работы [53]

ти с островками высотой 13 нм, тогда как на островках высотой 95 нм наблюдалась лишь ограниченная пролиферация и слабое размножение клеток с практически неразвитыми цитоскелетами [38].

Используя полимерные смеси полистирол/поли(*n*-бутилметакрилат) и методику расщипывания полимеров, авторам работы [142] удалось создать топографические особенности высотой 90 и 40 нм на поверхности нейлоновых трубок (с внутренними диаметрами 0,5 и 1,5 мм) и изучить поведение клеток. Фибробласты на контрольных поверхностях обычных трубок распространялись интенсивнее и характеризовались более нормальным распределением β -тубулина, а на трубках с топографическими особенностями фибробласты зачастую обладали звездчатой морфологией с более округлой клеточной структурой и низким уровнем организации. При этом клеточные мембраны на особенностях выглядели шероховатыми (гофрированными) и имели очень длинные филоподии, взаимодействующие с поверхностными nanoостровками. Отметим, что выращенные на всех поверхностях (с трубками двух разных диаметров и разной высотой островков) клетки проявляли одинаковые иммунные и клеточные реакции.

В работе [143] изучалось взаимодействие первичных фибробластов человека с островками различной высоты на нанотопографических поверхностях. Было показано, что по сравнению с контрольными образцами рост фибробластов на поверхностях с островками высотой 10 нм на протяжении всего времени культивирования характеризуется повышенной адгезией и разрастанием клеток, образованием полноценных цитоскелетов, правильной морфологией и наличием ламеллиподий с проявленным напряжением волокон. С другой

стороны, при выращивании на поверхностях с островками высотой 50 нм наблюдается ослабление межклеточной адгезии, низкое содержание разросшихся клеток, слабое развитие цитоскелета с очень небольшим количеством ламелл и отсутствие напряженных волокон [143]. Изучение процессов роста на подобных поверхностях позволит в будущем создавать подложки со слабой адгезией клеток, что очень важно при разработке биоматериалов, используемых для изготовления стентов и сердечных клапанов. При культивировании фибробластов в течение 4 дней на поверхности с островками высотой 27 нм показано, что занятая растущей культурой площадь значительно превышает таковую на контрольной плоской поверхности [144]. При этом на обеих подложках наблюдалось образование высокоорганизованных цитоскелетов с актином и тубулином, однако число стрессорных волокон (тоноволокн) на поверхности с островками высотой 27 нм было заметно выше. В контрольном образце к 30-му дню роста возникал хорошо структурированный виментин, в то же время на поверхности с островками высотой 27 нм его организация по-прежнему оставалась очень слабой. При длительном выращивании на подложке с островками высотой 95 нм исследователи отметили значительные различия и в морфологии, и в цитоскелетах клеток [145]. На таких островках фибробласты начинали образовывать ламеллы и филоподии уже через 5 мин после посева, причем взаимодействие между филоподиями и островками постоянно усиливалось. С возрастанием длительности культивирования происходило возрастание дифференциации морфологии фибробластов, увеличение числа звездчатых структур и интенсивности образования псевдоподий. После 3 недель роста наблюдалось образование небольшого числа очагов из сгруппированных клеток и большого числа изолированных клеток, причем последние отличались сильным взаимодействием с островками. Напротив, на плоских контрольных поверхностях обычно развивались фибробласты нормальной морфологии, через неделю они начинали сливаться. На периферии клеток возникали многочисленные стрессорные волокна, которые в момент зарождения были протянуты через цитоплазму к наноостровкам. Позже в контрольных образцах наблюдали вполне оформившиеся цитоскелеты (с четко выраженными стрессорными волокнами актина и тубулином), в то же время растущие на островках клетки имели лишь слабо организованные цитоскелеты [145]. Особенности взаимодействия фибробластов с наноостровками разной высоты показаны на схеме (рис. 10.8), иллюстрирующей роль и участие высоты нанотопографических особенностей (в данном случае наноостровков) на активность клеток.

Тенденция к образованию филоподий, напоминающая описанное выше поведение фибробластов, наблюдалась и при культивировании клеток человеческого костного мозга (предшественников костной ткани) на поверхности с топографическими особенностями высотой менее 10 нм. Авторы работы [146] показали, что эти клетки способны образовывать закрученные структуры вокруг наноособенностей, в отличие от структур с нормальной морфологией и распределением на плоских контрольных поверхностях. При сравнении с контрольными посевами, на топографических поверхностях легко заметить

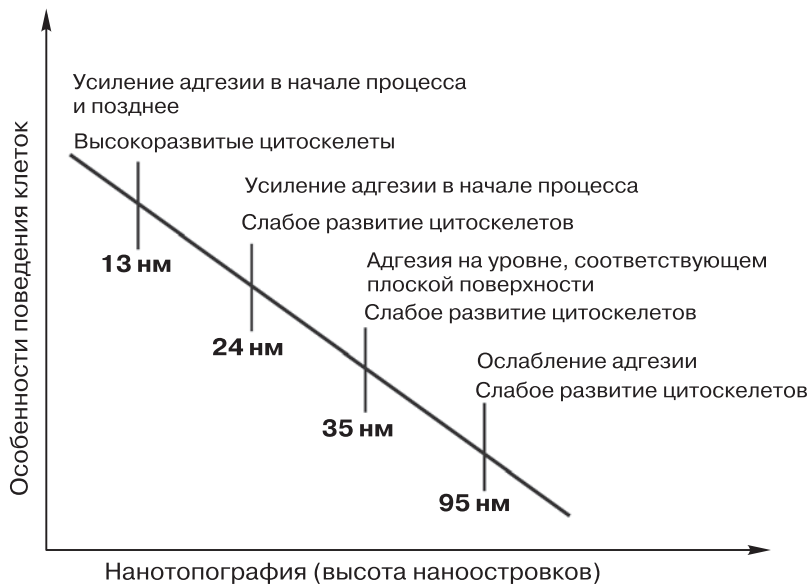


Рис. 10.8. Поведение культуры клеток на поверхностях с нанотопографическими особенностями, полученными методом расщепления полимеров из смеси полистирол–поли(4-бромстирол). Фибробласты, растущие на поверхности с островками высотой 13 нм, характеризуются повышенной адгезией, пролиферацией и образованием развитых цитоскелетов. Легко заметить общее понижение этих характеристик с увеличением высоты наноструктур на поверхности

возникновение хорошо сформированных цитоскелетов со стрессорными волокнами актина, создающими обширную сетку из тубулина и виментина. Мезенхимная дифференциация проявляется посредством экспрессии данными клетками больших количеств остеокальцина и остеопонтин на особенностях в течение трех недель культивирования [146]. Использование метода центробежной отливки позволяет создавать наносоособенности (углубления и колонки с размерами в диапазоне 3–29 нм) на поверхностях из полимерной смеси PLLA–полистирол [147]. При посеве на такие подложки адгезия фетальных клеток остеобластов человека была значительно сильнее, чем в контрольных образцах, причем всегда максимальные значения адгезии были зарегистрированы именно на наноразмерных островках. Однако при обсуждении этих результатов следует помнить, что клеточная адгезия также зависит от многих небиологических параметров, в частности от химического состава поверхности и ее способности к смачиванию [147]. Поведение фетальных клеток остеобластов человека при культивировании на подложках со случайно распределенными наноструктурами (высотой 11, 38 и 85 нм) очень похоже на описанное выше поведение фибробластов [148]. Клетки остеобластов, выращиваемые на поверхности с островками высотой 11 нм, проявляли большую активность по сравне-

нию с культурами, высеванными на плоские поверхности или поверхности с более крупными островками. В частности, у данных клеток наблюдались более высокие скорости распространения, пролиферации и образования сигнальных структур, связанных с винкулином, стрессорными волокнами актина и экспрессией щелочной фосфатазы ALP, выступающей в роли стандартного маркера костной ткани.

В работе Дэлби с сотрудниками [41] показано, что поведение эндотелиальных клеток человека, выращиваемых на поверхностях с nanoостровками высотой 13, 35 и 95 нм, зависит от размера указанных неоднородностей. Наиболее сильной клеточной и иммунной реакциями отличаются клетки, культивируемые на подложках с особенностями высотой 13 нм. Такие клетки также обладали более развитой морфологией и цитоскелетом, чем контрольные аналоги или клетки, растущие на покрытиях с более крупными nanoостровками. В работе [149] исследовали поведение разных типов человеческих клеток (одноядерных клеток крови, тромбоцитов, фибробластов и эндотелиальных клеток) на поверхностях с островками высотой 95 нм. Сравнение выращенных на таких поверхностях клеток крови с контрольными культурами не выявило существенных отличий, а разница в иммунном ответе была минимальной. Небольшие отличия наблюдались лишь у фибробластов (округлая морфология, понижение пролиферации и слабое развитие цитоскелета) и эндотелиальных клеток, которые на подложках с островками приобретали искривленную форму.

10.3. Заключение

В настоящее время существуют методы, позволяющие легко и точно создавать достаточно большие по площади поверхности с различными особенностями в виде сложных геометрических фигур нанометрических размеров. Эти поверхности применяются для исследования клеток при культивировании, в ходе которого изучаются их поведение и способы контроля за ними на поверхностях раздела или контакта с другими биомедицинскими материалами путем модификации химического состава и свойств подложек. В частности, возможно получение клеток с заданными биологическими характеристиками (избирательной адгезией, миграцией, пролиферацией, экспрессией клеточных фенотипов и т. д.), что позволит создавать «каркасы» для тканевой инженерии и биомедицинских имплантатов следующего поколения.

Литература

1. Flemming R.G., Murphy C.J., Abrams G.A., Goodman S.L., Nealey P.F. Effects of synthetic micro- and nano-structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 1999; 20: 573–588.
2. Valko K., Reynolds D.P. High-throughput physicochemical and in vitro ADMET screening: a role in pharmaceutical profiling. *Am. J. Drug Deliv.* 2005; 3: 83–100.

3. Riley R.J., Kenna J.G. Cellular models for ADMET predictions and evaluation of drug–drug interactions. *Curr. Opin. Drug Discov. Dev.* 2004; 7: 86–99.
4. Zhu X. Cellular reactions of osteoblasts to micron- and submicron-scale porous structures of titanium surfaces. *Cells Tissues Organs* 2004; 178: 13–22.
5. Watt F.M. The extracellular matrix and cell shape. *Trends Biochem. Sci.* 1986; 11: 482–485.
6. Adams J.C. Cell–matrix contact structures. *Cell Mol. Life Sci.* 2001; 58: 371–392.
7. Streuli C. Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1999; 11: 634–640.
8. Mendes de Aguiar C.B.N., Lobao-Soares B., Alvarez-Silva M., Trentin A.G. Glycosaminoglycans modulate C6 glioma cell adhesion to extracellular matrix components and alter cell proliferation and cell migration. *BMC Cell Biol.* 2005; 6: 1–8.
9. Chiquet M. Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biol.* 1999; 18: 417–426.
10. Abrams G.A., Murphy C.J., Wang Z.Y., Nealey P.F., Bjorling D.E. Ultrastructural basement membrane topography of the bladder epithelium. *Urol. Res.* 2003; 31: 341–346.
11. Abrams G.A., Goodman S.L., Nealey P.F., Franco M., Murphy C.J. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res.* 2000; 299: 39–46.
12. Stoitzner P., Pfaller K., Stössel H., Romani N. A close-up view of migrating Langerhans cells in the skin. *J. Invest. Dermatol.* 2002; 118: 117–125.
13. Abrams G.A., Schaus S.S., Goodman S.L., Nealey P.F., Murphy C.J. Nanoscale topography of the corneal epithelial basement membrane and Descemet’s membrane of the human. *Cornea* 2000; 19: 57–64.
14. Askari J.A., Humphries M.J. Cell–matrix interactions. *Encyclop. Biol. Chem.* 2004; 1: 362–366.
15. Mueller U. Integrins and extracellular matrix in animal models. *Handbook Exp. Pharmacol.: Cell Adhes.* 2004; 165: 217–241.
16. Juliano R.L., Haskill S. Signal transduction from the extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 1993; 120: 577–585.
17. Mousa S.A., Cheresh D.A. Recent advances in cell adhesion molecules and extracellular matrix proteins: potential clinical applications. *DDT* 1997; 2: 187–199.
18. Perris R., Perissinotto D. Role of the extracellular matrix during neural crest cell migration. *Mech. Dev.* 2000; 95: 3–21.
19. Boudreau N.J., Jones P.L. Extracellular matrix and integrin signalling: the shape of things to come. *Biochem. J.* 1999; 339: 481–488.
20. Engel J. EGF-like domains in extracellular matrix proteins: localized signals for growth and differentiation? *FEBS Lett.* 1989; 251: 1–7.
21. Yellowley C.E., Hancox J.C., Donahue H.J. Effects of cell swelling on intracellular calcium and membrane currents in bovine articular chondrocytes. *J. Cell Biochem.* 2002; 86: 290–301.
22. Yap A.S., Kovacs E.M. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 2003; 160: 11–16.
23. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering. *Science.* 1993; 260: 920–926.
24. Norman J.J., Desai T.A. Methods for fabrication of nanoscale topography for tissue engineering scaffolds. *Ann. Biomed. Eng.* 2006; 34: 89–101.
25. Vitte J., Benoliel A.M., Pierres A., Bongrand P. Is there a predictable relationship between surface physical-chemical properties and cell behavior at the interface? *Eur. Cell Mater.* 2004; 7: 52–63.

26. Glass-Brudzinski J., Perizzolo D., Brunette D.M. Effects of substratum surface topography on the organization of cells and collagen fibers in collagen gel cultures. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 61: 608–618.
27. Kawahara H., et al. *In vitro* study on bone formation and surface topography from the standpoint of biomechanics. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004; 15: 1297–1307.
28. Berthiaume F., Moghe P.V., Toner M., Yarmush M.L. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J.* 1996; 10: 1471–1484.
29. Braber den E.T., et al. Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 511–518.
30. Karuri N.W. Biological length scale topography enhances cell–substratum adhesion of human corneal epithelial cells. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 3153–3164.
31. Tobasnick G., Curtis A.S.G. Chloride channels and the reactions of cells to topography. *Eur. Cell Mater.* 2001; 2: 49–61.
32. Curtis A., Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 1998; 18: 1573–1583.
33. Chen D., et al. Regulation of integrin expression by substrate adherence. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 23502–23506.
34. Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G., Ingber D.E. Geometric control of cell life and death. *Science.* 1997; 276: 1425–1428.
35. Chou L., Firth J.D., Uitto V.J., Brunette D.M. Effects of titanium substratum and grooved surface topography on metalloproteinase-2 expression in human fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998; 39: 437–445.
36. Dalby M.J., et al. Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13-nm-high polymer demixed islands. *Exp. Cell Res.* 2002; 276: 1–9.
37. Dalby M.J., et al. Attempted endocytosis of nano-environment produced by colloidal lithography by human fibroblasts. *Exp. Cell Res.* 2004; 295: 387–394.
38. Dalby M.J., Riehle M.O., Johnstone H.J., Affrossman S., Curtis A.S. Polymer-demixed nanotopography: control of fibroblast spreading and proliferation. *Tissue Eng.* 2002; 8: 1099–1108.
39. Price R.L., Haberstroh K.M., Webster T.J. Enhanced functions of osteoblasts on nanostructured surfaces of carbon and alumina. *Med. Biol. Eng. Comput.* 2003; 41: 372–375.
40. Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R. Enhanced osteoclastlike cell functions on nanophase ceramics. *Biomaterials* 2001; 22: 1327–1333.
41. Dalby M.J., Riehle M.O., Johnstone H., Affrossman S., Curtis A.S. *In vitro* reaction of endothelial cells to polymer demixed nanotopography. *Biomaterials* 2002; 23: 2945–2954.
42. Thapa A., Webster T.J., Haberstroh K.M. Polymers with nano-dimensional surface features enhance bladder smooth muscle cell adhesion. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003; 67A: 1374–1383.
43. Andersson A.S., et al. Nanoscale features influence epithelial cell morphology and cytokine production. *Biomaterials* 2003; 24: 3427–3436.
44. Andersson A.S., Brink J., Lidberg U., Sutherland D.S. Influence of systematically varied nanoscale topography on the morphology of epithelial cells. *IEEE Trans. Nanobioscience* 2003; 2: 49–57.
45. Gallagher J.O., McGhee K.F., Wilkinson C.D.W., Riehle M.O. Interaction of animal cells with ordered nanotopography. *IEEE Trans Nanobioscience* 2002; 1: 24–28.

46. Folch A., Toner M. Cellular micropatterns on biocompatible materials. *Biotechnol. Prog.* 1998; 14: 388–392.
47. Curtis A., Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 1997; 8: 1573–1583.
48. Curtis A., Wilkinson C. Nanotechniques and approaches in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 2001; 119: 97–101.
49. Patel N., et al. Spatially controlled cell engineering on biodegradable polymer surfaces. *FASEB J.* 1998; 12: 1447–1454.
50. Wilkinson C.D.W. Nanostructures in biology. *Microelectron Eng.* 1995; 27: 61–65.
51. Barbucci R., et al. Micro and nano-structured surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003; 14: 721–725.
52. Curtis A.S.G., et al. Substratum nanotopography and the adhesion of biological cells. Are symmetry or regularity of nanotopography important? *Biophys. Chem.* 2001; 94: 275–283.
53. Dalby M.J., et al. Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13-nm-high polymer demixed islands. *Exp. Cell Res.* 2002; 276: 1–9.
54. Nair L.S., Bhattacharyya S., Laurencin C.T. Development of novel tissue engineering scaffolds via electrospinning. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004; 4: 659–668.
55. Diehl K.A., Foley J.D., Nealey P.F., Murphy C.J. Nanoscale topography modulates corneal epithelial cell migration. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005; 75A: 603–611.
56. Teixeira A.I., Nealey P.F., Murphy C.J. Responses of human keratocytes to microand nanostructured substrates. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004; 71A: 369–376.
57. Teixeira A.I., Abrams G.A., Bertics P.J., Murphy C.J., Nealey P.F. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J. Cell Sci.* 2003; 116: 1881–1892.
58. Teixeira A.I., et al. The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials.* 2006; 27: 3945–3954.
59. Meyle J., Gultig K., Brich M., Hammerle H., Nisch W. Contact guidance of fibroblasts on biomaterial surfaces. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1994; 5: 463–466.
60. Rajnicek A.M., Mc. Craig C.D. Guidance of CNS growth cones by substratum grooves and ridges: effects of inhibitors of the cytoskeleton, calcium channels and signal transduction pathways. *J. Cell Sci.* 1997; 110: 2915–2924.
61. Rajnicek A.M., Britland S., McCraig C.D. Contact guidance of CNS neurites on grooved quartz: influence of groove dimensions, neuronal age and cell type. *J. Cell Sci.* 1997; 110: 2905–2913.
62. Liliensiek S.J., Campbell S., Nealey P.F., Murphy C.J. The scale of substratum topographic features modulates proliferation of corneal epithelial cells and corneal fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 2006; 79A: 185–192.
63. Braber den E.T., et al. Quantitative analysis of fibroblast morphology on microgrooved surfaces with various groove and ridge dimensions. *Biomaterials* 1996; 17: 2037–2044.
64. Wojciak-Stothard B., Curtis A., Monaghan W., MacDonald K., Wilkinson C. Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography. *Exp. Cell Res.* 1996; 223: 426–435.
65. Clark P., Connolly P., Curtis A.S.G., Dow J.A.T., Wilkinson C.D.W. Topographical control of cell behavior. II. Multiple grooved substrata. *Development* 1990; 108: 635–644.
66. Britland S., et al. Synergistic and hierarchical adhesive and topographic guidance of BHK cells. *Exp. Cell Res.* 1996; 228: 313–325.

67. Hoch H.C., Staples R.C., Whitehead B., Comeau J., Wolf E.D. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* 1997; 235: 1659–1662.
68. Schmidt J.A., Von Recum A.F. Texturing of polymer surfaces at the cellular level. *Biomaterials* 1991; 12: 385–389.
69. Turner S., et al. Cell attachment on silicon nanostructures. *J. Vac. Sci. Technol. B* 1997; 15: 2848–2854.
70. Kumbar S.G., Nair L.S., Bhattacharyya S., Laurencin C.T. Polymeric nanofibers as novel carriers for the delivery of therapeutic molecules. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2006; 6: 2591–2607.
71. Ma Z., He W., Young T., Ramakrishna S. Grafting of gelatin on electrospun poly(*caprolactone*) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. *Tissue Eng.* 2005; 11: 1149–1158.
72. Yang F., Murugan R., Wang S., Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 2603–2610.
73. Lee C.H., et al. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials* 2004; 26: 1261–1270.
74. Xu C.Y., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 877–886.
75. Bhattarai N., Edmondson D., Veiseh O., Matsen F.A., Zhang M. Electrospun chitosanbased nanofibers and their cellular compatibility. *Biomaterials* 2005; 26: 6176–6184.
76. Ma Z., Kotaki M., Inai R., Ramakrishna S. Potential of nanofiber matrix as tissue engineering scaffolds. *Tissue Eng.* 2005; 11: 101–109.
77. Dunn G.A. Contact guidance of cultured tissue cells: a survey of potentially relevance properties of the substratum. In: Bellairs R., Curtis A., Dunn G., editors. *Cell Behavior*. Cambridge: Cambridge University Press; 1982. 247–280.
78. Yim E.K.F., et al. Nanopattern-induced changes in morphology and motility of smooth muscle cells. *Biomaterials* 2005; 26: 5405–5413.
79. Nomura S., et al. Nanopillar sheets as a new type of cell culture dish: detailed study of HeLa cells cultured on nanopillar sheets. *J. Artif. Organs* 2006; 9: 90–96.
80. Lenhert S., Meier M.B., Meyer U., Chi L., Wiesmann H.P. Osteoblast alignment, elongation and migration on grooved polystyrene surfaces patterned by Langmuir–Blodgett lithography. *Biomaterials* 2005; 26: 563–570.
81. Liu X., Smith L., Wei G., Won Y., Ma P.X. Surface engineering of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds via self-assembly technique for bone tissue engineering. *J. Biomed. Nanotechnol.* 2005; 1: 54–60.
82. Cui K., Zhu Y., Wang X.H., Feng Q.L., Cui F.Z. A porous scaffold from bone-like powder loaded in a collagen–chitosan matrix. *J. Bioact. Compat. Polym.* 2004; 19: 17–31.
83. Jun H.W., Paramonov S.E., Hartgerink J.D. Biomimetic self-assembled nanofibers. *Soft Matter*. 2006; 2: 177–181.
84. Hosseinkhani H., Hosseinkhani M., Tian F., Kobayashi H., Tabata Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide-amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. *Biomaterials*. 2006; 27: 5089–5098.
85. Hosseinkhani H., Kobayashi H., Tabata Y. Design of tissue-engineered nanoscaffold using peptide amphiphile for regenerative medicine. *Peptide Sci.* 2005; 42: 341–344.

86. Genove E., Shen C., Zhang S., Semino C.E. The effect of functionalized self-assembling peptide scaffolds on human aortic endothelial cell function. *Biomaterials* 2005; 26: 3341–3351.
87. Silva G.A., et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science* 2004; 303: 1352–1355.
88. Harrington D.A., et al. Branched peptide-amphiphilic as self-assembling coatings for tissue engineering scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res.* 2006; 78A: 157–167.
89. Beniash E., Hartgerink J.D., Storrie H., Stendahl J.C., Stupp S.I. Self-assembling peptide amphiphile nanofiber matrices for cell entrapment. *Acta Biomater.* 2005; 1: 387–397.
90. Zhang S., Gelain F., Zhao X. Designer self-assembling peptide nanofiber scaffolds for 3D tissue cell cultures. *Semin. Cancer Biol.* 2005; 15: 413–420.
91. Smith L.A., Ma P.X. Nano-fibrous scaffolds for tissue engineering. *Colloids Surf. B* 2004; 39: 125–131.
92. Zhang S. Fabrication of novel biomaterials through molecular self-assembly. *Nat Biotechnol.* 2003; 21: 1171–1178.
93. Lutolf M.P., Hubbell J.A. Synthetic biomaterials as instructive extracellular micro-environments for morphogenesis in tissue engineering. *Nature Biotechnol.* 2005; 23: 47–55.
94. Ellis-Behnke R.G., et al. Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 5054–5059.
95. Hosseinkhanian H., Hosseinkhanib M., Tianc F., Kobayashi H., Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide amphiphile nanofibers. *Biomaterials* 2006; 27: 4079–4086.
96. Chen V.J., Smith L.A., Ma P.X. Bone regeneration on computer-designed nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* 2006; 27: 3973–3979.
97. Wei G., Ma P.X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 4749–4757.
98. Chen V.J., Ma P.X. Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials* 2004; 25: 2065–2073.
99. Yang F., et al. Fabrication of nano-structured porous PLLA scaffold intended for nerve tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 1891–1900.
100. Dalby M.J., Riehle M.O., Sutherland D.S., Agheli H., Curtis A.S.G. Morphological and microarray analysis of human fibroblasts cultured on nanocolumns produced by colloidal lithography. *Eur. Cell Mater.* 2005; 9: 1–8.
101. Dalby M.J., Riehle M.O., Sutherland D.S., Agheli H., Curtis A.S.G. Fibroblast response to a controlled nanoenvironment produced by colloidal lithography. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004; 69A: 314–322.
102. Wood M.A., Wilkinson C.D.W., Curtis A.S.G. The effects of colloidal nanotopography on initial fibroblast adhesion and morphology. *IEEE Trans. Nanobioscience* 2006; 5: 20–31.
103. Dalby M.J., Riehle M.O., Sutherland D.S., Agheli H., Curtis A.S.G. Changes in fibroblast morphology in response to nano-columns produced by colloidal lithography. *Biomaterials* 2004; 25: 5415–5422.
104. Andersson A.S., Olsson P., Lidberg U., Sutherland D.S. The effects of discontinuous and continuous groove edges on cell shape and alignment. *Exp. Cell Res.* 2003; 288: 177–188.

105. Rice J.M., et al. Quantitative assessment of the response of primary derived human osteoblasts and macrophages to a range of nanotopography surfaces in a single culture model *in vitro*. *Biomaterials* 2003; 24: 4799–4818.
106. Li W.J., Laurencin C.T., Catterson E.D., Tuan R.S., Ko F.K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 60: 613–621.
107. Dalton P.D., Klinkhammer K., Salber J., Klee D., Moeller M. Direct *in vitro* electrospinning with polymer melts. *Biomacromolecules* 2006; 7: 686–690.
108. Zhang Y.Z., Venugopal J., Huang Z.M., Lim C.T., Ramakrishna S. Crosslinking of the electrospun gelatin nanofibers. *Polymer* 2006; 47: 2911–2917.
109. Baker S.C., et al. Characterisation of electrospun polystyrene scaffolds for threedimensional *in vitro* biological studies. *Biomaterials* 2006; 27: 3136–3146.
110. Kim K.H., et al. Biological efficacy of silk fibroin nanofiber membranes for guided bone regeneration. *J. Biotechnol.* 2005; 120: 327–339.
111. Min B.M., et al. Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts *in vitro*. *Biomaterials* 2004; 25: 1289–1297.
112. Venugopal J., Ma L.L., Yong T., Ramakrishna S. *In vitro* study of smooth muscle cells on polycaprolactone and collagen nanofibrous matrices. *Cell Biol. Int.* 2005; 29: 861–867.
113. Xu C., Yang F., Wang S., Ramakrishna S. *In vitro* study of human vascular endothelial cell function on materials with various surface roughnesses. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004; 71A: 154–161.
114. Mo X.M., Xu C.Y., Kotaki M., Ramakrishna S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004; 25: 1883–1890.
115. Schindler M., et al. Asynthetic nanofibrillar matrix promotes *in vivo*-like organization and morphogenesis for cells in culture. *Biomaterials* 2005; 26: 5624–5631.
116. Zhang Y., Ouyang H., Lim C.T., Ramakrishna S., Huang Z.M. Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. B* 2005; 72: 56–165.
117. Li M., Guo Y., Wei Y., MacDiarmid A.G., Lelkes P.I. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2006; 27: 2705–2715.
118. Ma Z., Kotaki M., Yong T., He W., Ramakrishna S. Surface engineering of electrospun polyethylene terephthalate (PET) nanofibers towards development of a new material for blood vessel engineering. *Biomaterials* 26: 2005; 2527–2536.
119. Chua K.N. Stable immobilization of rat hepatocyte spheroids on galactosylated nanofiber scaffold. *Biomaterials* 2005; 26: 2537–2547.
120. Badami A.S., Kreke M.R., Thompson M.S., Riffle J.S., Goldstein A.S. Effect of fiber diameter on spreading, proliferation, and differentiation of osteoblastic cells on electrospun poly (lactic acid) substrates. *Biomaterials* 2006; 27: 596–606.
121. Tuzlakoglu K., et al. Nano- and micro-fiber combined scaffolds: a new architecture for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. in Med.* 2005; 16: 1099–1104.
122. Sahoo S., Ouyang H., Goh James C.H., Tay T.E., Toh S.L. Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006; 12: 91–99.
123. Kwon I.K., Kidoaki S., Matsuda T. Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* 2005; 26: 3929–3939.

124. Perla V., Webster T.J. Better osteoblast adhesion on nanoparticulate selenium – a promising orthopedic implant material. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005; 75A: 356–364.
125. Turner S., et al. Cell attachment on silicon nanostructures. *J. Vac. Sci. Technol. B Microelectronics and Nanometer Structures* 1997; 15: 2848–2854.
126. Thapa A., Miller D.C., Webster T.J., Haberstroh K.M. Nano-structured polymers enhance bladder smooth muscle cell function. *Biomaterials* 2003; 24: 2915–2926.
127. Miller D.C., Haberstroh K.M., Webster T.J. Mechanism(s) of increased vascular cell adhesion on nanostructured poly(lactic-co-glycolic acid) films. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005; 73A: 476–484.
128. Garibaldi S., Brunelli C., Bavastrello V., Ghigliotti G., Nicolini C. Carbon nanotube biocompatibility with cardiac muscle cells. *Nanotechnol.* 2006; 17: 391–397.
129. Elias K.L., Price R.L., Webster T.J. Enhanced functions of osteoblasts on nanometer diameter carbon fibers. *Biomaterials* 2002; 23: 3279–3287.
130. Price R.J., Ellison K., Haberstroh K.M., Webster T.J. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J. Biomed. Mater. Res.* 2004; 70A: 129–138.
131. Mc. Kenzie J.L., Waid M.C., Shi R., Webster T.J. Decreased functions of astrocytes on carbon nanofiber materials. *Biomaterials* 2004; 25: 1309–1317.
132. Price R.L., Waid M.C., Haberstroh K.M., Webster T.J. Selective bone cell adhesion on formulations containing carbon nanofibers. *Biomaterials* 2003; 24: 1877–1887.
133. Zanello L.P., Zhao B., Hu H., Haddon R.C. Bone cell proliferation on carbon nanotubes. *Nano Letters* 2006; 6: 562–567.
134. Fiorito S., Serafino A., Andreola F., Bernier P. Effects of fullerenes and single-wall carbon nanotubes on murine and human macrophages. *Carbon* 2006; 44: 1100–1105.
135. Chopek J., et al. *In vitro* studies of carbon nanotubes biocompatibility. *Carbon* 2006; 44: 1106–1111.
136. Monteiro-Riviere N.A., Nemanich R.J., Inman A.O., Wang Y.Y., Riviere J.E. Multi-walled carbon nanotube interactions with human epidermal keratinocytes. *Toxicol. Lett.* 2005; 155: 377–384.
137. Mac Donald R.A., Laurenzi B.F., Viswanathan G., Ajayan P.M., Stegemann J.P. Collagen-carbon nanotube composite materials as scaffolds in tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 2005; 74A: 489–496.
138. Ding L., et al. Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett.* 2005; 5: 2448–2464.
139. Muller-Buschbaum P., O’Neill S.A., Affrossman S., Stamm M. Phase separation and dewetting of weakly incompatible polymer blend films. *Macromolecules* 1998; 31: 5003–5009.
140. Affrossman S., Henn G., O’Neill S.A., Pethrick R.A., Stamm M. Surface topography and composition of deuterated polystyrene-poly(bromostyrene) blends. *Macromolecules* 1996; 29: 5010–5016.
141. Dalby M.J., Yarwood S.J., Johnstone H.J.H., Affrossman S., Riehle M.O. Fibroblast signaling events in response to nanotopography: a gene array study. *IEEE Trans. Nanobioscience* 2002; 1: 12–17.
142. Berry C.C., Dalby M.J., McCloy D., Affrossman S. The fibroblast response to tubes exhibiting internal nanotopography. *Biomaterials* 2005; 26: 4985–4992.
143. Dalby M.J., Riehle M.O., Johnstone H.J.H., Affrossman S., Curtis A.S.G. Nonadhesive nanotopography: fibroblast response to poly(*n*-butyl methacrylate)-poly(styrene) demixed surface features. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003; 67A: 1025–1032.

144. Dalby M.J., et al. Rapid fibroblast adhesion to 27 nm high polymer demixed nanotopography. *Biomaterials* 2004; 25: 77–83.
145. Dalby M.J., et al. Fibroblast reaction to island topography: changes in cytoskeleton and morphology with time. *Biomaterials* 2003; 24: 927–935.
146. Dalby M.J., et al. Osteoprogenitor response to semi-ordered and random nanotopographies. *Biomaterials* 2006; 27: 2980–2987.
147. Lim J.Y., et al. Osteoblast adhesion on poly(L-lactic acid)/polystyrene demixed thin film blends: effect of nanotopography, surface chemistry, and wettability. *Biomacromolecules* 2005; 6: 3319–3327.
148. Lim J.Y., Hansen J.C., Siedlecki C.A., Runt J., Donahue H.J. Human foetal osteoblastic cell response to polymer-demixed nanotopographic interfaces. *J. Rsoc. Interface* 2005; 2: 97–108.
149. Dalby M.J., Marshall G.E., Johnstone H.J.H., Affrossman S., Riehle M.O. Interactions of human blood and tissue cell types with 95-nm-high nanotopography. *IEEE Trans. Nanobioscience* 2002; 1: 18–23.

ПОВЕДЕНИЕ КЛЕТОК НА БАЗАЛЬНЫХ МЕМБРАНАХ, «ИМИТИРУЕМЫХ» СИНТЕТИЧЕСКИМИ МАТРИЦАМИ С ТОПОГРАФИЧЕСКИМИ ОСОБЕННОСТЯМИ

Джошуа З. Гасиоровски, Джон Ф. Фоли, Пол Рассел, Сара Дж. Лилиенстик,
Пол Ф. Нили, Кристофер Дж. Мэрфи

11.1. Введение

Базальные мембраны (БМ) — это ткань, образованная сложной сеткой белков на внеклеточном матриксе (ВКМ). Посредством базальных мембран крупные скопления клеток, например эпителиальные, могут взаимодействовать со стромальными элементами тканей, располагающихся под ними. У БМ есть ряд важных внутренних характеристик, предназначенных для регулирования поведения связанных с ними клеток. БМ включают в себя лиганды для клеточных рецепторов, служащих резервуарами растворимых факторов роста. Двумя главными физическими характеристиками мембран, способными оказывать сильное воздействие на поведение клеток, являются, во-первых, податливость или гибкость, во-вторых — сложная трехмерная топография строения. Размеры элементов внутренней структуры БМ лежат в диапазоне от нанометров до микрометров [1].

В этой главе представлен краткий обзор сведений о биологии базальных мембран, описаны их биохимические и физические особенности. Основное внимание уделено вопросам, связанным с получением матриц из синтетических материалов, структура которых имитирует поверхность нативных БМ. Иначе говоря, речь идет о создании полимерных подложек, топографическое строение которых было «срисовано» исследователями с биологических мембран живых организмов. Такие матрицы и поверхности разного типа уже применяются при выращивании *in vitro* клеток и культур тканей. Рассмотрим поведение клеток на синтетических матрицах с анизотропной, т. е. покрытой неоднородной по направлениям сеткой канавок или углублений, поверхностью.

11.2. Базальные мембраны

По-видимому, эволюция БМ была вызвана необходимостью взаимодействия простых клеток со своим окружением. Очевидно, что самые ранние формы жизни на Земле должны были обладать повышенной чувствительностью к изменениям окружающей среды. Действительно, если очень простые молекулы,

из которых позднее возникли первые живые клетки, не получали бы из среды обитания достаточно питательных веществ, то не появились бы и биологические клетки. Однако для дальнейшей эволюции и превращения в сложные организмы клетки должны были «научиться» не только выживать в своем окружении, но и как-то изменять его, создавая себе дополнительные преимущества. Важным эволюционным шагом стало возникновение секреции, посредством чего клетки начали обмениваться химическими сигналами, а также выделять поверхностные белки, позволяющие им создавать некие сайты для прикрепления к поверхностям. Выделяя и нанося на какую-либо подложку молекулы белка, клетка формирует на ней центр закрепления, преобразуя окружение в своих целях. Прикрепление клетки к поверхности и к другим клеткам повышает ее шансы на выживание, а также позволяет клетке со временем переходить к созданию многоклеточных организмов. В настоящее время ученые убеждены, что в окружающем мире некоторые свойства изолированной бактерии, прежде всего — сопротивляемость среде и уровень экспрессии, очень сильно отличаются от таковых у той же бактерии, живущей внутри толстой биологической пленки, плотно заселенной аналогичными микроорганизмами [2–4]. Можно с уверенностью полагать, что в процессах развития или патологии клеток внеклеточный матрикс и базальная мембрана объединялись и выступали как единое целое.

11.2.1. Роль базальных мембран при заболеваниях

Помимо сохранения структурной целостности клетки, представляется очевидным значение базальных мембран в развитии и поддержании гомеостаза тканей. Одним из наиболее известных заболеваний, связанных с БМ, является так называемая болезнь тонкой базальной мембраны. При этой болезни толщина мембран в почечных клубочках человека понижается до 100–200 нм, что составляет лишь половину или даже четверть от нормы [5], из-за этого в моче больных появляется кровь и неизбежно возникают осложнения [6].

ВКМ и БМ играют важную роль в заживлении ран и прочих повреждений организма. Известно, что базальные мембраны клеток почек и роговицы у страдающих диабетом людей и крыс отличаются аномальной толщиной [7, 8]. Связанные с этим закономерности недостаточно изучены, однако предполагается, что именно повышенная толщина БМ является причиной плохого заживления ран и прочих повреждений — характерного признака диабета. Можно указать и на другие патологии, особенно заболевания кожи и костей, обусловленные мутациями выделяемых во внеклеточные матрицы белков или вызываемыми ими аутоиммунными реакциями с эпитопами матрицы [9–12]. Вследствие таких мутаций и аутоиммунных реакций в работе базальных мембран происходят изменения, приводящие к развитию заболеваний. Учитывая важность изложенных проблем, авторы посвятили два следующих раздела общему описанию биохимических и физических свойств БМ.

11.2.2. Биохимические свойства

Клетки выделяют в межклеточное пространство множество различных белков с волокнистой структурой, в результате постоянно изменяется и реструктурируется клеточное окружение. Именно из общей массы белков, выделяемых клеткой, образуется внеклеточный матрикс. Специализированные белки на базальных поверхностях многих клеток внутри определенных биологических тканей превращаются в базальные мембраны. БМ обеспечивают механическую прочность структуры, служат резервуаром для сигнальных молекул и выполняют другие биохимические и физические функции, присущие данной клеточной структуре или биологической ткани (рис. 11.1). Изображения базальных мембран, получаемые на просвечивающем электронном микроскопе, свидетельствуют, что БМ обычно состоят из двух слоев (электронно-плотного и электронно-прозрачного), которые уже получили латинские обозначения *lamina densa* и *lamina lucida* [13–15]. Биохимический состав таких слоев определяется видом изучаемой биологической ткани, однако большинство БМ состоят из одних и тех же волокнистых белковых компонентов, а именно коллагена, ламинина и протеогликанов [13, 16–18]. Для большинства живых организмов (от бактерии *C. elegans* до человека) основным строительным материалом базальных мембран служит коллаген типа IV, образуемый в результате самосборки из нидогена (соединение семейства ламининов) и других белков.

В большинстве тканей толщина БМ обычно составляет 50–150 нм, однако в клубочковых БМ она может достигать 300–400 нм, а в капсуле человеческого хрусталика — даже 8 мкм [19–22, 55]. Многие ВКМ содержат целые домены или короткоживущие аминокислотные последовательности, которые выступают как ингибиторы сигналов или лигандов адгезии для рецепторов клеточных мембран. При этом очень многие важные структурные изменения в клетках тканей происходят за счет незначительных изменений биохимического состава БМ.

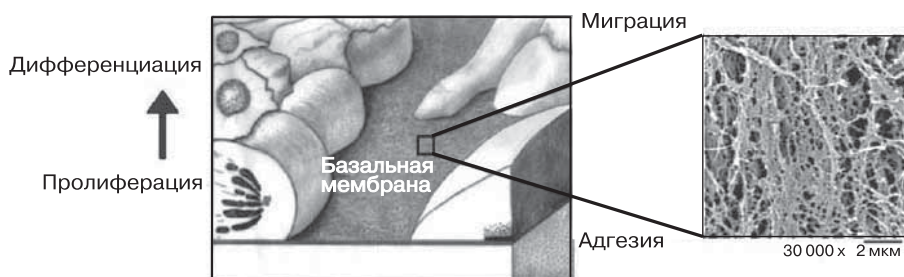


Рис. 11.1. Схематическое изображение клеток на базальной мембране. В левой части показано присоединение клеток к БМ, их дальнейшая пролиферация и миграция. По мере распространения клеток (в направлении снизу–вверх, как указано стрелкой) в них часто начинаются процессы дифференциации. В правой части представлена полученная на просвечивающем электронном микроскопе микрофотография базальной мембраны ткани аорты обезьяны-резуса

Во многих ранних работах, относящихся к влиянию базальных мембран на поведение клеток, исследователи уделяли основное внимание клеточным реакциям на биохимический состав и структуру БМ, поэтому в настоящий момент биохимические особенности БМ изучены гораздо лучше физических. Типичные эксперименты такого рода подразделяются на три основные категории. Во-первых, большая часть опытов с белками ВКМ сводится к определению и описанию их изменений после кратковременного воздействия на исследуемые протеины или введения различных рекомбинантных белков в клеточное окружение. Подобные эксперименты часто проводились с клетками, растущими на плоских поверхностях, и обычно приводили к легко наблюдаемым изменениям фенотипа. Также вышеописанные опыты позволяли исследователям распознавать последовательности сигнальных реакций, т. е., например, объяснять механизм регулирования ангиогенеза при протеолитическом выделении эндостатина [23–25]. Во-вторых, многие работы были посвящены воздействию факторов роста или пептидов на миграцию клеток с использованием камеры Бойдена или в экспериментах по восстановлению ткани. Обычно в подобных исследованиях измеряется хемотаксический потенциал какого-либо сигнального белка, регулирующего изучаемые процессы после инвазии в поврежденный участок иммунцитов или других клеток [26, 27]. Третий распространенный тип экспериментов основан на измерениях воздействия пептидного сигнала на прикрепление клетки к поверхности. Обычно такие опыты проводят путем засеивания клеток на подложку, предварительно покрытую слоем исследуемого белка. В качестве типичного примера изучения характерного сигнала пептида ВКМ можно сослаться на обнаружение клеточной реакции при адгезии сигнального пептида RGD (аргинин – глицин – аспарагиновая кислота). Сигнальный участок структуры RGD, обнаруживаемый внутри многих белков разного вида ВКМ, обычно представляет собой общий лиганд для нескольких интегринов, изменяющий способность к прикреплению к поверхности клеток различных типов [28, 29]. Общая методика экспериментов в этой области обычно такова: поверхность изучаемого типа, например пластик, покрывают сигнальными пептидами с RGD или содержащими домен с RGD полноценными белковыми цепочками ВКМ, например фибронектином. Затем данные по адгезии клеток на обработанной подложке сравниваются с результатами чистой контрольной подложки, что позволяет легко регистрировать изменения клеточной адгезии, непосредственно связанные с воздействием RGD. Все три изложенные экспериментальные стратегии относятся лишь к описанию биохимических реакций отдельных ВКМ; в таких опытах практически не учитываются явления, обусловленные физическими характеристиками поверхностей. Для нас же представляют интерес именно топографические особенности разных масштабов, микронного, субмикронного и нанометрического, среды культивирования *in vivo* или *in vitro*.

Напомним, что, помимо разницы в биохимическом составе, базальные мембраны различаются по целому набору физических характеристик: толщине, гибкости или пластичности, размерам пор, диаметрам волокон и особенностям трехмерной структуры. Наибольший интерес для рассматриваемых проблем

имеют податливость или упругость, характеристики которых подробно рассматриваются в следующем подразделе. Основное внимание уделяется топографическим особенностям базальных мембран и связанным с ними поведением клеток.

11.2.3. Физические особенности

11.2.3.1. Податливость

Большая часть работ в рассматриваемой области исследований связана с изучением поведения клеток на поверхностях из жестких материалов: кремния, полистирола и полиуретана. Поведение клеток на подобных подложках подробно рассматривалось после покрытия поверхностей различными соединениями, например RGD-пептидом, повышающими прилипание клеток или заметно меняющими их развитие. Из полученных данных следует, что механическая податливость клеточной матрицы может иметь большое значение для функциональных свойств лигандов взаимодействующих клеток [30, 31]. Податливость любого материала можно измерить и соотнести со степенью деформации под воздействием приложенных напряжений (в единицах сила/площадь). Жесткие материалы обычно способствуют большему разрастанию клеток по поверхности, а также индуцируют биохимические реакции фосфорилирования [32].

Влияние податливости поверхности культивирования на форму клеток наглядно проявлялся в экспериментах с эпителиальными клетками груди, так как при культивировании этих клеток на свободных поверхностных гелях они принимали форму трубочек, отсутствующую в закрепленных на подложке гелях [33]. Похожий эффект наблюдался при выращивании эндотелиальных клеток пупочной вены человека на поверхностях полиакриламид/желатин, когда по мере уменьшения жесткости подложки начинали образовываться структуры, напоминающие трубки [34]. В некоторых исследованиях при изменении податливости поверхности было зарегистрировано возрастание вытягивающих сил фибробластов и степени сокращения клеток гладких мышц [31, 35–39]; в работе [40] отмечена зависимость поведения корковых нейронов и глиальных клеток от жесткости поверхности культивирования. Акроциты значительно изменяют свое поведение при выращивании на поверхностях с различной податливостью: клетки, выросшие на твердых гелях, отличаются прорастающими нейритами и наличием напряженных волокон актина, а при культивировании на мягких подложках акроциты имеют округлую форму и небольшое число волокон [31]. Отметим, что прочие характеристики клеток в описанных экспериментах не зависели от твердости подложки, например жесткость волокон актина и повышенная протрузия (т. е. выпячивание, выступание) F-актинов на нейритах наблюдались при культивировании как на мягких, так и на жестких поверхностях.

Вероятно, податливость матриц играет важную роль в организации строения клеток и тканей живых организмов. В работе [41] было обнаружено, что

нейроны могут расти в гидрогелях, тогда как акроциты не могут. Этот факт имеет значение, например, для изучения клеток головного мозга, так как предполагается, что распределение и число клеток центральной нервной системы тесно связаны с жесткостью или податливостью ее участков. В исследованиях стволовых клеток было показано, что выращивание на мягких матрицах, механические свойства которых напоминают таковые для тканей головного мозга, способствует росту нейрогенных фенотипов [42], в то же время на жестких подложках, свойства которых близки к свойствам мышечной ткани, в культуре появляются остеогенные фенотипы.

К сожалению, несмотря на то что податливость уже признана важной характеристикой внеклеточных мембран, в научной литературе пока отсутствуют данные, непосредственно относящиеся к податливости базальных мембран.

11.2.3.2. Топография поверхности

Поверхность базальных мембран обладает сложной трехмерной топографией. Величина отдельных структурных элементов БМ составляет 10–400 нм, однако размеры большинства структур не превышают 100 нм (рис. 11.2) [21, 22, 43, 44].

Диаметр первичной эпителиальной клетки — в среднем 20–50 мкм, он зависит от типа клеточной культуры. Таким образом, размеры клеток и характерных структурных компонентов базальных мембран различаются на несколько порядков, в результате общая площадь поверхностей раздела внутри одной клетки содержит тысячи нанометрических и субмикронных топографических особенностей. Столь сложная структура поверхности позволяет эпителиальным и эндотелиальным клеткам адекватно откликаться на множество биохимических реакций. Именно объединение биохимических и физических свойств базальных мембран обеспечивает возможность выполнения ими регуляторной функции при развитии клеток и возникновении патологий.

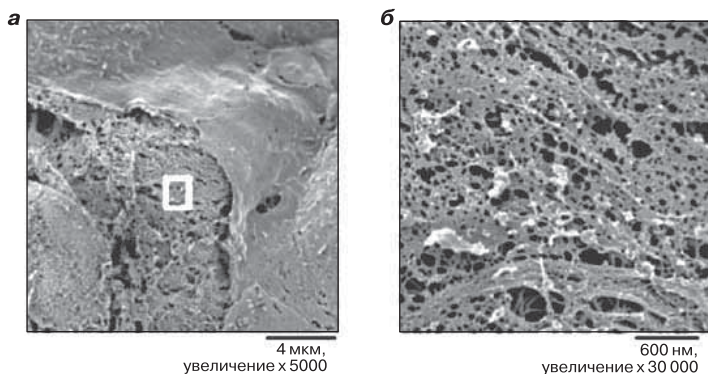


Рис. 11.2. Поверхность нативной базальной мембраны: *а* — полученная на сканирующем электронном микроскопе микрофотография клеток на волокнистой поверхности БМ; *б* — увеличенный участок на *а*, позволяющий подробно рассмотреть топографию поверхности БМ

Очевидно, что физические свойства БМ также должны играть важную роль в регулировании поведения и развития клеток, однако проведение экспериментов, необходимых для подтверждения данной гипотезы, — очень сложная техническая задача. Прежде всего, специалистам, занимающимся биологией клетки, необходимо спланировать серию экспериментов *in vitro* таким образом, чтобы отделить собственные химические сигналы клеток от сигналов, вызванных физическими свойствами окружения. Исследования воздействия топографии на поведение клеток начали проводить почти сто лет назад: еще в 1911 г. Р. Дж. Харрисон использовал нити паутины для изучения реакции клеток при взаимодействии с поверхностью со сложной топографией [45, 46]. Для своих экспериментов ему удалось разработать методику создания поверхностей с регулируемыми и достаточно точно определяемыми физическими особенностями.

В настоящее время происходит междисциплинарное слияние технологии с клеточной биологией, создающее новые биоинженерные технологии, с помощью которых можно получать нанотопографические поверхности, позволяющие испытывать влияние подложек на характеристики и поведение культивируемых клеток. Применяя новейшие методики, исследователи уже могут формировать наноструктурные поверхности с разнообразными особенностями и контролируемыми размерами деталей, а затем производить на них культивирование клеток [1, 47]. В последние годы было опубликовано много работ, где изучалось влияние поверхностей с различными особенностями (шероховатостями, канавками, порами и т. п. с размерами от десятков до сотен нанометров) на пролиферацию, упорядочивание или выстраивание, адгезию и жизнеспособность культивируемых клеток [48–53]. Однако, несмотря на большой массив полученных данных, природа воздействия физических особенностей поверхности на поведение клеток остается недостаточно понятной; почему, объясняется ниже.

Прежде всего, мы пока располагаем малым числом точных количественных данных, позволяющих строго анализировать топографическое строение базальных мембран. В настоящее время достоверные экспериментальные результаты имеются лишь для нативных БМ клеток кожи, роговицы, сосудистого эндотелия и почечных клубочков [19, 22, 24, 54, 55], а для БМ клеток многих других тканей известны только некоторые морфологические показатели, но отсутствуют количественные характеристики топографических особенностей. Во-вторых, очень часто исследовательские группы в работах, посвященных получению топографических поверхностей одинакового типа, используют различные методики. Естественно, это создает дополнительные трудности при интерпретации результатов, поскольку, например, наноразмерные канавки на поверхности титана или кремниевых чипов, полученные с помощью ультрафиолетового излучения, электронно-лучевой литографии и т. д., могут по-разному влиять на растущие клетки. Каждый из методов имеет собственные достоинства, недостатки и ограничения, в результате формируемые поверхности, строго говоря, неодинаковы, следовательно, и получаемые экспериментальные

результаты несопоставимы друг с другом. В-третьих, биоинженерам пока не удается воспроизводить на поверхностях с нанометрической точностью те геометрические фигуры или другие особенности, которые соответствуют характерным структурам нативных базальных мембран.

Несмотря на вышеизложенные трудности, биологи уже добились значительных успехов в изучении процессов взаимодействия БМ с клетками, хотя и в настоящее время решение многих научных проблем в этой области связано именно с созданием биомиметических искусственных поверхностей. Данные подложки должны обладать топографическими особенностями, сопоставимыми с физическими неоднородностями поверхности базальных мембран, которые придают мембранам способность участвовать в развитии, жизнедеятельности и обеспечении гомеостаза клеток и тканей.

11.3. История создания и изучение синтетических биомиметических матриц

Биологические системы состоят из множества элементов, регулирующих поведение клеток. На интересующем нас уровне взаимодействия клеток с базальными мембранами основную информацию содержат структурные элементы с субмикронными, нанометрическими и даже субнанометрическими размерами.

Ранние попытки создания биомиметических поверхностей, аналогичных биологическим или имитирующих их свойства, ограничивались возможностями формирования лишь микрометровых особенностей, однако современные методики позволяют создавать искусственные поверхности, топография которых включает нано- и микрометрические элементы. Данные особенности могут имитировать физические поверхностные структуры в биологических системах; их использование уже привело к появлению множества работ, посвященных топографии подложек.

Для оценки степени влияния топографии поверхности на реакции клеток необходимо определить релевантные размеры особенностей в клеточном микроокружении. Количественные характеристики структурных составляющих БМ, диаметр пор или ширина волокон, аналогичны многим особенностям тканей различных видов (табл. 11.1). При анализе параметров большого числа биологических тканей, приводимых в таблице, неожиданно выявляются некоторые исключения. Давно известный пример такого рода — очень малый диаметр пор в клубочках БМ [19, 20], что объясняется их специфической барьерной ролью при избирательной диффузии.

К сожалению, современный уровень развития биотехнологии пока не позволяет создавать топографические особенности с требуемой точностью на БМ нативных тканей *in vivo*, поэтому особый интерес вызывают искусственные покрытия, позволяющие формировать поверхности с заданными физическими характеристиками.

Таблица 11.1

**Физические особенности измерения некоторых базальных мембран
по данным сканирующей электронной микроскопии**

Вид	БМ ткани	Средняя высота, нм	Средний диаметр волокна, нм	Средний диаметр пор, нм	Источ- ник
Макака-резус	Роговица	191 ± 72	77 ± 44	72 ± 40	[22]
Человек	Роговица	182 ± 49	46 ± 16	92 ± 34	[21]
Человек	Десцеметова оболочка глаза	131 ± 41	31 ± 9	38 ± 15	[21]
Человек	Крайняя плоть	–	24 ± 8	40 ± 17	<i>a</i>
Свинья	Аортальный клапан	–	27 ± 12	38 ± 24	<i>a</i>
Макака-резус	Аорта	–	30 ± 11	62 ± 37	<i>a</i>
Макака-резус	Сонная артерия	–	31 ± 11	60 ± 42	<i>a</i>
Макака-резус	Подкожная вена конечности	–	27 ± 8	38 ± 16	<i>a</i>
Макака-резус	Мочевой пузырь	178 ± 57	52 ± 28	82 ± 49	[43]
Бык	Гломерулярная ткань почек	–	–	9 ± 3	[20]
Синтетический	Матригель	162 ± 52	69 ± 35	105 ± 70	[44]

Большинство особенностей соответствуют размеру базальных мембран различных видов. Заметно выделяется средний диаметр пор базальных мембран гломерулярной ткани почек, которая играет особую роль в регуляции транспорта растворенных веществ.

a Лилиенсик С. Дж., Мерфи К. Дж., частное сообщение.

11.3.1. Искусственная поверхность Matrigel и случайно упорядоченные подложки

В поведении клеток, выращенных на плоских пластиковых подложках и на сложных по структуре поверхностях базальных мембран *in vivo*, наблюдаются заметные различия, поэтому существует необходимость разработки новых, более приближенных к условиям *in vivo* покрытий для культивирования клеток. Искусственные подложки, особенности которых имитировали бы микроокружение клетки, конечно, могли бы успешно использоваться при исследовании поведения клеток *in vitro*, однако создание подобных покрытий — сложная технологическая задача. Прежде всего, очень трудно выделить внеклеточные матриксы из живой ткани, что приводит к постоянному дефициту экспериментального материала, который к тому же бывает часто загрязнен клеточными веществами.

Важным научным успехом в этом направлении стало создание искусственной поверхности Matrigel. Ее появление обусловлено обнаружением нового вида

опухолевой ткани, не только обогащенной компонентами базальных мембран и способной к быстрому росту, но и сохраняющей доброкачественность в организме мышей [56, 57]. Экстракты данной опухоли выделили, очистили и стерилизовали для использования в экспериментах *in vitro*. Впоследствии было обнаружено, что в клетках, культивируемых на поверхности гелей, полученных из такой ткани, наблюдаются важные изменения морфологии, поведения и экспрессии генов [58, 59]. Например, эндотелиальные клетки, которые при культивировании на полимерных подложках образуют монослой, на поверхности Matrigel начали формировать трубчатые структуры [59].

Среда Matrigel еще не стала распространенным лабораторным реагентом, так как ее свойства пока не позволяют точно управлять поведением клеток и производить в них необходимые изменения, однако сам факт ее разработки подтверждает возможность и нужность создания искусственных БМ для культивирования. В настоящее время Matrigel — наиболее приемлемый вид искусственных сред, имитирующих базальные мембраны и позволяющих изучать связанное с ними поведение клеток.

Есть и другие подходы к созданию искусственного топографического окружения базальных мембран, в частности формирование на поверхностях кремниевых канавок, гребней или трубок, заменяющих белковые волокна и поры (рис. 11.3). Основная идея таких разработок состоит в использовании микро- и нанотехнологических методов для формирования на поверхностях покрытий

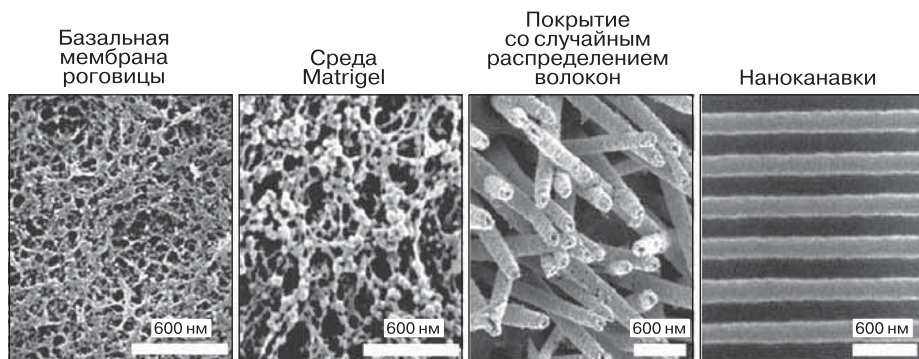


Рис. 11.3. Полученные на сканирующем электронном микроскопе микрофотографии нативной базальной мембраны (роговицы), а также матрицы Matrigel и двух синтетических поверхностей, позволяющие сравнить их топографические особенности. Среда Matrigel по своим биохимическим и топографическим показателям очень близка к нативным БМ, однако пока она трудно регулируема по отдельным физическим факторам, влияющим на рост клеток. Некоторые возможности влияния возникают при использовании синтетических изотропных поверхностей с покрытыми золотом волокнами в виде «травы», хотя и они (подобно нативным БМ) являются частично хаотическими. Наиболее удобными для изучения роли конкретных физических факторов пока остаются поверхности с анизотропными наноканавками, имеющими строго определенные и легко контролируемые размеры и формы

из углеродных наноразмерных волокон, трубок или колонок со случайным или частично упорядоченным распределением элементов. Экспериментально доказано, что такие поверхности действительно могут изменять морфологию и экспрессию различных типов клеток [60–62]. Искусственные матрицы с анизотропным и случайным распределением физических особенностей уже стали важным инструментом исследования тканей и клеток, так как они позволяют культивировать клетки в условиях, близких к *in vivo*. Подобные матрицы — почти идеальная среда для изучения реакции клеток на действие лекарственных препаратов или определенного типа белков в условиях *in vivo*. В настоящее время уже налажено коммерческое производство так называемых стохастических поверхностей, т.е. подложек со случайным распределением элементов фибриллярных структур, полученных электроформованием, а также поверхностей с мембранами, в состав которых входят особенности требуемых размеров, что позволяет изучать поведение клеток при определенных воздействиях [63, 64]. Преимущество стохастических подложек состоит в высокой степени сходства с характеристиками поверхностей нативных БМ. Однако такие системы не очень удобны для изучения прямого воздействия физических характеристик поверхности ВКМ на свойства растущих клеток. Недостаток описываемых искусственных поверхностей связан со сложностью их структуры, что очень затрудняет определение воздействия отдельного физического фактора. В таких системах все размеры пор, волокон и глубина канавок имеют случайное распределение, вследствие чего ни один параметр не может быть легко изменен в одиночку. Случайный характер распределения волокон по поверхности не позволяет точно оценить степень ориентации при росте клеток, в результате анизотропия развития клеток быстро «стирается» из-за неупорядоченности структуры подложки.

В настоящее время уже созданы поверхности, покрытые чередующимися анизотропными углублениями и гребнями с наноразмерными высотой и глубиной. На данных подложках пока невозможно имитировать поверхности нативных БМ, но они вполне подходят для изучения отклика растущей культуры клеток на линейный тип анизотропии поверхности и исследования вероятности роста клеток вдоль или поперек поверхностных углублений и гребней заданного размера. Для биологов преимущество очень простых по структуре поверхностей с наноканавками заключается в том, что поставленные эксперименты позволяют точно оценить влияние определенного топографического (физического) фактора. Развитие данного подхода дает возможность использования принципа редукционизма при изучении базальных мембран, т.е. восхождения от простого к сложному.

11.3.2. Создание наноканавок на поверхности

Для получения поверхностей с канавками было предложено несколько методик, отличающихся лишь незначительными деталями [65–72]. В целом описанные способы создания подложек основаны на литографической технологии с исполь-

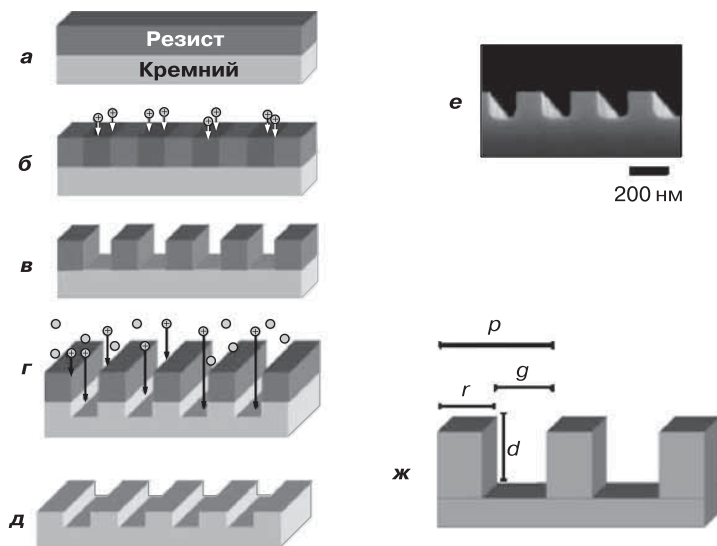


Рис. 11.4. Получение искусственных поверхностей с наноканавками. Последовательные этапы формирования наноканавок на поверхности: *a* — нанесение слоя фоторезиста с заданным узором на кремниевую пластину; *б* — облучение фоторезиста с использованием шаблона; *в* — удаление фоторезиста; *г* — создание канавок в кремниевой пластине методом реакционного ионно-лучевого травления; *д* — удаление оставшегося фоторезиста и «открытие» наноканавок на поверхности кремния. Справа приведена электронная микрофотография профиля поверхности с наноканавками, шаг — 400 нм (*e*), а ниже показаны буквенные обозначения, используемые при описании поверхностей с наноканавками: *r* (ridge) — гребень; *g* (groove) — канавка или туннель; *d* (depth) — глубина канавки или туннеля; *p* (pitch) — шаг, т. е. ширина одной канавки + ширина одного гребня

зованием фоторезиста, наносимого на поверхность кремниевых чипов. Стадии обработки поверхности показаны на рис. 11.4. После нанесения фоторезиста на кремниевую подложку (рис. 11.4, *a*) образец облучают через фотомаску (рис. 11.4, *б*), а на обработанных таким образом участках протекают химические реакции, позволяющие затем избирательно удалить прореагировавшие вещества с помощью растворителей (рис. 11.4, *в*). Для формирования особенностей на поверхностях с субмикронными и микрометровыми размерами в литографии обычно используют УФ-излучение, однако для создания наноособенностей размером менее 100 нм необходимо применять электронно-лучевую литографию. Участки чипа, не защищенные слоем фоторезиста, могут затем протравливаться путем реакционного ионно-лучевого травления, формирующего внутри материала трехмерные структуры (рис. 11.4, *г*). На последней стадии обработки остатки фоторезиста удаляются с поверхности, на которой уже сформированы требуемые наноособенности в виде канавок и гребней с заданными размерами (рис. 11.4, *e–ж*). Обычно обработанный кремниевый чип покрывают слоем компаунда [SiO₂] или же на нем методами самоорганизации вещества формируется защит-

ный мономолекулярный слой. Он не только подавляет остаточную токсичность подложки, но и облегчает присоединение клеток.

Есть и альтернативная методика нанесения покрытий на поверхность кремния; в этом случае подложка с требуемой структурой используется в качестве шаблона в процессе мягкой литографии при создании отпечатков (реплик) из другого материала, на основе которого будут изготавливаться образцы. Например, исходную поверхность можно использовать для создания полидиметилсилоксановых шаблонов, на основе которых затем изготавливают образцы из полиуретана. Конечный продукт представляет собой подложки из оптически прозрачного полиуретана, особенности поверхности которого, размеры и глубина впадин будут полностью соответствовать аналогичным структурам исходных кремниевых образцов [73, 74]. К сожалению, у метода мягкой литографии есть ограничения, не позволяющие точно воспроизводить размеры особенностей. С другой стороны, низкая стоимость полиуретановых заменителей дает возможность легко организовать масштабное производство подложек для некоторых исследований. Например, полиуретановые поверхности используются при проведении количественных и качественных измерений путем оптической и флуоресцентной микроскопии.

В двух последних разделах главы (11.4. и 11.5) приведены и проанализированы сведения, касающиеся поведения некоторых типов клеток, выращиваемых на поверхностях с особенностями в виде различных по форме и размерам наноканавок.

11.4. Поведение клеток на искусственно созданных поверхностях с наноканавками

11.4.1. Влияние наномасштабной топографии поверхности на пролиферацию клеток

Физические особенности нативных БМ роговицы многих организмов хорошо изучены, поэтому именно эта структура служит удобной моделью во многих работах по проектированию и созданию искусственных поверхностей [21, 22, 24]. Эпителий передней части роговицы — довольно простая слоистая структура, которая постоянно обновляется за счет пролиферации базальных клеток. Необходимый для данного процесса контакт базальных клеток с базальными мембранами, конечно, требует присоединения клеток к подложке. Для оценки влияния масштаба поверхностных топографических особенностей на пролиферацию клеток в работе [75] изучали рост клеток эпителия роговицы человеческого глаза (HSEC) на разных полиуретановых подложках. Авторы регистрировали относительное изменение числа клеток в течение 5 дней роста, начиная с 4 часов после посева. Было обнаружено, что число клеток, выросших на подложке с крупными особенностями, ямками или впадинами глубиной 4000 нм и гребнями высотой 2200 нм, в процентном отношении существенно превосходило число клеток на подложке с более мелкими неоднородностями, ямками глубиной 400 нм и гребнями высотой 200 нм (рис. 11.5, *a*). Варьирование других параметров неоднород-

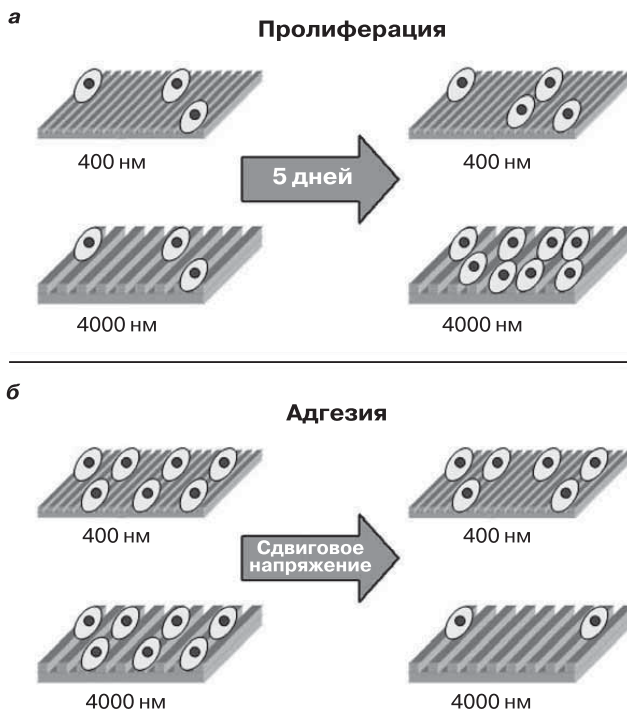


Рис. 11.5. Развитие клеток на поверхностях с наноканавками различных масштабов: *а* — скорость пролиферации для клеток эпителия роговицы глаза человека на поверхности с канавками глубиной 4000 нм заметно превышает скорость на поверхности с канавками глубиной 400 нм; *б* — под воздействием сдвигового напряжения клетки отделяются от поверхности с канавками глубиной 4000 нм легче, чем от поверхности канавок глубиной 400 нм

ностей показало, что заметное изменение в скорости пролиферации клеток происходило при глубине впадин 1200–1600 нм и высоте гребней 400 и 900 нм, а при наличии более крупных неровностей скорость пролиферации почти совпадала с таковой на плоских поверхностях. Заметим, что размеры неоднородностей в переходной области с высотой гребней 400–900 нм соответствуют наиболее крупным фрагментам структуры нативных базальных мембран. При этом уменьшение пролиферации клеток на поверхностях со впадинами глубиной 400–1200 нм по сравнению с ростом на плоских подложках гораздо заметнее, чем ее возрастание на поверхностях с крупными неоднородностями [75].

Время удвоения числа клеток НСЕС, трансформированных устойчивой экспрессией Т-антигена SV40, и первичных клеток было примерно одинаковым [76]. При этом у клеток SV40 НСЕС сохранялась способность к пролиферации за счет поверхностных топографических особенностей. На подложках со впадинами глубиной 400 нм число клеток SV40 составило примерно треть от числа клеток, выросших на плоской поверхности, в то же время у клеток, культивируемых на подложках с другими размерами неоднородностей, вообще не наблю-

далось ингибирование роста [75]. Процесс пролиферации клеток SV40 протекал подобно пролиферации первичных клеток НСЕС, что довольно неожиданно, так как трансформация Т-антигеном должна приводить к «перескоку» через нормальное значение G1 для клеток в критической точке S-фазы [75]. Для подобного «перескока» необходимо либо значительное замедление скорости жизненных циклов клетки на поверхностях с наноканавками глубиной 400 нм, либо временное смещение критических точек митоза, что может быть обусловлено топографическими особенностями подложки. Результаты описанных экспериментов позволяют предположить, что пролиферация клеток регулируется объединенным воздействием совокупности топографических особенностей поверхности.

11.4.2. Силы адгезии для клеток на поверхностях с наноканавками

Приведенные выше результаты, полученные для клеток эпителия роговицы (НСЕС), интересно сравнить с экспериментальными данными по отрыву пленок клеточной культуры от поверхности [78, 79]. В здоровой роговице при моргании возникают жидкостные сдвиговые напряжения, приводящие к отшелушиванию внешнего слоя роговицы, а при ее повреждении те же сдвиговые напряжения способны усиливать миграцию нижележащих эпителиальных клеток, т. е. залечивать нарушенные фрагменты эпителиальной ткани. Поэтому не удивительно, что масштаб поверхностных неоднородностей может влиять на способность клеток отрываться от подложки под воздействием сдвиговых напряжений. В опытах по отрыву пленок НСЕС от поверхностей с канавками глубиной 400, 800 и 1200 нм и шириной гребней 70, 250 и 400 нм (высота гребней — 600 нм) наблюдали значительное возрастание сопротивления по отношению к внешним сдвигающим нагрузкам, достигающее 80 Па ($1 \text{ Па} = 1 \text{ Н/м}^2$) [80]. При этом вновь происходило заметное изменение клеточной реакции на размеры неоднородностей подложки при глубине канавок 1200–1600 нм, тогда как при глубине свыше 1600 нм поведение клеток практически не отличалось от такового на плоских поверхностях (рис. 11.5, б).

Существует еще одна деталь зависимости роста клеток от шероховатости подложки. Дело в том, что поверхность наноканавок обычно очень однородна по химическому составу. В единственной работе, где изучалось влияние химической модификации неоднородностей на плоских полиуретановых подложках, наблюдали повышение адгезии эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) [81]. Напомним, что нативные поверхности внутри живых организмов не обладают упорядоченными неоднородностями, в них есть более мелкие особенности, характерные размеры которых лежат в диапазоне 2–40 нм. Даже при современных методиках создание подложек со столь малыми особенностями, например, с канавками и однородными гребнями высотой менее 70 нм, трудноосуществимо. Однако именно мельчайшие топографические неоднородности играют основную роль в регулировании поведения культивируемых клеток. Этот вопрос требует дальнейших экспериментальных исследований.

11.4.3. Скорость миграции клеток на поверхностях с наноканавками

Процесс миграции означает, что клетка покидает прежнее положение, отрывается от поверхности вместе со своим окружением, движется по некоторой траектории и присоединяется к другому поверхностному домену. Для многих типов клеток такое перемещение и изменение положения зависят от топографических особенностей подложки [1]. Исследование поведения клеток НСЕС на поверхностях с наноканавками подтвердило, что на характеристики миграции данных клеток заметно влияют топографические особенности [82]. Было обнаружено, что миграция отдельных клеток НСЕС (при всех размерах канавок на полиуретановой поверхности) в основном протекает вдоль гребней. Наименьшее число мигрирующих клеток было отмечено на поверхности с канавками глубиной 400 нм и гребнями высотой 220 нм, что позволяет предположить, что силы адгезии при данных размерах особенностей замедляют миграционные процессы. Максимальное число мигрирующих клеток было зарегистрировано на поверхности с канавками глубиной 1600 нм и гребнями высотой 900 нм. Помимо этого, было обнаружено, что на поверхностях с канавками глубиной 1600 нм по сравнению поверхностями с канавками глубиной 4000, 800 и 400 нм наблюдается наиболее высокая средняя скорость миграции. То есть эффективное перемещение клеток по поверхности фактически определяется воздействием двух конкурирующих сил, а именно — адгезии, которая препятствует отрыву ведущей клеточной кромки от подложки, и способности «тянущейся» клеточной кромки к отрыву. Подобно физическому и химическому равновесию, равновесное состояние при клеточных перемещениях также устанавливается при некотором балансе между противодействующими силами, о чем свидетельствуют описанные эксперименты.

11.4.4. Решающее воздействие наноканавок на структуру и ориентацию фокальных адгезий

Механизмы реакций клеток НСЕС на особенности поверхности пока остаются невыясненными, но предположительно они могут быть связаны с взаимодействиями на границе раздела клетка–подложка. Согласно этой гипотезе, особое значение имеют фокальные контакты и фокальные адгезии, т. е. сайты или центры очаговой адгезии в местах прикрепления клетки к матрице, регулирующие архитектуру цитоскелетов и внутриклеточную передачу сигналов [83]. Возможно, некоторые топографические особенности способны воздействовать на последовательность биохимических реакций при передаче сигналов внутри клетки. Экспериментально установлено, что размеры наноканавок и соответствующих им гребней влияют на размеры и структуру сайтов фокальной адгезии [49]. В частности, обнаружено, что средний размер фокальных адгезий обычно прямо пропорционально уменьшается по мере уменьшения высоты гребней, составляя, например, 400 нм при канавках глубиной 400 нм и высоте

гребней 70 нм, и более 800 нм для канавок глубиной 1600 нм и высоте гребней 650 нм. Ориентация фокальных адгезий также зависит от размера гребней. На поверхностях с канавками глубиной от 400 и 4000 нм и высотой гребней 70 и 1900 нм структура фокальной адгезии проявляет взаимосвязь с особенностями подложки. На поверхностях с канавками глубиной 400 нм и высотой гребней 70 нм сайты фокальной адгезии охватывают несколько гребней, а на гребнях высотой 1900 нм сборка фокальной структуры ограничивается единственным гребнем (рис. 11.6, *a* на цв. вклейке). При промежуточных размерах канавок или в переходной области с глубиной канавок 1200 нм фокальные контакты параллельны особенностям поверхности. Отмеченные закономерности позволяют рассматривать топографию поверхности как средство управления размерами контактных центров адгезии и некоторыми процессами передачи внутриклеточных сигналов.

Помимо наблюдаемой зависимости адгезии от высоты гребней, необходимо отметить и зависимость ее от глубины канавок. Было обнаружено, что при посеве фибробластов на поверхность с канавками глубиной и диаметром 1 мкм многие клеточные реакции протекают внутри углублений [84]. Также изучали поведение клеток на поверхностях из полидиметилсилоксана с гребнями постоянного, но достаточно большого размера, составляющего 3500 нм, и канавками переменной глубины. Эксперименты с культивированием эндотелиальных клеток аорты телят показали, что ориентация растущих клеток по направлению канавок возрастает с увеличением глубины последних [85]. Помимо этого, полученные с использованием иммунофлуоресцентной методики изображения позволили определить, что центры фокальной адгезии формируются на краях гребней, а также опускаются по стенкам углублений (рис. 11.6, *b*). Кстати, центры фокальной адгезии не достигают дна самых глубоких канавок (5000 нм). При этом молекулы F-актина и викалина ориентируются параллельно канавкам. Описанные явления экспериментально подтверждены на клетках НСЕС: было показано, что ориентация клеток вдоль поверхности канавок возрастает с их глубиной (частное сообщение группы Фрезера и др.). В настоящее время можно считать установленным, что поведение клеток при культивировании очень сильно зависит от топографических особенностей поверхности, и это дает некоторую возможность управления строением центров адгезии и даже иницированием или регулированием процессов передачи сигналов через клеточные комплексы.

11.5. Передача сигналов и экспрессия в клетках на топографических поверхностях

Очевидно, что между клетками, культивируемыми на различных поверхностях — плоских и покрытых канавками, — наблюдаются заметные морфологические отличия. Прежде всего, наличие на подложках топографических особенностей влечет за собой видимые изменения цитоскелетов культивируемых клеток. Недавние исследования показали, что клетки, вырастающие на поверх-

ностях с трехмерной структурой, обладают повышенной способностью к образованию факторов реструктурирования цитоскелетов, например из семейства малых GTP-аз [64]. Пока остается невыясненным влияние физического окружения на клеточное поведение и то, как особенности микроокружения способны индуцировать возникновение сигналов, вызывающих необходимый клеточный ответ. Уже доказано, что физические свойства подложек влияют на ферментативную активность белков, экспрессию некоторых генов и секрецию сигнальных соединений.

11.5.1. Влияние вызываемых топографией поверхности морфологических изменений на экспрессию генов

Способы получения поверхностей с простыми топографическими особенностями могут легко модифицироваться с целью изготовления подложек более сложной структуры. Например, метод электронно-лучевой литографии после небольшого усложнения позволяет создавать поверхности с анизотропными неоднородностями в виде углублений заданного диаметра круглой или шестиугольной формы [86], что влечет за собой появление новых свойств подложки. В работе [87] показано, что углубления диаметром 120 нм ослабляют разрастание фибробластов, так как в них уменьшается объем области, занимаемой ядром, из-за этого centrosомы располагаются ближе друг к другу. Заметим, что морфологические изменения клеток, вызываемые наноразмерными ямками на поверхности роста, аналогичны изменениям, индуцируемым ингибиторами образования цитоскелетов [87]. Полученные данные позволяют предположить влияние топографии поверхности на положение микротрубочек и микроволокон внутри развивающейся клетки, а это, в свою очередь, создает в ней воздействующие на ядро механические напряжения. Так как с локализацией внутриклеточных трубочек и волокон связаны многие ядерные и генные процессы, наблюдаемый эффект вполне может быть обусловлен механической передачей, или механотрансдукцией. В предлагаемой гипотетической модели действие, оказываемое наноглублениями на развитие клетки, вызвано передачей извне физических нагрузок, возникающих в точках контакта на топографических неоднородностях. Трансдукция физического усилия от поверхности к ядру клетки осуществляется под воздействием фактора транскрипции, который «выталкивает» лауну внутренней оболочки ядра в нуклеоплазму, активизируя тем самым действие специфического гена. В итоге, физическое влияние поверхностных особенностей проявляется в экспрессии генов и поведении клетки.

11.5.2. Стимуляция макрофагов наномасштабной топографией поверхности

Уникальной особенностью макрофагов является их способность выживать *in vivo* в качестве изолированных или присоединенных клеток на различных поверхностях. В живых организмах активированные макрофаги обычно концен-

трируются в некоторой области под воздействием хемотаксических агентов, а затем достигают центров локализации, взаимодействуя с внеклеточными волокнами и матриксами. Неудивительно, что поведение макрофагов на поверхности искусственных БМ с нанесенными углублениями заметно отличается от такового на плоских полимерных подложках, ранее использовавшихся при культивировании. Например, сравнение фагоцитоза клеток макрофага P388D1 на кремниевых подложках с канавками переменной глубины и на контрольных плоских подложках показало заметное увеличение их активности в первом случае, причем активность макрофагов возрастала пропорционально углублению канавок [72]. На поверхности канавок был отмечен рост числа волокон F-актина, доказывающий, что клетки P388D1 энергичнее прикрепляются к подложкам с более глубокими канавками [72]. Также обнаружено, что наномасштабная топография поверхности может играть важную роль в образовании макрофагов при воспалительном цитокинезе. Например, уровень IL-1 β для макрофагов J774A-1, культивировавшихся в течение 48 часов на титановых поверхностях с грубой и нерегулярной нанометрической структурой, оказался выше, чем на гладких подложках из титана [88]. При этом после 72 часов роста на грубых поверхностях наблюдалось незначительное уменьшение уровня IL-6 [88]. Данные наблюдения подтверждают общую гипотезу о том, что изменение размеров топографических особенностей может использоваться для управления клеточными процессами, связанными с адгезией.

11.5.3. Экспрессия остеобластов на поверхностях с нанотопографическими особенностями

Костная ткань часто рассматривается в качестве почти идеального материала для создания искусственных биомиметических поверхностей, поскольку она довольно хорошо изучена и служит привычной составляющей при решении многих медицинских задач. По структуре она напоминает ВКМ после длительной минерализации. Минерализованные волокна костей обладают развитой наномасштабной топографией, которая, по-видимому, заметно влияет на поведение остеобластов, поэтому уже давно предпринимаются попытки изучения воздействия поверхностных особенностей на развитие клеток костной ткани.

В работе [89] анализировали поведение клеток, похожих на остеобласты (получены из мезенхимных стволовых клеток), при культивировании в течение 24 часов на поверхности с наноканавками. Клетки приобретали вытянутую форму и ориентировались вдоль канавок, при этом вдоль канавок вытягивалась и создаваемая этими клетками коллагеновая матрица, хотя сборка аналогичной матрицы на плоской подложке происходит по случайным направлениям. В работе [61] в качестве поверхности культивирования различных клеток, в том числе остеобластов, использовались углеродные волокна. Структуры кристаллических решеток данных волокон похожи на соответствующие участки ВКМ нативной костной ткани и обладают очень грубой, шероховатой поверхностью.

Сравнение полученных данных для нескольких типов клеток показало, что именно остеобласты проявляют наибольшее сродство к материалу углеродной нановолоконной матрицы — это может быть связано как с химическим составом, так и с топографическими особенностями подложки [61]. Позднее было обнаружено, что топография подложки может модулировать дифференциацию остеобластов и экспрессию генов. При посеве остеобластов на титановую поверхность с наноразмерными порами уровень экспрессии остеокальцина и щелочной фосфатазы оказался более высоким, чем при посеве на контрольную гладкую подложку [90]. Таким образом, результаты исследований *in vitro* влияния топографии поверхностей со структурой, похожей на ВКМ костной ткани, представляют интерес для использования в моделях *in vivo* или при изготовлении имплантатов и протезов.

11.5.4. Изменение поведения клеток на поверхностях с наноканавками при добавлении растворимых компонентов

Первые исследования поведения клеток НСЕС при контакте с наноразмерными особенностями показали, что их рост на среде DVEM/F12 с сывороткой предпочтительно происходит вдоль длинных осей топографических фигур [49]. Однако затем выяснилось, что при культивировании тех же НСЕС на питательной среде *Epilife* без сыворотки ориентация клеток имеет гораздо более сложный характер: клетки избирательно выстраивались параллельно микрометровым особенностям подложки, но одновременно с этим и перпендикулярно нанометрическим структурам [91]. На поверхности с канавками глубиной 1200–1600 нм и гребнями высотой 400–500 нм у данных клеток вырабатывался некоторый усредненный ответ, т. е. они «выбирали» сразу два направления — параллельно и перпендикулярно канавкам. При меньшей глубине впадин клетки преимущественно располагались перпендикулярно. Интересно, что для углов промежуточной ориентации при культивировании клеток НСЕС избирательность отсутствует, так что клетки выстраиваются либо параллельно, либо перпендикулярно особенностям.

Примером, подтверждающим установление равновесия между воздействием топографии поверхности и растворимых факторов, служит образование нейритов в клетках PC12 при стандартных условиях культивирования, но с добавлением фактора роста нервных клеток HGF в концентрации 50 мг/мл. В опытах не наблюдалось какого-либо влияния особенностей подложки, однако при снижении концентрации HGF до некоторого субоптимального уровня регистрировались изменения поведения клеток PC12 на поверхностях с наноканавками различной глубины. Наиболее четко это проявлялось при культивировании клеток на среде, содержащей HGF в концентрации менее 5 мг/мл. В данном случае скорость формирования нейритов на нанометрических особенностях (гребни высотой 70–250 нм, глубина канавок — 600 нм) в три раза превышала таковую на плоских поверхностях и на поверхностях с особенностями микрометрового

масштаба [92]. Оба вышеописанных случая показывают, что физические особенности БМ — всего лишь один из многих факторов, регулирующих поведение клеток. Прежде всего, оно определяется присутствием растворимых белков и механизмами трансдукции сигналов, хотя некоторую роль могут играть и физические особенности строения БМ, отделяющих клетку от окружения [93]. В целом можно полагать, что поверхностная структура искусственных и естественных БМ вполне может косвенным образом регулировать распространение биохимических сигналов через мономолекулярные слои культуры тканей или даже через многослойную тканевую структуру.

11.6. Заключение

Взаимодействия биологических систем с окружающей средой не сводятся лишь к химическим реакциям. На клеточном уровне необходимо учитывать влияние физических свойств поверхности культивирования, а также особенности внеклеточных матриксов и базальных мембран, которые играют важную роль в процессах миграции, ориентации, экспрессии и дифференциации клеток, взаимодействующих с подложкой. К сожалению, в настоящее время исследователи лишь на качественном уровне понимают эффекты воздействия особенностей подложки, в частности размеров волокон, диаметра и глубины пор и т. п., на поведение клеток. Сложности анализа объясняются трудностями выделения влияния отдельного физического фактора на фоне многофункционального воздействия очень сложной структуры БМ. Однако развитие экспериментальных методов уже позволяет создавать поверхности с наноразмерными неоднородностями, рисунок и размеры которых во многом копируют структуру нативных биологических поверхностей. Развитие биомиметики должно в будущем позволить выделять и регистрировать влияние отдельных физических особенностей БМ и даже проследивать это влияние в режиме реального времени. Продолжая изучать воздействие единичных особенностей, можно надеяться получить полное описание поведения клетки, включающее учет воздействия каждой особенности в определенном момент времени.

Приведенные в данной главе примеры использования поверхностей с наноразмерной топографией являются лишь началом изучения взаимодействий клетки с физическим окружением. Наличие на подложке мелких топографических структур, имитирующих особенности базальных мембран, позволяет исследователям понять, почему некоторые закономерности, наблюдаемые *in vitro*, не удастся воспроизводить в реальном клеточном окружении *in vivo*. Дальнейшие исследования поведения клеток *in vitro* в системах с разными топографическими поверхностями позволят выработать новые стратегии культивирования клеток разных типов и даже тканей, необходимых для разработки новых методик тканевой инженерии и производства имплантатов и протезов.

Литература

1. Abrams G.A., Teixeira A.I., Nealey P.F., Murphy C.J. The effects of substratum topography on cell behavior. In: Dillow A., Lowman A., editors, *Biomimetic Materials and Design*. N-Y: Marcel Dekker; 2002; 91–138.
2. Jefferson K.K., Goldmann D.A., Pier G.B. Use of confocal microscopy to analyze the rate of vancomycin penetration through *Staphylococcus aureus* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005; 49: 2467–2473.
3. Suci P.A., Mittelman M.W., Yu F.P., Geesey G.G. Investigation of ciprofloxacin penetration into *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994; 38: 2125–2133.
4. Schembri M.A., Kjaergaard K., Klemm P. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol. Microbiol.* 2003; 48: 253–267.
5. Saxena S., Davies D.J., Kirsner R.L. Thin basement membranes in minimally abnormal glomeruli. *J. Clin. Pathol.* 1990; 43: 32–38.
6. Tonna S., et al. The risks of thin basement membrane nephropathy. *Semin. Nephrol.* 2005; 25: 171–175.
7. Taylor H.R., Kimsey R.A. Corneal epithelial basement membrane changes in diabetes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1981; 20: 548–553.
8. Makino H., Yamasaki Y., Hironaka K., Ota Z. Glomerular extracellular matrices in rat diabetic glomerulopathy by scanning electron microscopy. *Virchows Arch. B. Cell Pathol. Incl. Mol. Pathol.* 1992; 62: 19–24.
9. Liu Z., Diaz L.A. Bullous pemphigoid: end of the century overview. *J. Dermatol.* 2001; 28: 647–650.
10. Arikawa-Hirasawa E., Watanabe H., Takami H., Hassell J.R., Yamada Y. Perlecan is essential for cartilage and cephalic development. *Nat. Genet.* 1999; 23: 354–358.
11. Boutboul S., et al. A subset of patients with epithelial basement membrane corneal dystrophy have mutations in TGFBI/BIGH3. *Hum. Mutat.* 2006; 27: 553–557.
12. Gould D.B., et al. Role of COL4A1 in small-vessel disease and hemorrhagic stroke. *N. Engl. J. Med.* 2006; 354: 1489–1496.
13. Yurchenco P.D., O'Rear J.J. Basal lamina assembly. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994; 6: 674–681.
14. Laurie G.W., Leblond C.P., Martin G.R. Localization of type IV collagen, laminin, heparan sulfate, proteoglycan and fibronectin to the basal lamina of basement membranes. *J. Cell Biol.* 95: 1982; 340–344.
15. Laurie G.W., Leblond C.P., Inoue S., Martin G.R., Chung A. Fine structure of the glomerular basement membrane and immunolocalization of five basement membrane components to the lamina densa (basal lamina) and its extensions in both glomeruli and tubules of the rat kidney. *Am. J. Anat.* 1984; 169: 463–481.
16. Sanes J.R., Hall Z.W. Antibodies that bind specifically to synaptic sites on muscle fiber basal lamina. *J. Cell Biol.* 1979; 83: 357–370.
17. Sanes J.R., Laminin, fibronectin and collagen in synaptic and extrasynaptic portions of muscle fiber basement membrane. *J. Cell Biol.* 1982; 93: 442–451.
18. Noonan D.M., et al. Identification of cDNA clones encoding different domains of the basement membrane heparan sulfate proteoglycan. *J. Biol. Chem.* 1988; 263: 16379–16387.
19. Hironaka K., Makino H., Yamasaki Y., Ota Z. Pores in the glomerular basement membrane revealed by ultrahigh-resolution scanning electron microscopy. *Nephron* 1993; 64: 647–649.

20. Yamasaki Y., Makino H., Ota Z. Meshwork structures in bovine glomerular and tubular basement membrane as revealed by ultra-high-resolution scanning electron microscopy. *Nephron* 66:1994; 189–199.
21. Abrams G.A., Schaus S.S., Goodman S.L., Nealey P.F., Murphy C.J. Nanoscale topography of the corneal epithelial basement membrane and Descemet's membrane of the human. *Cornea* 2000; 19: 57–64.
22. Abrams G.A., Goodman S.L., Nealey P.F., Franco M., Murphy C.J. Nanoscale topography of the basement membrane underlying the corneal epithelium of the rhesus macaque. *Cell Tissue Res.* 2000; 299: 39–46.
23. Pufe T., et al. Endostatin/collagen XVIII – an inhibitor of angiogenesis – is expressed in cartilage and fibrocartilage. *Matrix Biol.* 2004; 23: 267–276.
24. Brammer R.D., Bramhall S.R., Eggo M.C. Endostatin expression in a pancreatic cell line is modulated by a TNF alpha-dependent elastase. *Br. J. Cancer* 2005; 93: 1024–1028.
25. Brammer R.D., Bramhall S.R., Eggo M.C. Endostatin expression in pancreatic tissue is modulated by elastase. *Br. J. Cancer* 2005; 92: 89–93.
26. Carlson M.A., Longaker M.T. The fibroblast-populated collagen matrix as a model of wound healing: a review of the evidence. *Wound Repair Regen.* 2004; 12: 134–147.
27. Lackie J.M., Chaabane N., Crockett K.V. A critique of the methods used to assess leucocyte behaviour. *Biomed. Pharmacother* 1987; 41: 265–278.
28. Presta M., Rusnati M., Urbinati C., Sommer A., Ragnotti G. Biologically active synthetic fragments of human basic fibroblast growth factor (BFGF): Identification of two Asp–Gly–Arg-containing domains involved in the mitogenic activity of BFGF in endothelial cells. *J. Cell Physiol.* 1991; 149: 512–524.
29. Nagayoshi T., et al. Human nidogen: complete amino acid sequence and structural domains deduced from cDNAs and evidence for polymorphism of the gene. *DNA* 1989; 8: 581–594.
30. Thompson M.T., et al. Biochemical functionalization of polymeric cell substrata can alter mechanical compliance. *Biomacromolecules* 2006; 7: 1990–1995.
31. Engler A., et al. Substrate compliance versus ligand density in cell on gel responses. *Biophys. J.* 2004; 86: 617–628.
32. Pelham R.J. Jr., Wang Y. Cell locomotion and focal adhesions are regulated by substrate flexibility. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 13661–13665.
33. Wozniak M.A., Desai R., Solski P.A., Der C.J., Keely P.J. Rock-generated contractility regulates breast epithelial cell differentiation in response to the physical properties of a three-dimensional collagen matrix. *J. Cell Biol.* 2003; 163: 583–595.
34. Deroanne C.F., Lapiere C.M., Nusgens B.V. *In vitro* tubulogenesis of endothelial cells by relaxation of the coupling extracellular matrix–cytoskeleton. *Cardiovasc. Res.* 2001; 49: 647–658.
35. Engler A.J., et al. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* 2004; 166: 877–887.
36. Polte T.R., Eichler G.S., Wang N., Ingber D.E. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 286: 518–528.
37. Wong G.A., Tang V., El-Sabeawy F., Weiss R.H. BMP-2 inhibits proliferation of human aortic smooth muscle cells via p21Cip1/Waf1. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003; 284: 972–979.
38. Damljanovic V., Lagerholm B.C., Jacobson K. Fibroblast traction assays on modified polyacrylamide substrates. *Mol. Biol. Cell* 2004; 15: 160 A.

39. Doyle A.D., Lee J. Cyclic changes in keratocyte speed and traction stress arise from Ca²⁺-dependent regulation of cell adhesiveness. *J. Cell Sci.* 2005; 118: 369–379.
40. Georges P.C., Miller W.J., Meaney D.F., Sawyer E.S., Janmey P.A. Matrices with compliance comparable to that of brain tissue select neuronal over glial growth in mixed cortical cultures. *Biophys. J.* 2006; 90: 3012–3018.
41. Woerly S., Doan V.D., Sosa N., de Vellis J., Espinosa-Jeffrey A. Prevention of gliotic scar formation by neurogel allows partial endogenous repair of transected cat spinal cord. *J. Neurosci Res.* 2004; 75: 262–272.
42. Engler A.J., Sen S., Sweeney H.L., Discher D.E. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126: 677–689.
43. Abrams G.A., Murphy C.J., Wang Z.Y., Nealey P.F., Bjorling D.E. Ultrastructural basement membrane topography of the bladder epithelium. *Urol. Res.* 2003; 31: 341–346.
44. Abrams G.A., Bentley E., Nealey P.F., Murphy C.J. Electron microscopy of the canine corneal basement membranes. *Cells Tissues Organs* 2002; 170: 251–257.
45. Harrison R. On the stereotropism of embryonic cells. *Science* 1911; 34: 279.
46. Harrison R. The reaction of the embryonic cells to solid structures. *J. Exp. Zool.* 1921; 17: 521.
47. Curtis A., Wilkinson C. Topographical control of cells. *Biomaterials* 1997; 18: 1573–1583.
48. Washburn N.R., Yamada K.M., Simon C.G. Jr., Kennedy S.B., Amis E.J. Highthroughput investigation of osteoblast response to polymer crystallinity: influence of nanometer-scale roughness on proliferation. *Biomaterials* 2004; 25: 1215–1224.
49. Teixeira A.I., Abrams G.A., Bertics P.J., Murphy C.J., Nealey P.F. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J. Cell Sci.* 2003; 116: 1881–1892.
50. Fan Y.W., et al. Culture of neural cells on silicon wafers with nano-scale surface topograph. *J. Neurosci. Methods* 2002; 120: 17–23.
51. Clark P., Connolly P., Curtis A.S., Dow J.A., Wilkinson C.D. Cell guidance by ultrafine topography *in vitro*. *J. Cell Sci.* 1991; 99: (Pt 1): 73–77.
52. Dalby M.J., Riehle M.O., Johnstone H.J., Affrossman S., Curtis A.S. Polymer-demixed nanotopography: control of fibroblast spreading and proliferation. *Tissue Eng.* 2002; 8: 1099–1108.
53. Dalby M.J., Yarwood S.J., Johnstone H.J., Affrossman S., Riehle M.O. Fibroblast signaling events in response to nanotopography: a gene array study. *IEEE Trans. Nanobioscience* 2002; 1: 12–17.
54. Bystrom B., Virtanen I., Rousselle P., Gullberg D., Pedrosa-Domellof F. Distribution of laminins in the developing human eye. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2006; 47: 777–785.
55. Ziebarth N.M., Manns F., Uhlhorn S.R., Venkatraman A.S., Parel J.M. Noncontactoptical measurement of lens capsule thickness in human, monkey, and rabbit postmortem eyes. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2005; 46: 1690–1697.
56. Futaki S., et al. Molecular basis of constitutive production of basement membrane components. Gene expression profiles of Engelbreth–Holm–Swarm tumor and f9 embryonal carcinoma cells. *J. Biol. Chem.* 2003; 278: 50691–50701.
57. Orkin R.W., et al. A murine tumor producing a matrix of basement membrane. *J. Exp. Med.* 1977; 145: 204–220.
58. Kleinman H.K., et al. Basement membrane complexes with biological activity. *Biochemistry* 1986; 25: 312–318.
59. Kubota Y., Kleinman H.K., Martin G.R., Lawley T.J. Role of laminin and basement membrane in the morphological differentiation of human endothelial cells into capillary-like structures. *J. Cell Biol.* 1988; 107: 1589–1598.

60. Dalby M.J., Riehle M.O., Sutherland D.S., Agheli H., Curtis A.S. Changes in fibroblast morphology in response to nano-columns produced by colloidal lithography. *Biomaterials* 25: 2004; 5415–5422.
61. Price R.L., Ellison K., Haberstroh K.M., Webster T.J. Nanometer surface roughness increases select osteoblast adhesion on carbon nanofiber compacts. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2004; 70: 129–138.
62. Stevens M.M., George J.H. Exploring and engineering the cell surface interface. *Science* 2005; 310: 1135–1138.
63. Ahmed I., et al. Three-dimensional nanofibrillar surfaces covalently modified with tenascin-c-derived peptides enhance neuronal growth *in vitro*. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006; 76: 851–860.
64. Nur E.K.A., Ahmed I., Kamal J., Schindler M., Meiners S. Three dimensional nanofibrillar surfaces induce activation of Rac. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 331: 428–434.
65. Brunette D.M. Spreading and orientation of epithelial cells on grooved substrata. *Exp. Cell Res.* 1986; 167: 203–217.
66. Chehroudi B., Gould T.R., Brunette D.M. Titanium-coated micromachined grooves of different dimensions affect epithelial and connective-tissue cells differently *in vivo*. *J. Biomed. Mater. Res.* 1990; 24: 1203–1219.
67. Chehroudi B., McDonnell D., Brunette D.M. The effects of micromachined surfaces on formation of bonelike tissue on subcutaneous implants as assessed by radiography and computer image processing. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 34: 279–290.
68. Dalby M.J., Riehle M.O., Yarwood S.J., Wilkinson C.D., Curtis A.S. Nucleus alignment and cell signaling in fibroblasts: response to a micro-grooved topography. *Exp. Cell Res.* 2003; 284: 274–282.
69. Den Braber E.T., et al. Effect of parallel surface microgrooves and surface energy on cell growth. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995; 29: 511–518.
70. Kim S.O., et al. Epitaxial self-assembly of block copolymers on lithographically defined nanopatterned substrates. *Nature* 2003; 424: 411–414.
71. Pins G.D., Bush K.A., Cunningham L.P., Campagnola P.J. Multiphoton excited fabricated nano- and micropatterned extracellular matrix proteins direct cellular morphology. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006; 78: 194–204.
72. Wojciak-Stothard B., Curtis A., Monaghan W., Mac Donald K., Wilkinson C. Guidance and activation of murine macrophages by nanometric scale topography. *Exp. Cell Res.* 1996; 223: 426–435.
73. Whitesides G.M., Ostuni E., Takayama S., Jiang X., Ingber D.E. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2001; 3: 335–373.
74. Kane R.S., Takayama S., Ostuni E., Ingber D.E., Whitesides G.M. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999; 20: 2363–2376.
75. Liliensiek S.J., Campbell S., Nealey P.F., Murphy C.J. The scale of substratum topographic features modulates proliferation of corneal epithelial cells and corneal fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2006; 79: 185–192.
76. Araki-Sasaki K., et al. An SV40-immortalized human corneal epithelial cell line and its characterization. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1995; 36: 614–621.
77. De Caprio J.A., et al. Sv 40 large tumor antigen forms a specific complex with the product of the retinoblastoma susceptibility gene. *Cell* 1988; 54: 275–283.
78. Fatt I. Architecture of the lid-cornea juncture. *CLAO J.* 1992; 18: 187–192.
79. King-Smith P.E., et al. The thickness of the human precorneal tear film: evidence from reflection spectra. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2000; 41: 3348–3359.

80. Karuri N.W., et al. Biological length scale topography enhances cell-substratum adhesion of human corneal epithelial cells. *J. Cell Sci.* 2004; 117: 3153–3164.
81. Chung T.W., Liu D.Z., Wang S.Y., Wang S.S. Enhancement of the growth of human endothelial cells by surface roughness at nanometer scale. *Biomaterials* 2003; 24: 4655–4661.
82. Diehl K.A., Foley J.D., Nealey P.F., Murphy C.J. Nanoscale topography modulates corneal epithelial cell migration. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2005; 75: 603–611.
83. Sastry S.K., Burrige K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp. Cell Res.* 2000; 261: 25–36.
84. Meyle J., Gultig K., Wolburg H., Von Recum A.F. Fibroblast anchorage to microtextured surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* 1993; 27: 1553–1557.
85. Uttayarat P, Toworfe G.K., Dietrich F., Lelkes P.I., Composto R.J. Topographic guidance of endothelial cells on silicone surfaces with micro- to nanogrooves: orientation of actin filaments and focal adhesions. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2005; 75: 668–680.
86. Curtis A.S., et al. Cells react to nanoscale order and symmetry in their surroundings. *IEEE Trans Nanobioscience* 2004; 3: 61–65.
87. Dalby M.J., et al. Nanotopographical stimulation of mechanotransduction and changes in interphase centromere positioning. *J. Cell Biochem.* 2006; 100: 326–338.
88. Tan K.S., Qian L., Rosado R., Flood P.M., Cooper L.F. The role of titanium surface topography on J 774 A. 1 macrophage inflammatory cytokines and nitric oxide production. *Biomaterials* 2006; 27: 5170–5177.
89. Zhu B., Lu Q., Yin J., Hu J., Wang Z. Alignment of osteoblast-like cells and cellproduced collagen matrix induced by nanogrooves. *Tissue Eng.* 2005; 11: 825–834.
90. Zinger O., et al. Differential regulation of osteoblasts by substrate microstructural features. *Biomaterials* 2005; 26: 1837–1847.
91. Teixeira A.I., et al. The effect of environmental factors on the response of human corneal epithelial cells to nanoscale substrate topography. *Biomaterials* 2006; 27: 3945–3954.
92. Foley J.D., Grunwald E.W., Nealey P.F., Murphy C.J. Cooperative modulation of neuritogenesis by PC 12 cells by topography and nerve growth factor. *Biomaterials* 2005; 26: 3639–3644.
93. King M.R. Anisotropic Brownian diffusion near a nanostructured surface. *J. Colloid Interface Sci.* 2006; 296: 374–376.

ФОКАЛЬНЫЕ АДГЕЗИИ И САМОСБОРКА НАНОМАСШТАБНЫХ МЕХАНОХИМИЧЕСКИХ МАШИН ДЛЯ УПРАВЛЕНИЯ РАБОТОЙ КЛЕТОК

Танмей Леле, Дональд Е. Ингбер

12.1. Введение

Живые клетки и целые организмы построены из наномасштабных молекулярных компонентов, которые формируются в результате сложных процессов иерархической самосборки. В прошлом биологи уделяли основное внимание анализу состава и структуры отдельных биохимических структур, однако сейчас очевидно, что важнейшие свойства живых клеток (включая их способности к изменению формы, перемещению и росту) зависят не только от состава, но и от архитектуры биологических объектов.

В последнее время интенсивно изучаются пространственное расположение молекулярных компонентов и способы образования структур со специализированными формами и биохимическими свойствами [1, 2]. Сказанное относится к биологическим системам различных масштабов: от сочетания нескольких молекул (объединяющихся для формирования отдельного фермента) до целой клетки, где разные виды многомолекулярных волокон, пучков и трубочек образуют молекулярную «рамку» клетки — цитоскелет.

Известно, что некоторые волокна цитоскелета ответственны за возникновение механических (например, стягивающих) сил, подобных действующим в мышечных волокнах за счет скольжения молекул актомиозина. Из этого следует, что для сохранения формы клетки все остальные части цитоскелета оказывают физическое сопротивление этим силам (как и любым другим внешним механическим нагрузкам). В то же время для реакции на внутренние и внешние напряжения клетки должны обладать собственными механизмами, позволяющими перестраивать внутреннюю структуру, т. е. удалять ненужные компоненты и включать новые. Способность преобразовывать внешние механические сигналы в биохимические реакции (и наоборот) представляет собой одну из форм так называемой механотрансдукции — одного из фундаментальных свойств материалов, составляющих живые организмы [3]. Если бы ученые поняли взаимосвязь между механическими и химическими сигналами на наномасштабном уровне, то это произвело бы подлинную революцию в биохимии, так как позволило бы создавать многофункциональные биомиметические структуры, имитирующие характеристики живых тканей.

Еще одной ключевой особенностью живых организмов, позволяющей им легко преобразовывать механическую и химическую энергию из одной формы в другую, является наличие в клетках множества структурных каркасов, выполняющих биохимические функции. Столь сложная форма метаболизма давно получила название «биохимия твердого состояния вещества» или «биохимия твердого тела» [2]. В результате такого преобразования действующее на поверхности клетки механическое напряжение передается на внутренний цитоскелет, а затем изменяет биохимическую активность клеточных органелл, реагирующих на нагрузку. Триггером, т. е. механизмом запуска биохимического сигнала (требуемой последовательности реакций), в данном случае служит некоторое изменение формы молекул, обусловленное механическим воздействием. Изменение формы, в свою очередь, приводит к изменению биофизических параметров клетки, а именно — химического сродства при молекулярном связывании, скоростей пропускания или задержки соединений в ионных каналах и т. п. [4]. Таким образом, для понимания механизмов действия биологических наноструктур и имитации их функционирования в проектируемых искусственных материалах нам необходимо понять способ создания и организации макромолекулярных каркасов, несущих основные структурные и биохимические функции. Отдельной проблемой является выяснение механизмов трансдукции механических и химических сигналов в нанометрическом масштабе.

В этой главе основное внимание уделяется специализированным клеточным структурам, с помощью которых происходит точечное прикрепление клеток, известное под названием «фокальные адгезии». Такие комплексы — пример самоорганизующихся наноструктур с большим числом функций. Они вызывают повышенный интерес из-за формирования физических «мостов», передающих усилия от воспринимающих внешние нагрузки каркасов внеклеточных мембран (ВКМ) к внутриклеточному цитоскелету за счет взаимодействий с рецепторами из трансмембранного интегрина [5–7]. Эти многомолекулярные связи создают механизм передачи механических напряжений от молекул ВКМ к белкам на сайтах внутриклеточной фокальной адгезии, которые закрепляются актином цитоскелета [6]. Кроме того, макромолекулярные каркасы обеспечивают усиление или ослабление фокальной адгезии, когда приложенные к молекулам интегрина механические напряжения возрастают или уменьшаются [8]. Внутри данных каркасов сконцентрировано большое число разнообразных молекул, трансдуцирующих сигналы [9, 10].

Таким образом, фокальная адгезия представляет собой основной сайт для внутриклеточных механохимических преобразований, и динамическая сборка структур принципиально важна для понимания поведения клеток, включая их рост, дифференциацию и миграцию. В этой главе будут изложены основные положения и концепции биохимии твердого состояния, макромолекулярной сборки веществ, клеточной механотрансдукции, механического регулирования и контроля поведения клеток путем фокальной адгезии. Мы также обсудим некоторые проблемы использования вышеперечисленных концепций для проектирования и создания биоматериалов.

12.2. Биохимия твердого состояния при фокальной адгезии

Традиционно считалось, что триггером многих процессов, характерных для поведения клеток, служит появление в среде гормонов или факторов роста, которые, взаимодействуя с рецепторами на клеточной поверхности, меняют ее конфигурацию. Изменение формы молекулы приводит к определенной последовательности биохимических реакций (сигнальная трансдукция), управляющих поведением клеток. Однако за последнее десятилетие выяснилось, что многие из модулирующих сигнальную трансдукцию молекул вообще не присутствуют внутри цитоплазмы или липидного бислоя, а начинают функционировать лишь после физического отдаления, т. е. прикрепления к нерастворимым молекулярным каркасам, находящимся внутри цитоплазмы и ядра [11].

Процесс биохимической передачи сигналов в этом случае происходит путем взаимодействий между несколькими макромолекулярными составляющими в составе самособирающихся мультимолекулярных каркасов. Есть и более высокий уровень сложности поведения описываемых структур, так как выяснилось, что образующие нерастворимые каркасы мультипротеиновые комплексы сами находятся в состоянии постоянной сборки или разборки. Это создает дополнительные возможности управления, поскольку сборка комплексов может регулироваться внешними физическими воздействиями, например приложением механических напряжений [12, 13]. То есть фокальная адгезия выступает в качестве примера нерастворимых, многомолекулярных и механохимических образований или каркасов, служащих агентами-посредниками при распространении, сокращении и миграции ВКМ на поверхности подложки.

Клетка прикрепляется к ВКМ только в нескольких точках. При этом сборка адгезии в системе клетка–подложка (субстрат) происходит лишь в том месте, где рецепторы трансмембранного интегрин связывают молекулы ВКМ (фибронектин, ламинин, витронектин и коллагены разных типов) с внешним окружением и кластером внутри наружной мембраны [7]. В результате на внутренней поверхности кластеризованных интегринов должны одновременно находиться различные молекулы, включая требуемые для фокальной адгезии каркаса белки (талин, винкулин, α -актинин, паксиллин, зилин и филамин), которые физически связывают интегрины с напряженными микроволокнами актина, в результате чего происходит механическое прикрепление ВКМ к цитоскелету (рис. 12.1, см. цв. вклейку). На цитоскелете находятся и другие белки, соединения и структуры, необходимые для формирования фокальной адгезии, в число которых входят участвующие в процессах трансдукции различные сигнальные молекулы: аминокислоты (тирозин, серин и треонин), протеинфосфатазы, G-протеины и рецепторы факторов роста [14, 15]. В настоящее время точно установлено, что центры фокальной адгезии — весьма сложные макромолекулярные образования, состоящие из 50 и более различных белков [10]. При этом каждый из них несет собственную, уникальную функцию в создании центра адгезии, обеспечивая связывание на поверхности раздела клетки

и ВКМ и протекание биохимических реакций, с помощью которых регулируется поведение клетки.

Подробные структурные исследования строения центров фокальной адгезии показали, что их характерная толщина составляет примерно 60 нм, а площадь (в плоскости, параллельной субстрату ВКМ) — несколько квадратных микрометров [16]. Методом двухфотонной микроскопии с зондами в виде флуоресцентных мембран было показано, что на клеточных мембранах существуют отдельные упорядоченные участки, которые, в свою очередь, могут влиять на структуру ассоциированных липидных слоев [17]. Центры адгезии могут изменять форму и размеры внутри одной и той же клетки, поскольку они способны постоянно образовываться, созревать и разрушаться [18].

Сформировавшийся центр фокальной адгезии завершает сложный процесс, начинающийся с образования очень маленьких, точечных адгезий («фокальных комплексов») на ведущем крае подвижной клетки [18], химический состав которых заметно отличается от состава зрелых центров фокальной адгезии [14]. Зарождающиеся центры адгезии характеризуются очень низкой концентрацией α -актинина, винкулина, паксиллина, FАC и VASP, в них также отсутствует зилин, большие количества которого характерны для зрелых центров [14]. Большинство зарождающихся центров затем разрушается, однако некоторые из них, постепенно увеличиваясь в размерах, превращаются в зрелые центры фокальной адгезии. Для рассматриваемых нами проблем особенно важно, что их образование может зависеть от приложенных в точке контакта внешних механических напряжений [14].

Воздействие длительных и противоположно направленных растягивающих напряжений внутри клетки приводит к преобразованию и сдвигу в направлении ядра некоторых фокальных центров адгезии, в результате возникают линейные структурные образования, называемые «фибриллярные адгезии» [19]. В отличие от упоминавшихся выше фокальных адгезий и фокальных комплексов (распологающихся по периферии клеток) фибриллярные адгезии (или «якоря») находятся в центре клеток. Данные центры обычно обогащены альфа5-бета1 интегрином, что отличает их от фокальных адгезий, для которых характерно присутствие интегрин альфа5/бета-3 [20]. Кроме того, в фибриллярных адгезиях наблюдается повышенное (по сравнению с фокальными) содержание тензина и низкий уровень фосфотирозина [20]. Перечисленные формы адгезий (фокальные комплексы, фокальные адгезии и фибриллярные адгезии) различаются не только по форме, размерам и субклеточной локализации, но и по молекулярному составу.

12.3. Фокальные адгезии в качестве машины механотрансдукции

Фокальные адгезии играют роль своеобразных мостов или центров связи между ВКМ, интегринными и сократительными актинами цитоскелета и в этом качестве именно они обеспечивают предпочтительные маршруты преобразова-

ния механических усилий при прохождении через поверхность клеток [6]. Их роль проявляется двояко: при передаче внутренних, вытягивающих усилий (от цитоскелета к субстрату ВКМ), и при передаче внешних механических усилий в обратном направлении, т. е. к цитоскелету и клеточному ядру [21].

Заметим, что фокальная адгезия не просто пассивный проводник физических воздействий через молекулы сигнальной трансдукции — она может изменять собственную структуру в зависимости от величины прилагаемых нагрузок [22, 23]. Например, было обнаружено, что для неподвижных (закрепленных) клеток существует прямая корреляция между площадью фокальной адгезии и величиной вытягивающих нагрузок, возникающих в центрах контакта с субстратом [24, 25]. В исследованиях, где вытягивающие усилия в микроволокнах искусственно ослаблялись (за счет использования ингибиторов сократимости миозина II), было обнаружено зависящее от времени разрушение уже существующих фокальных адгезий и прекращение формирования новых [26, 27]. Опыты с поверхностным слоем клеток показали, что приложение жидкостных сдвиговых напряжений к верхушечной (апикальной) части клеток, а также приложение механических напряжений ко всему клеточному объему вызывает перестройку фокальных адгезий на подложке. Это происходит вследствие вызываемой напряжениями активации дополнительных интегриновых рецепторов [28, 29]. С другой стороны, создание (с использованием специальных микропипеток) жидкостных сдвиговых напряжений в апикальной части клеток может индуцировать формирование адгезий в основании клетки по механизму, не связанному с сократимостью миозина II [8]. Во многих работах сделано предположение, что передача напряжений в системах описываемого типа происходит через цитоскелет [5, 6, 21, 30–33].

При выращивании клеток на ВКМ различной жесткости обнаружили, что размер фокальных адгезий на мягких подложках меньше, чем на жестких. Исследователи объясняли этот факт возникновением меньших по величине вытягивающих усилий на более мягких внутриклеточных матриксах [34]. Приведенные выше экспериментальные данные подтверждают гипотезу о возможности управления сборкой фокальных адгезий за счет направленного приложения внешних механических нагрузок.

Возможность контроля состава и концентрации макромолекул внутри фокальных адгезий изучалась во многих работах с использованием ряда методик: от простого приложения внешних нагрузок до изменения химического сродства лигандов ВКМ [35], ее механических свойств [36], распределения наномасштабных лигандов и топологии подложки [37, 38]. На сборку фокальных адгезий также влияет растворение при распространении сигналов, включая внеклеточно регулируруемую киназой сигнализацию, управляющую ростом клеток [39]. Многие сигнальные цепочки клеточных реакций «запускаются» лигированием (химическим связыванием) интегрин, в результате в клетках изменяются процессы формообразования, экспрессия генов, дифференциация и апоптоз [39–45]. При этом другие важные особенности клеток (рост, подвижность, факторы выживания) продолжают зависеть от способности интегринов

трансдуцировать механические сигналы через мембраны и образовывать фокальные адгезии. Например, было обнаружено, что передача усилия к фокальной адгезии происходит через связи интегрина с цитоскелетом, которые вызывают множество реакций отклика, в том числе включение сигнальной системы сАМР [46, 47]. Оказалось, что приток ионов Ca^{2+} внутрь клеток (через чувствительные к механическим нагрузкам ионные каналы) приводит к различным процессам: перестройке цитоскелета [48], изменению формы клеток [49, 50] и морфологии клеточных ядер [21]. Два последних явления одинаково значимы для развития клетки, ее роста, дифференциации, сократительной способности, подвижности, а также сохранения растворимых цитокинов и гормонов [51–56]. Таким образом, фокальные адгезии представляют собой некие наномасштабные механохимические устройства, которые могут осуществлять трансдукцию прилагаемых к клетке механических нагрузок и превращение их во внутримолекулярные биохимические сигнальные реакции. Эта способность позволяет фокальным адгезиям одновременно регулировать физические и химические параметры физиологии клеток на уровне ВКМ.

12.4. Влияние механических воздействий на процессы связывания в фокальных адгезиях

Основной вопрос исследований в данной области заключается в том, каким образом механические силы могут регулировать процессы сборки сложных наномасштабных комплексов, т. е. чем являются центры связывания или фокальные адгезии. Единственный разумный механизм основан на предположении, что прилагаемые силы способны изменять конформацию макромолекул [57, 58] и обнаруживать так называемые скрытые сайты связывания, способствуя тем самым появлению необходимых связывающих реагентов. Например, с использованием для регистрации конформационных изменений белков методики FRET (резонансный перенос энергии флуоресценции), было показано, что механические нагрузки локализуются на ВКМ макромолекул, вызывая их самоорганизацию (фиброгенез фибронектинов), происходящую вне клеток [59, 61]. Путем компьютерного моделирования была изучена возможность протекания аналогичных процессов в фокальных адгезиях внутри клеток [57, 58].

С другой стороны, изменение конформации молекул при действии физических нагрузок может быть обусловлено кинетикой адгезионного связывания. Предполагается, что приложение силы приводит к нарушению равновесия между связанными и несвязанными протеинами, влекущее за собой наблюдаемые изменения размеров и плотности фокальной адгезии. Данная теория частично опирается на результаты более ранних работ по механическому управлению биохимическими процессами, где предполагалось, что константа скорости диссоциации k_{OFF} для рецепторов в комплексе лиганд–рецептор экспоненциально возрастает по мере увеличения механических нагрузок. Это было экспериментально доказано для адгезионных взаимодействий между нейрофилами при

сдвиге: в предельных состояниях они на очень короткое время способны связываться с покрытыми Р-селектином подложками [62]. Некоторые лиганд-рецепторные связи легко разрушаются при возрастании нагрузки (их даже называют «скользящие связи»), в то же время другие связи при увеличении нагрузки укрепляются — их именуют «захватывающие связи» [63, 65]. Доказательства существования «захватывающих» химических связей были получены путем использования атомно-силовой микроскопии при изучении взаимодействия между свободным Р-селектином и Р-селектином с лиганд-1 гликопротеином [65].

Авторы этой главы занимались экспериментальным подтверждением гипотезы, в соответствии с которой механические нагрузки могут изменять кинетику связывания белков фокальных адгезий внутри живых клеток [12, 66]. Они применили метод FRAP (восстановление флуоресценции после фотообесцвечивания) для определения локализованных в адгезиях GFP-меченых белков (винкулина и зилина). Принцип действия FRAP основан на том, что на молекулы, располагающиеся на небольших участках изучаемых систем (поверхность мембраны, цитоплазмы или ядра), наносятся флуоресцентные метки, светящиеся при облучении короткими лазерными импульсами. Используя соответствующую длину волны, можно «обесцветить» все молекулы, подвергнутые воздействию лазера, не затрагивая при этом их внутренней структуры и функций [67]. Такая методика позволяет получать последовательные изображения флуоресцирующих поверхностей и измерять, например, скорость перераспределения остающихся флуоресцировать молекул в цитоплазме или перемещение молекул на каркасах фокальных адгезий.

Авторам удалось показать, что измерение методом FRAP скорости восстановления зилина и винкулина не связано со скоростью молекулярной диффузии, так что при некоторых условиях нормированное восстановление FRAP можно использовать для оценки величины константы k_{OFF} (см. выше) отдельных белков внутри живых клеток.

Путем измерений было показано, что время восстановления зилина и винкулина внутри фокальных адгезий в живых капиллярных клетках эпителия составляет несколько секунд (рис. 12.2) [66]. Для регистрации прилагаемых к данным адгезиям нагрузок исследователи либо химически ингибировали связанное с актомиозином напряжение (применяя соответствующие фармакологические препараты), либо физически ограничивали отдельные напряженные волокна тщательно сфокусированным излучением фемтосекундного лазера, которое выжигало целевые клеточные структуры (размеры области облучения ~ 300 нм) [68, 69]. Разрыв напряженных волокон приводил к сокращению их концов (рис. 12.3) и дальнейшей релаксации стягивающих напряжений на центрах адгезии, соединяющих клетку с подложкой [70].

Используя описанную методику (ее иногда называют «лазерная хирургия»), ученым удалось разрывать отдельные внутриклеточные стрессорные волокна и непосредственно измерять параметры диссипации напряжений на отдельных фокальных адгезиях. При изучении кинетики связывания зилина и винкулина методом FRAP было также обнаружено, что константа скорости реакции диссо-

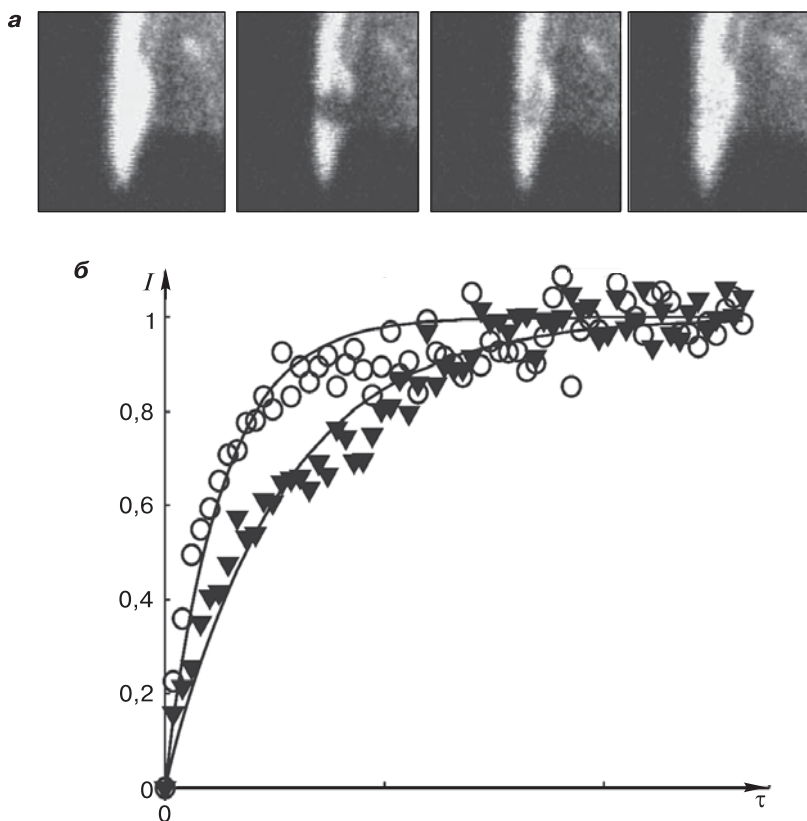


Рис. 12.2. Изученное методом FRAP ускорение восстановления зилина в живых клетках при диссипации напряжений. Снимки в ряду (а) представляют изображения отдельной фокальной адгезии, содержащей GFP-зилин. Метод FRAP позволяет оценить содержание GFP-зилина в разные моменты времени. Крайний снимок слева относится к адгезии в исходном состоянии, три следующих — к моментам времени 0, 12 и 40 с после начала процесса. Воздействие заключается в том, что очень небольшой круговой участок (площадь $< 1 \text{ мкм}^2$) фотообесцвечивается мощным лазерным импульсом (с длиной волны излучения 488 нм), создаваемым лазерным сканирующим конфокальным флуоресцентным микроскопом типа Zeiss LMS 510 meta (отметим, что флуоресцентное окрашивание после импульса обесцвечивания восстанавливается); б — на кривых показаны зависимости от времени интенсивности флуоресценции GFP-зилина на контрольном образце (светлые кружки) и число клеток, в которых происходит диссипация напряжений (темные треугольники). Сплошные кривые соответствуют стандартным подгоночным кривым для релаксации в виде функции $[1 - \exp(-k_{\text{OFF}} t)]$, где значение константы k_{OFF} оценивалось по методу наименьших квадратов. Подробности эксперимента можно найти в работе [82]

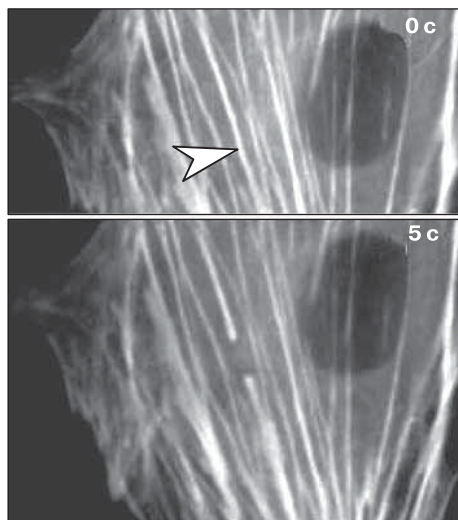


Рис. 12.3. Диссипации напряжений в живой клетке после механического разрушения в ней отдельного напряженного волокна, осуществляемого так называемой лазерной хирургией. На снимках, полученных сканирующим флуоресцентным микроскопом, белой стрелкой показано отдельное волокно выделяющей YFP-актин живой клетки эндотелия до (*вверху*) и через 5 с после воздействия (*внизу*) мощного импульса света, разрушающего его. В экспериментах применялся лазер Ti/сапфир с длиной волны излучения 790 нм. Подробности эксперимента можно найти в работе [70]

циации k_{OFF} для зилина возрастает с уменьшением напряжений, что отражено на кривых скорости восстановления флуоресценции (рис. 12.2, б) [66]. Интересно, что константа скорости реакции диссоциации k_{OFF} для винкулина (локализованного вместе с зилином в одних и тех же адгезионных центрах) не изменяется [66]. Таким образом, эффективная константа скорости диссоциации интересующих нас белков определяется взаимодействиями между обесцвечиваемой флуоресцентной молекулой и молекулами, с которыми она взаимодействует. Следовательно, сборка некоторых адгезионных белков может регулироваться механическими нагрузками, способными изменить кинетику связывания участвующих в сборке молекул. Важно и то, что измеренные изменения константы скорости диссоциации зилина позволяют предсказать общие зависимости констант скоростей от напряжений в течение довольно длительного времени удаления зилина из фокальной адгезии. Возможность измерения констант скоростей — интересный инструмент для построения системных моделей динамической сборки фокальных адгезий.

12.5. Фокальные адгезии в роли многофункционального биоматериала

Хотя биологи привыкли рассматривать фокальные адгезии в качестве сложных и многомoleкулярных сигнальных комплексов (или даже механотрансдукционных органелл), в действительности данные объекты — новый тип биологических материалов, свойства которых определяются их функциональностью (речь идет о фиксации клеток на поверхности), что требует особого химического состава компонентов. Необходимо заметить, что фокальные адгезии по многим свойствам очень отличаются от искусственных биоматериалов.

Во-первых, фокальные адгезии могут динамически собираться и разбираться под воздействием прилагаемых нагрузок. Этот процесс может быть вызван биохимически (запуском сигнальных реакций), причем после протекания реакций и окончания сборки наблюдается биохимическая генерация клетками неких растягивающих нагрузок [8].

Во-вторых, фокальные адгезии выступают в роли посредника в процессах механохимической трансдукции, что является следствием их способности к изменению конфигурации макромолекул и кинетики их связывания в ходе иммобилизации клетки на поверхности под действием физических сил. Кстати, тот же закрепляющий комплекс способен создавать механохимические модификации в строении фокальной адгезии и изменять уровень нагрузок, передаваемых через цитоскелет к ВКМ и соседним клеткам. Следовательно, биохимические сигналы способны каким-то образом влиять на движение и сокращение клеток.

Важно и то, что фокальные адгезии также выступают посредниками в ходе преобразования механической энергии в электрическую. Это может происходить за счет зависящей от прилагаемой нагрузки активации ионных каналов клеточных мембран, так как изменения нагрузки, по-видимому, влияют на активность связанных с мембранами интегринов [71–73]. Возможна и обратная зависимость, т. е. электрические сигналы воздействуют на клеточные функции, процессы сборки и передачу биохимических сигнальных реакций через фокальные адгезии. Данное воздействие может происходить за счет изменений регулируемых внешними силами ионных потоков через клеточные мембраны.

Можно также сказать, что фокальная адгезия — это центр объединения различных химических сигналов, передающихся связанными, растворимыми или нерастворимыми молекулами к располагающимся на поверхности клеток сигнальным рецепторам. При этом сигналы от лигирования и кластеризации поверхностных рецепторов растворимыми факторами роста (FGF, PDGF) приводят к изменению обмена Na^+/H^+ или модификации липидов инозитола, т. е. клетка каким-то образом отличает эти сигналы от сигналов, возникающих при связывании интегрин с нерастворимыми молекулами ВКМ независимо от нагрузки.

В целом поведение клетки регулируется совокупностью поступающих сигналов, в процессе их интеграции участвуют ферменты и субстраты, роль которых заключается в закреплении основы цитоскелета в фокальной адгезии [74–78].

В заключение хотелось бы отметить, что фокальные адгезии — замечательный биоматериал, способный одновременно воспринимать, объединять и обрабатывать поступающие сигналы, а также управлять ответными реакциями. Этот материал позволяет клеткам объединять поступающую информацию, а затем изменять свою собственную структуру, усиливая или ослабляя активность некоторых функций в соответствии с условиями окружения. Такие функциональные особенности адгезий уникальны для живых организмов, а их имитация — цель разработок, связанных с созданием новых биоматериалов.

12.6. Заключение

Регулирование механических характеристик биоматериалов за счет управления поведением отдельных клеток является стратегическим направлением тканевой инженерии [34]. Возможные практические приложения таких исследований простираются от управления «переключением» стволовых клеток и создания мышечных тканей *in vitro* до управления дифференциацией нейронов [79–81]. Очень интересные перспективы открывает предпочтительное присоединение клеток к поверхностям, особенности которых напоминают механическое окружение клеток *in vivo*. Так, способность клеток воспринимать степень жесткости подложки тесно связана с взаимодействиями в системе ВКМ–цитоскелет внутри фокальных адгезий. Проблема сборки последних в живых клетках является центральной для решения многих важных задач современной медицины, включая терапию, технологическую разработку клеточных интерфейсов и проектирование новых биоматериалов для тканевой инженерии.

Супрамолекулярная самосборка структур, подобных фокальным адгезиям, является универсальной особенностью живого. Известно, что столь сложные комплексы с большим числом разнообразных белков формируются через переходные связывающие взаимодействия между молекулярными компонентами. При этом механические силы (внутренние, возникающие в актине цитоскелета, или внешние, передаваемые к клеткам через микроокружение) могут участвовать в управлении связывающими взаимодействиями и, следовательно, контролировать общий процесс сборки. Известно также, что формирование центров адгезии тесно связано с внутриклеточными сигналами (последовательностями сигнальных реакций), «руководящими» основными этапами развития клетки (дифференциацией, ростом и апоптозом). Из сказанного легко осознать высокую актуальность для биологии и медицины проблемы изучения процессов сборки фокальных адгезий с учетом наблюдаемого эффекта механохимической конверсии энергии. Эта проблема касается нескольких научных дисциплин, поэтому полное понимание механизмов образования адгезий может быть достигнуто лишь на основе междисциплинарных исследований, накопления экспериментальных данных, а также применения методов молекулярного моделирования, позволяющих предсказывать возможные изменения конформаций участвующих в сборке белков при механических нагрузках. В этом контексте

огромную ценность приобретают методы изучения клеток *in vitro*, которые позволяют точно измерять кинетические параметры связывания белков.

Основная цель будущих исследований состоит не только в определении путей передачи механических нагрузок отдельным молекулам или группам молекул внутри фокальных адгезий, но и их участии в самосборке адгезии посредством изменения структуры химических связей. Для решения этих задач необходимо дальнейшее развитие экспериментальных методик (FRAP, FRET и лазерной хирургии), что позволит понять влияние прилагаемых к интегринам и цитоскелету сил на изменение активности биологических молекул и связанных с цитоскелетом ферментов.

Изучение фокальных адгезий может стать основой дизайна нового поколения так называемых умных биоматериалов, способных к самосборке из различных молекулярных компонентов. При этом скорость сборки вещества может регулироваться не только физическими и биохимическими методами, но и путем преобразования механической и химической энергий. Разработав такие методики проектирования материалов, можно в будущем перейти к промышленному производству многофункциональных структур, способных одновременно воспринимать информацию от окружающей среды, обрабатывать ее и откликаться соответствующим образом. Способные к реакции на окружающие условия «умные» материалы, конечно, найдут множество практических применений в разных областях — от тканевой инженерии до создания биокомпьютеров.

Сейчас трудно предсказать время создания первых искусственных самоорганизующихся систем или «машин механохимической трансдукции». Для успеха исследований в этом направлении необходимо значительно усовершенствовать и развить существующие нанотехнологические методики и разобраться в механизмах молекулярной сборки, однако представляется очевидным, что рассмотренные выше фокальные адгезии — исключительно интересная модель, свойства которой мы должны научиться воссоздавать и копировать.

Литература

1. Ingber D.E. Tensegrity I. Cell structure and hierarchical systems biology. *J. Cell Sci.* 2003; 116 (Pt 7): 1157–1173.
2. Ingber D.E. Tensegrity II. How structural networks influence cellular information processing networks. *J. Cell Sci.* 2003; 116 (Pt 8): 1397–1408.
3. Ingber D.E. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again. *FASEB J.* 2006; 20 (7): 811–827.
4. Ingber D.E. Tensegrity: the architectural basis of cellular mechanotransduction. *Annu. Rev. Physiol.* 1997; 59: 575–599.
5. Ingber D.E. Integrins as mechanochemical transducers. *Curr. Opin. Cell Biol.* 1991; 3 (5): 841–848.
6. Wang N., Butler J.P., Ingber D.E. Mechanotransduction across the cell surface and through the cytoskeleton. *Science* 1993; 260 (5111): 1124–1127.
7. Hynes R.O. Integrins: bidirectional, allosteric signaling machines. *Cell* 2002; 110(6): 673–687.

8. Riveline D., et al. Focal contacts as mechanosensors: externally applied local mechanical force induces growth of focal contacts by an mDia1-dependent and ROCK-independent mechanism. *J. Cell Biol.* 2001; 153 (6): 1175–1186.
9. Zamir E., Geiger B. Molecular complexity and dynamics of cell–matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 2001; 114 (Pt 20): 3583–3590.
10. Zamir E., Geiger B. Components of cell–matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 2001; 114 (Pt 20): 3577–3579.
11. Alberts B. The cell as a collection of protein machines: preparing the next generation of molecular biologists. *Cell* 1998; 92 (3): 291–294.
12. Lele T., Thodeti C.K., Ingber D.E. Force meets chemistry: analysis of mechanochemical conversion in focal adhesions using fluorescence recovery after photobleaching. *J. Cell Biochem.* 2006; 97 (6): 1175–1183.
13. Rabut G., Doye V., Ellenberg J. Mapping the dynamic organization of the nuclear pore complex inside single living cells. *Nat. Cell Biol.* 2004; 6 (11): 1114–1121.
14. Zaidel-Bar R., Ballestrem C., Kam Z., Geiger B. Early molecular events in the assembly of matrix adhesions at the leading edge of migrating cells. *J. Cell Sci.* 2003; 116 (Pt 22): 4605–4613.
15. Bershadsky A.D., Balaban N.Q., Geiger B. Adhesion-dependent cell mechanosensitivity. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003; 19: 677–695.
16. Franz C.M., Muller D.J. Analyzing focal adhesion structure by atomic force microscopy. *J. Cell Sci.* 2005; 118 (Pt 22): 5315–5323.
17. Gaus K., Le Lay S., Balasubramanian N., Schwartz M.A. Integrin-mediated adhesion regulates membrane order. *J. Cell Biol.* 2006; 174 (5): 725–734.
18. Beningo K.A., Dembo M., Kaverina I., Small J.V., Wang Y.L. Nascent focal adhesions are responsible for the generation of strong propulsive forces in migrating fibroblasts. *J. Cell Biol.* 2001; 153 (4): 881–888.
19. Smilenov L.B., Mikhailov A., Pelham R.J., Marcantonio E.E., Gundersen G.G. Focal adhesion motility revealed in stationary fibroblasts. *Science* 1999; 286 (5442): 1172–1174.
20. Zamir E., et al. Molecular diversity of cell–matrix adhesions. *J. Cell Sci.* 1999; 112 (Pt 11): 1655–1669.
21. Maniotis A.J., Chen C.S., Ingber D.E. Demonstration of mechanical connections between integrins, cytoskeletal filaments, and nucleoplasm that stabilize nuclear structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94 (3): 849–854.
22. Choquet D., Felsenfeld D.P., Sheetz M.P. Extracellular matrix rigidity causes strengthening of integrin–cytoskeleton linkages. *Cell* 1997; 88 (1): 39–48.
23. Wang N., Ingber D.E. Probing transmembrane mechanical coupling and cytomechanics using magnetic twisting cytometry. *Biochem. Cell Biol.* 1995; 73 (7–8): 327–335.
24. Balaban N.Q., et al. Force and focal adhesion assembly: a close relationship studied using elastic micropatterned substrates. *Nat. Cell Biol.* 2001; 3 (5): 466–472.
25. Schwarz U.S., et al. Calculation of forces at focal adhesions from elastic substrate data: the effect of localized force and the need for regularization. *Biophys. J.* 2002; 83 (3): 1380–1394.
26. Etienne-Manneville S., Hall A. Rho GTP-ases in cell biology. *Nature* 2002; 420 (6916): 629–635.
27. Hall A., Nobes C.D. Rho GTP-ases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 2000; 355 (1399): 965–970.

28. Tzima E., Pozo M.A., Shattil S.J., Chien S., Schwartz M.A. Activation of integrins in endothelial cells by fluid shear stress mediates Rho-dependent cytoskeletal alignment. *EMBO J.* 2001; 20 (17): 4639–4647.
29. Katsumi A., Naoe T., Matsushita T., Kaibuchi K., Schwartz M.A. Integrin activation and matrix binding mediate cellular responses to mechanical stretch. *J. Biol. Chem.* 2005; 280 (17): 16546–16549.
30. Hu S., et al. Intracellular stress tomography reveals stress focusing and structural anisotropy in cytoskeleton of living cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003; 285 (5): 1082–1090.
31. Hu S., et al. Mechanical anisotropy of adherent cells probed by a three-dimensional magnetic twisting device. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 287 (5): 1184–1191.
32. Hu S., Chen J., Butler J.P., Wang N. Prestress mediates force propagation into the nucleus. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 329 (2): 423–428.
33. Ingber D.E. Cellular tensegrity: defining new rules of biological design that govern the cytoskeleton. *J. Cell Sci.* 1993; 104 (Pt 3): 613–627.
34. Discher D.E., Janmey P., Wang Y.L. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate. *Science* 2005; 310 (5751): 1139–1143.
35. Kato M., Mrksich M. Using model substrates to study the dependence of focal adhesion formation on the affinity of integrin–ligand complexes. *Biochemistry* 2004; 43 (10): 2699–2707.
36. Reinhart-King C.A., Dembo M., Hammer D.A. The dynamics and mechanics of endothelial cell spreading. *Biophys. J.* 2005; 89 (1): 676–689.
37. Dalby M.J., Riehle M.O., Sutherland D.S., Agheli H., Curtis A.S. Use of nanotopography to study mechanotransduction in fibroblasts – methods and perspectives. *Eur. J. Cell Biol.* 2004; 83 (4): 159–169.
38. Teixeira A.I., Abrams G.A., Bertics P.J., Murphy C.J., Nealey P.F. Epithelial contact guidance on well-defined micro- and nanostructured substrates. *J. Cell Sci.* 2003; 116 (Pt 10): 1881–1892.
39. Chen Q., Kinch M.S., Lin T.H., Burridge K., Juliano R.L. Integrin-mediated cell adhesion activates mitogen-activated protein kinases. *J. Biol. Chem.* 1994; 269 (43): 26602–26605.
40. Burridge K., Wennerberg K. Rho and Rac take center stage. *Cell* 2004; 116 (2): 167–179.
41. Ridley A.J., et al. Cell migration: integrating signals from front to back. *Science* 2003; 302 (5651): 1704–1709.
42. DeMali K.A., Wennerberg K., Burridge K. Integrin signaling to the actin cytoskeleton. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2003; 15 (5): 572–582.
43. Sastry S.K., Burridge K. Focal adhesions: a nexus for intracellular signaling and cytoskeletal dynamics. *Exp. Cell Res.* 2000; 261 (1): 25–36.
44. Burridge K., Chrzanowska-Wodnicka M. Focal adhesions, contractility and signalling. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1996; 12: 463–518.
45. Romer L.H., Burridge K., Turner C.E. Signaling between the extracellular matrix and the cytoskeleton: tyrosine phosphorylation and focal adhesion assembly. *Cold Spring. Harb. Symp. Quant. Biol.* 1992; 57: 193–202.
46. Overby D.R., et al. Magnetic cellular switches. *IEEE Transac. Magn.* 2004; 40 (4): 2958–2960.
47. Matthews B.D., Overby D.R., Mannix R., Ingber D.E. Cellular adaptation to mechanical stress: role of integrins, Rho, cytoskeletal tension, and mechanosensitive ion channels. *J. Cell Sci.* 2006; 119 (Pt 3): 508–518.

48. Overby D.R., Matthews B.D., Alsberg E., Ingber D.E. Novel dynamic rheological behavior of focal adhesions measured within single cells using electromagnetic pulling cytometry. *Acta Biomater.* 2005; 3: 295–303.
49. Chen C.S., Alonso J.L., Ostuni E., Whitesides G.M., Ingber D.E. Cell shape provides global control of focal adhesion assembly. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2003; 307 (2): 355–361.
50. Brock A., et al. Geometric determinants of directional cell motility revealed using microcontact printing. *Langmuir* 2003; 19 (5): 1611–1617.
51. Polte T.R., Eichler G.S., Wang N., Ingber D.E. Extracellular matrix controls myosin light chain phosphorylation and cell contractility through modulation of cell shape and cytoskeletal prestress. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2004; 286 (3): 518–528.
52. Parker K.K., et al. Directional control of lamellipodia extension by constraining cell shape and orienting cell tractional forces. *FASEB J.* 2002; 16 (10): 1195–1204.
53. Chen C.S., Mrksich M., Huang S, Whitesides G.M., Ingber D.E. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997; 276 (5317): 1425–1428.
54. Ingber D.E., Folkman J. Mechanochemical switching between growth and differentiation during fibroblast growth factor-stimulated angiogenesis *in vitro*: role of extracellular matrix. *J. Cell Biol.* 1989; 109 (1): 317–330.
55. Ingber D.E., Folkman J. How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell* 1989; 58 (5): 803–805.
56. Singhvi R., et al. Engineering cell shape and function. *Science* 1994; 264 (5159): 696–698.
57. Kamm R.D., Kaazempur-Mofrad M.R. On the molecular basis for mechanotransduction. *Mech. Chem. Biosyst.* 2004; 1 (3): 201–209.
58. Zaman M.H., Kaazempur-Mofrad M.R. How flexible is alpha-actinin's rod domain? *Mech. Chem. Biosyst.* 2004; 1 (4): 291–302.
59. Baneyx G., Baugh L., Vogel V. Coexisting conformations of fibronectin in cell culture imaged using fluorescence resonance energy transfer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98 (25): 14464–14468.
60. Vogel V., Thomas W.E., Craig D.W., Krammer A., Baneyx G. Structural insights into the mechanical regulation of molecular recognition sites. *Trends Biotechnol.* 2001; 19 (10): 416–423.
61. Baneyx G., Baugh L., Vogel V. Fibronectin extension and unfolding within cell matrix fibrils controlled by cytoskeletal tension. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99 (8): 5139–5143.
62. Chen S., Springer T.A. Selectin receptor–ligand bonds: formation limited by shear rate and dissociation governed by the bell model. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2001; 98 (3): 950–955.
63. Dembo M., Torney D.C., Saxman K., Hammer D. The reaction-limited kinetics of membrane-to-surface adhesion and detachment. *Proc. R Soc. Lond. B Biol. Sci.* 1988; 234 (1274): 55–83.
64. Konstantopoulos K., Hanley W.D., Wirtz D. Receptor–ligand binding: «catch» bonds finally caught. *Curr. Biol.* 2003; 13 (15): 611–613.
65. Marshall B.T., et al. Direct observation of catch bonds involving cell-adhesion molecules. *Nature* 2003; 423 (6936): 190–193.
66. Lele T., Pendse J., Kumar S., Salanga M., Ingber D.E. Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions in living cells. *J. Cell Physiol.* 2006; 207 (1): 187–194.

67. Phair R.D., Misteli T. Kinetic modelling approaches to *in vivo* imaging. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001; 2 (12): 898–907.
68. Shen N., et al. Ablation of cytoskeletal filaments and mitochondria in cells using a femtosecond laser nanoscissor. *Mech. Chem. Biosys.* 2005; 2: 17–26.
69. Heisterkamp A., et al. Pulse energy dependence of subcellular dissection by femtosecond laser pulses. *Opt. Expr.* 2005; 13 (10): 3690–3696.
70. Kumar S., et al. Viscoelastic retraction of single living stress fibers and its impact on cell shape, cytoskeletal organization and extracellular matrix mechanics. *Biophys. J.* 2006; 90 (10): 3762–3773.
71. Shakibaei M., Mobasheri A. Beta1-integrins colocalize with Na, K-ATPase, epithelial sodium channels (ENaC) and voltage activated calcium channels (VACC) in mechanoreceptor complexes of mouse limb-bud chondrocytes. *Histol. Histopathol.* 2003; 18 (2): 343–351.
72. Alenghat F.J., Nauli S.M., Kolb R., Zhou J., Ingber D.E. Global cytoskeletal control of mechanotransduction in kidney epithelial cells. *Exp. Cell Res.* 2004; 301 (1): 23–30.
73. Chen J., Fabry B., Schiffrin E.L., Wang N. Twisting integrin receptors increases endothelin-1 gene expression in endothelial cells. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001; 280 (6): 1475–1484.
74. Ingber D.E. Fibronectin controls capillary endothelial-cell growth by modulating cell shape. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 1990; 87 (9): 3579–3583.
75. Schwartz M.A., Lechene C., Ingber D.E. Insoluble fibronectin activates the Na/H antiporter by clustering and immobilizing integrin alpha-5 beta-1, independent of cell shape. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1991; 88 (17): 7849–7853.
76. Mc. Namee H.P., Liley H.G., Ingber D.E. Integrin-dependent control of inositol lipid synthesis in vascular endothelial cells and smooth muscle cells. *Exp. Cell. Res.* 1996; 224 (1): 116–122.
77. McNamee H.P., Ingber D.E., Schwartz M.A. Adhesion to fibronectin stimulates inositol lipid synthesis and enhances PDGF-induced inositol lipid breakdown. *J. Cell Biol.* 1993; 121 (3): 673–678.
78. Plopper G.E., Mc. Namee H.P., Dike L.E., Bojanowski K., Ingber D.E. Convergence of integrin and growth factor receptor signaling pathways within the focal adhesion complex. *Mol. Biol. Cell* 1995; 6 (10): 1349–1365.
79. Engler A.J., et al. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell* 2006; 126 (4): 677–689.
80. Engler A.J., et al. Myotubes differentiate optimally on substrates with tissue-like stiffness: pathological implications for soft or stiff microenvironments. *J. Cell Biol.* 2004; 166 (6): 877–887.
81. Griffin M.A., Sen S., Sweeney L., Discher D.E. Adhesion-contractile balance in myotube differentiation. *J. Cell Sci.* 2004; 117 (Pt 24): 5855–5863.
82. Lele T.P., et al. Mechanical forces alter zyxin unbinding kinetics within focal adhesions of living cells. *J. Cell Physiol.* 2006; 207 (1): 187–194.

РЕГУЛЯЦИЯ ПОВЕДЕНИЯ КЛЕТОК С ПОМОЩЬЮ ТРАНСФЕКЦИИ

Джасприт К. Вазир и Винод Лабхасетвар

13.1. Введение

РНК и ДНК являются основными генетическими компонентами клеточного аппарата, с помощью которых передается поток информации, необходимый для нормального функционирования клетки. Однако при различных заболеваниях нередко происходит сбой в интерпретации этой информации, что приводит к нарушению функционирования клеток. Анализ генома человека позволил идентифицировать ряд генов, участвующих в развитии заболеваний. Это открыло новые возможности в лечении болезней с помощью метода генной терапии (замены дефектного гена или изменения экспрессии гена путем введения другого генетического материала в клетки организма). Введение чужеродной ДНК или РНК в клетку называют трансфекцией. В настоящее время трансфекция представляет собой обычный лабораторный метод, позволяющий изучать функции генов, изменять их экспрессию, производить биохимическое картирование или анализ мутаций. Таким образом, теперь стало возможным контролировать поведение клетки с помощью трансфекции. В этой главе мы обсудим возможности изменения поведения клеток с помощью введения в них ДНК или РНК, практическое применение такого подхода, а также новые терапевтические методы, основанные на трансфекции.

13.2. Методы трансфекции

Полинуклеотидные молекулы (ДНК или РНК) представляют собой длинные гидрофильные макромолекулы, имеющие общий отрицательный заряд. Эти молекулы очень лабильны в биологических средах и плохо проникают через биологические мембраны. Таким образом, для их переноса требуются эффективные и безопасные векторные системы. Обычно методы трансфекции подразделяют на методы с использованием вирусных векторов (ретровирусов, аденоассоциированных вирусов или лентивирусов), химические методы (с участием полимеров или липидов), а также физические методы (электропорация, микроинъекции, тепловой шок). Системы на основе вирусов подразумевают использование генетически измененных ретровирусов, аденовирусов,

аденоассоциированных вирусов (ААВ) или других вирусов для переноса генетической информации. Вирусы способны с высокой эффективностью доставлять в клетки чужеродный генетический материал, однако вероятность возникновения сильного иммунного ответа (в случае аденовирусов) и риск инсерционного мутагенеза (для ретровирусных векторов [1]) вызывают активные дискуссии относительно безопасности применения подобных систем для проведения генной терапии. Таким образом, в настоящее время ведутся исследования, направленные на создание более подходящих векторных систем для трансфекции клеток, которые обладали бы меньшей инвазивностью (большей безопасностью) и высокой эффективностью. Эти исследования привели к появлению невирусных векторов для доставки генетического материала.

К невирусным методам переноса относятся векторы на основе наночастиц, липосом и комплексов с катионными липидами (липоплексы) или с полимерами (полиплексы), а также механические методы: электропорация или инъекция плазмид с помощью микрошприцев, особенно для переноса генетического материала через кожу. Полимерные наночастицы для доставки генов можно получить простой конденсацией полинуклеотидов (ДНК, РНК) с полимерами: поли-*L*-лизинном (ПЛ), полиэтиленимином (ПЭИ), полиамидамином или полиимидазолами; включением ДНК в полимерную матрицу из полиэтиленоксида, полимолочной кислоты (ПМК), сополимера молочной и гликолевой кислот (ПМГК) или полиалкилцианоакрилатов; образованием комплексов между ДНК и поверхностью готовых полимерных наночастиц с привитыми катионными ПАВ или полисахаридами. Это три основных типа полимерных наночастиц, которые используют для изучения возможностей трансфекции клеток генетическим материалом (ДНК/РНК) [2]. Включение ДНК в наночастицы путем конденсации, инкапсулирования или комплексообразования приводит к получению систем с совершенно разными свойствами и трансфецирующей активностью, что позволяет использовать их для различных целей. Эти отличия возникают, главным образом, из-за несоответствия между основными химическими свойствами полимеров и методом приготовления наночастиц. Катионные полимеры, такие как ПЛ и ПЭИ, способные эффективно уплотнять ДНК, часто непригодны для применения *in vivo* из-за цитотоксичности, невозможности разложения в биологических системах и способности агрегировать в физиологических условиях. Напротив, наночастицы, приготовленные из биоразлагаемых полимеров, таких как ПМГК/ПМК, стабильны в кровотоке, но их трансфецирующая активность значительно уступает соответствующей активности наночастиц из катионных полимеров. Тем не менее, наночастицы из ПМГК/ПМК обладают одним важным преимуществом, которым не следует пренебрегать, а именно: они способны защищать и медленно высвобождать ДНК/РНК в клетке, что обеспечивает поддержание в ней определенного уровня генетического материала на протяжении длительного времени. Попытки синтезировать разлагаемые в биологических условиях катионные полимеры с низкой токсичностью и высокой трансфецирующей активностью в конечном итоге должны привести к созданию новых полимерных наночастиц для трансфекции. Кроме того,

использование специфических лигандов помогает направлять полимерные наночастицы к определенным клеткам-мишеням и преодолевать некоторые клеточные барьеры. Так, ядерная мембрана остается пока непреодолимым барьером для проведения трансфекции ДНК. Использование пептидов, являющихся сигналами ядерной локализации, и тканеспецифичных промоторов пока находится лишь в стадии испытания, однако предварительные данные позволяют надеяться на возможность улучшения ядерного транспорта ДНК. Метод электропорации основан на использовании электрического поля для создания небольших пор в клеточной мембране (электропор), что позволяет крупным заряженным молекулам ДНК и РНК проникать в цитоплазму и в ядро клетки. Метод генной пушки и микроинъекции также являются чрезвычайно эффективными способами прямой доставки ДНК к специфической мишени. К ограничениям этих методов относится небольшое количество трансфицируемых клеток и участие высококвалифицированного исследователя.

13.3. Физические и биологические барьеры

Чтобы трансфекция прошла успешно и молекулы ДНК или РНК могли достичь своей мишени в клетке, необходимо преодолеть несколько физических и биологических барьеров. Физический барьер для создания полимерной системы доставки генов, которая пока представляет собой лишь идеалистическую перспективу, состоит в том, что эта система должна сжимать молекулы ДНК/РНК до такого размера, чтобы они смогли легко проникать в клетки, а также поддерживать их стабильность и биологическую активность.

После проникновения в клетку вектору необходимо преодолеть определенные трудности, чтобы достичь цитоплазмы или ядра, и на каждом этапе происходит потеря значительной части молекул ДНК/РНК. К этим трудностям относятся поддержание физической и химической стабильности вектора в культуральной среде или в системном кровотоке, связывание с клетками и интернализация клетками в результате эндоцитоза, внутриклеточный транспорт и высвобождение ДНК/РНК в цитоплазму, перенос через цитоплазму к ядру и проникновение ДНК в ядро [3]. Методы трансфекции ДНК и РНК можно разделить на группы в зависимости от конечной локализации в клетке. Для экспрессии генов ДНК должна быть перенесена в ядро клетки, а РНК действует в цитоплазме. Таким образом, векторы для переноса РНК могут быть устроены несколько проще, чем те, что нужны для переноса ДНК.

Методы трансфекции сильно различаются по эффективности, которая отчасти зависит от взаимодействия вектора с клеточной мембраной и от его высвобождения из эндосом [4]. Узнавание наночастиц клетками и их связывание с клеточной мембраной могут усиливаться при использовании специфических лигандов, способных связываться со специфическими рецепторами на клеточной мембране. Это взаимодействие не только способствует присоединению наночастиц к поверхности клетки, но также усиливает интернализацию наночастиц за счет опосредованного рецепторами эндоцитоза. Наиболее узким местом

в использовании полимерных носителей для трансфекции является то, что после эндоцитоза полимерные векторы могут остаться изолированными в эндосомальном компартменте клеток. В процессе эволюции вирусы выработали весьма эффективный механизм, позволяющий им покидать эндосомальный компартмент и возвращаться в цитоплазму. Они имеют в своей оболочке так называемые фузогенные (т. е. способствующие слиянию) или разрывающие мембрану пептиды, которые позволяют вирусным частицам легко проникнуть в цитоплазму. Однако эффективность трансфекции клеток невирусными векторами в значительной степени определяется способностью вектора уйти из эндосом. Именно с этим связан активный поиск стратегий, позволяющих повысить вероятность выхода невирусных полимерных векторов из эндосом с тем, чтобы повысить эффективность переноса генов. В исследованиях *in vivo* возникает еще больше сложностей. Физико-химические свойства вектора имеют чрезвычайно большое значение для их биораспределения, фармакокинетики и, следовательно, влияют на эффективность проводимого лечения [5]. Таким образом, для создания подходящей системы переноса ДНК/РНК в клетки в системах *in vivo* очень важно понять взаимосвязь между характеристиками вектора и фармакокинетикой его распределения.

13.4. Трансфекция клеток молекулами ДНК

Успешное введение ДНК в клетки в условиях *in vitro* является первым шагом к проведению регуляции поведения клеток в нормальном состоянии и при заболевании. Однако возможности введения ДНК в клетки *in vivo* ограничены из-за отсутствия безопасных и эффективных методов трансфекции генов. В этом разделе мы рассмотрим возможности применения трансфекции в генной терапии, тканевой инженерии, а также в качестве экспериментального инструмента в функциональной геномике.

13.4.1. Генная терапия

Введение ДНК в клетки рассматривается в качестве способа влияния на поведение клеток через экспрессию недостающего или дефектного гена. Методы трансфекции применяют с целью корректировки потери генов, ответственных за подавление роста опухолей (p53), экспрессию клеточных рецепторов, продукцию гормонов и ферментов, секрецию факторов роста, а также для ДНК-иммунизации. Генная терапия призвана лечить заболевания на генетическом уровне путем изменения биологии клетки в терапевтических целях. Например, при устранении генетического дефекта методом генной терапии может оказаться необходимым поддерживать физиологическую концентрацию определенного белка на протяжении длительного времени. В рамках генной терапии для коррекции гормональной недостаточности нужно не только достичь нормального уровня экспрессии гена, но и обеспечить физиологический импульсный характер секреции гормона [6]. Общий биологический эффект активной проли-

ферации клеток также является патологическим фактором в развитии некоторых заболеваний. Скорость и кинетические закономерности пролиферации клеток при раке могут значительно отличаться от таковых при других пролиферативных нарушениях, таких как рестеноз, и это необходимо учитывать при выборе вектора для переноса генов. Было показано, что снижение числа пролиферирующих клеток на 50% снижает на 90% разрастание неоинтимы у пациентов, перенесших ангиопластическую операцию, что считается хорошим терапевтическим результатом [7]. Таким образом, в результате трансфекции можно достичь клинически значимого ослабления роста неоинтимы. Напротив, для достижения полной ремиссии у пациентов с диссеминированной формой рака необходимо полностью уничтожить все раковые клетки.

В большинстве случаев особое внимание уделяют эффективности трансфекции, однако, как показано ниже, при определенных заболеваниях даже низкий, но постоянный уровень экспрессии гена может оказаться более эффективным. Одним из подобных примеров является терапевтический ангиогенез, при котором требуется постоянный невысокий уровень экспрессии генов, кодирующих факторы ангиогенеза (например, VEGF или FGF). Известно, что при высоком уровне содержания ростовых факторов образуются сосуды с легко проницаемыми стенками, которые являются нефункциональными и со временем регрессируют. Таким образом оказывается, что постоянно низкий уровень экспрессии гена является более эффективным для формирования зрелых и функциональных кровеносных сосудов [8].

Комплекс ДНК с ПЭИ использовали для доставки терапевтической ДНК, олигонуклеотидов или РНК в рамках экспериментальной генной терапии *in vivo*. Для доставки плазмидной ДНК можно использовать ПЭИ с любой молекулярной массой, однако для переноса небольших молекул нуклеиновых кислот, таких как РНК, лучше использовать комплексы с низкомолекулярным ПЭИ [9]. Системное введение полиплексов, содержащих ПЭИ и ген опухолевого супрессора p53, один раз в три дня на протяжении трех недель при ортотопической модели рака мочевого пузыря приводило к снижению размера опухоли на 70%. При внутривенном введении соответствующих полиплексных комплексов экспрессия репортерного гена в опухолевой ткани в 14 раз превышала его экспрессию в легких [10]. Авторы этой работы объясняют предпочтительное накопление полиплексов в опухоли (по сравнению с легкими) и их низкую цитотоксичность низким значением соотношения N/P. В этом случае полиплексы имеют слабый положительный дзета-потенциал, что ослабляет их взаимодействие с белками сыворотки и делает полиплексы идеальным инструментом для системной доставки гена к опухолевой ткани в условиях *in vivo*.

Линейный ПЭИ с молекулярной массой 22 кДа успешно применяли для переноса клонированного гена рецептора соматостатина типа 2 (sst2) в моделях трансплантированного первичного и метастазирующего рака поджелудочной железы у хомяков [11]. Пептид соматостатин подавляет пролиферацию клеток с помощью нескольких подтипов поверхностных клеточных рецепторов: sst1, sst2 и sst5. Было обнаружено, что при аденокарциноме поджелудочной железы

у человека, а также в линиях панкреатических опухолевых клеток происходит прекращение экспрессии гена *sst2*. Таким образом, коррекция дефицита гена *sst2* в панкреатических клетках может замедлить рост опухоли и сделать ее чувствительной к лечению соматостатином. Линейный ПЭИ образовывал комплекс с плазмидной ДНК, содержащей мышинный ген *sst2*. Комплексы ПЭИ с ДНК с помощью инъекций вводили внутрь опухоли хомякам с модельным раком поджелудочной железы. Через шесть дней после введения комплексов в опухоль в результате переноса гена *sst2 in vivo* отмечалось значительное замедление роста первичной опухоли, а также уменьшение распространения метастаз в печени.

Разлагаемые в биологических условиях наночастицы из ПМГК способны поддерживать длительное высвобождение ДНК внутри клеток, обеспечивая тем самым продолжительную экспрессию генов. Она особенно важна в том случае, когда время полужизни экспрессируемого белка слишком коротко, а также при необходимости постоянной доставки генетического материала для достижения наилучшего терапевтического результата. Прабха и Лабхасетвар провели внутриклеточное высвобождение плазмидной ДНК из наночастиц ПМГК, способствующее поддержанию постоянного уровня ДНК в клетке. Этот результат можно использовать для повышения экспрессии генов, что на количественном уровне определяется по содержанию мРНК с помощью метода ПЦР с обратной транскрипцией. Оказывается, наночастицы, содержащие ген *wt-p53*, обеспечивают более высокий уровень мРНК для *p53*, чем соответствующие липосомы, даже через пять дней после трансфекции клеток рака молочной железы линии MDA-MB-435S [12]. Поддержание уровня экспрессии *p53* приводило к более значимому и длительному торможению пролиферации клеток по сравнению с теми же показателями при трансфекции клеток свободной плазмидой (рис. 13.1). Коэн с соавторами доказали, что, хотя в условиях *in vitro* уровень трансфекции наночастицами уступал уровню трансфекции липосомами, в условиях *in vivo* уровень трансфекции наночастицами на один-два порядка превосходил соответствующий уровень для липосом через семь дней после внутримышечного введения препаратов крысам [13]. Эти эксперименты показали поддержание постоянного уровня экспрессии гена *in vivo* на протяжении 28 дней после внутримышечного введения одной дозы в виде наночастиц.

Перенос ДНК в клетки, кроме того, является альтернативой иммунизации. Хитозановые наночастицы рассматриваются в качестве потенциального носителя для пероральной иммунизации, что связано со способностью хитозана связываться со слизистыми оболочками. После перорального приема хитозановые наночастицы, содержащие ДНК, могут прикрепляться к эпителию ЖКТ и трансфицировать эпителиальные или иммунные клетки, присутствующие в ассоциированной с кишечником лимфоидной ткани [14]. Исследования *in vitro* показали, что хитозан способен стимулировать трансклеточный и параклеточный транспорт лекарственных препаратов через монослой эпителиальных клеток кишечника [15]. Рой с соавторами провели успешную иммунизацию с помощью перорального введения генов, используя комплексы ДНК с хитозаном [16]. Мышам с

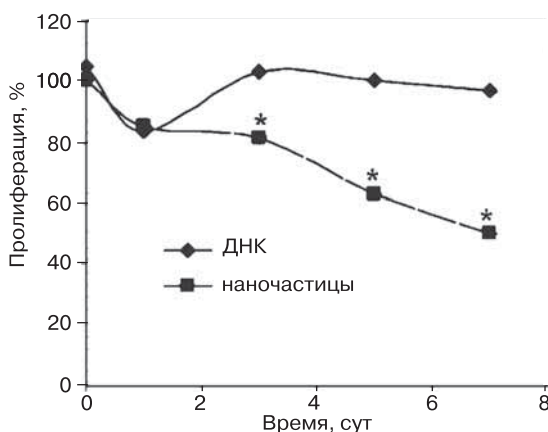


Рис. 13.1. Антипролиферативная активность наночастиц, содержащих ДНК *wt-p53*, по сравнению с активностью свободной ДНК *wt-p53* в клетках MDA-MB-435S. Клетки в 96-луночных планшетах (2500 клеток в лунке) инкубировали с наночастицами (500 мкг/мл) или с эквивалентным количеством свободной ДНК (10,5 мкг/мл). В качестве контрольных образцов использовали реакционную среду или наночастицы без ДНК. За ростом клеток следили с помощью стандартного метода, заключающегося в измерении поглощения, прямо пропорционального числу жизнеспособных клеток. При включении ДНК в наночастицы наблюдалось повышение антипролиферативной активности. На графике представлены усредненные результаты с учетом стандартного отклонения ($n = 6$; $p < 0,01$ для точек, отмеченных звездочкой). Воспроизводится в соответствии с работой [12] с разрешения авторов

индуцированной гиперчувствительностью к арахису перорально вводили хитозановые наночастицы, содержащие ДНК, и через четыре недели после первой иммунизации определяли уровень сывороточных и секретируемых антител. Было выявлено значительное различие уровня антител у мышей, получивших наночастицы с препаратом, по сравнению с контрольными мышами или с животными, иммунизированными свободной ДНК. Эффективность экспрессии генов при пероральном введении хитозановых наночастиц с ДНК анализировали с помощью использования в той же модели гена *lacZ*. У мышей, получивших наночастицы, наблюдался более высокий уровень экспрессии гена в желудке и в тонкой кишке по сравнению с мышами, получившими свободную плазмидную ДНК.

13.4.2. Тканевая инженерия

Индукцированная клетками регенерация тканей обычно производится с помощью локальных внешних сигналов, способствующих пролиферации и дифференцировке клеток. К таким сигналам относятся факторы роста, сигнальные молекулы и молекулы внеклеточного матрикса. Для регенерации тканей проводят трансфекцию клеток плазмидной ДНК, содержащей различные факторы

роста [17–19]. Более жесткие требования к такому подходу предъявляются в тех случаях, когда белки или факторы роста, необходимые для развития ткани, имеют малое время полужизни. Плазмидную ДНК, кодирующую фактор роста фибробластов 4 (FGF4), в составе гидрогелевых микрочастиц из катионизированного желатина вводили кроликам с модельной ишемией задних конечностей [20]. Трансфекция приводила к усилению ангиогенеза за счет усиления экспрессии FGF4 в месте инъекции по сравнению с инъекцией раствора плазмидной ДНК. Образующиеся в результате трансфекции гена кровеносные сосуды были полностью функциональными и физиологически зрелыми.

Еще одним интересным применением трансфекции клеток для тканевой инженерии являются генетические изменения биологических функций стволовых клеток. Терапия с помощью стволовых клеток имеет большое будущее, однако часто стволовые клетки необходимо определенным образом модифицировать, чтобы активировать специфическую биологическую функцию. Один из примеров — использование эндотелиальных клеток-предшественников (ЭКП) в качестве вектора для переноса ДНК, а также в качестве инструмента для тканевой инженерии. ЭКП трансфецировали плазмидной ДНК, кодирующей ангиогенный фактор адреномедуллин, которую включали в катионизированные микрочастицы желатина. Затем трансфецированные ЭКП вводили крысам с легочной гипертензией. ЭКП преимущественно направлялись к поврежденному легочному эндотелию и восстанавливали его [21].

13.4.3. Функциональная геномика

Для анализа связи экспрессии гена с функциональным ответом клеток можно использовать высокопроизводительную систему микрочипов. Этот подход также применяют для скрининга больших наборов последовательностей-мишеней для терапевтических нужд [22, 23]. В одном исследовании была проведена трансфекция клеток коллагеном, смешанным с плазмидной ДНК, или вирусами, несущими эту ДНК. Смесь коллагена с плазмидой наносили в виде точек на стеклянные пластинки или в лунки и использовали для трансфекции клеток. Чипы с трансфецированными клетками затем анализировали для выявления клеточного ответа с помощью микроскопических или биохимических методов. Методы трансфекции для такого исследования должны быть недороги и эффективны для широкого спектра первичных клеток и клеточных линий [24].

13.5. Трансфекция клеток молекулами РНК

Метод РНК-интерференции (РНКи) основан на том, что двуниевая РНК (днРНК) может связываться с мРНК-мишенью и вызывать ее деградацию путем использования эндогенной природы биологического пути и тем самым выключать экспрессию соответствующих генов. РНКи представляет собой выработанный в ходе эволюции консервативный механизм выключения генов. Файер с соавторами первыми описали интерференцию РНК в клетках животных,

а именно в нематоде *C. elegans* [25]. Позднее РНКи обнаружили и в клетках млекопитающих [26]. В этом механизме в роли эффекторных молекул, направляющих деградацию мРНК, выступают небольшие (21–30 нуклеотидов) двуни-тевые молекулы РНК, которые называют малыми интерферирующими РНК (миРНК). Последовательность этих миРНК комплементарна последовательности мРНК того белка, транскрипция которого должна быть остановлена. При вхождении в клетку миРНК включаются в мультисубъединичный рибонуклео-протеиновый комплекс, называемый РНК-индуцируемым комплексом сайленс-инга (RISC), который связывается с мРНК и инициирует ее деградацию.

Малые интерферирующие РНК могут входить в клетку при трансфекции хи-мически синтезируемыми молекулами или образовываться внутри клеток в ре-зультате ферментативного расщепления длинных двуни-тевых РНК. Синтез миРНК позволяет точно контролировать их последовательность и чистоту и вносить химические модификации, повышающие эффективность их дей-ствия. Малые интерферирующие РНК и так называемые короткие шпилечные РНК (кшРНК) могут образовываться в клетках в результате трансфекции кле-ток плазмидной ДНК, несущей соответствующий транскрипт. Синтезируемые химическим путем миРНК оказывают более слабое неспецифическое побочное действие благодаря жесткому контролю уровня вводимой РНК. Длительность выключения генов определяется скоростью деления клеток. Молекулы миРНК имеют высочайший терапевтический потенциал благодаря малому размеру и возможности проведения химических модификаций, позволяющих достичь большей стабильности и эффективности.

Основу химической структуры эффективной миРНК составляет дуплекс РНК длиной 19 пар нуклеотидов с выступающей последовательностью из двух нук-леотидов на 3'-конце. Способность выключать гены зависит от последователь-ности миРНК; были разработаны правила, позволяющие синтезировать эффек-тивные миРНК [27]. В 2002 г. днРНК назвали «достижением года» [28]. Все это указывает на важную роль интерференции РНК не только как исследователь-ского инструмента, но и как нового подхода к лечению многих заболеваний.

13.5.1. Инструмент анализа функций генов

Метод интерференции РНК является мощным инструментом в «обратном гене-тическом анализе», с помощью которого функцию гена определяют путем ее выключения. Относительно недавно РНКи был применен к анализу генов в клетках млекопитающих [29]. С помощью ретровирусных векторов можно создавать библиотеки кшРНК, позволяющие выключать экспрессию генов мле-копитающих. Интерференция РНК активно используется для изучения различ-ных генов, связанных с раком, инфекционными заболеваниями и заболеваниями дыхательных путей. Один из таких экспериментов позволил выявить новые гены, участвующие в остановке клеточного цикла, происходящей при наличии р53 [30]. Изменяя количество экспрессирующейся в клетке миРНК, стало воз-можным определить относительное содержание продукта гена, необходимое

для протекания какого-либо процесса во временном и в пространственном измерении [31]. Это расширило спектр экспериментов, которые можно производить на млекопитающих. Таким образом, выключение генов при помощи РНКи в сочетании с данными геномных последовательностей может помочь в определении функции любого гена, экспрессирующегося в клетке. Высокая эффективность выключения генов при низкой концентрации миРНК, высокая специфичность и стабильность, а также низкая стоимость синтеза также являются факторами, способствующими активному использованию миРНК в функциональной геномике [32]. В настоящее время для проведения анализа в культуре тканей млекопитающих РНКи является наиболее предпочтительным методом функциональной геномики.

Опосредованное миРНК выключение генов может быть надежным и ценным методом для крупномасштабного скрининга функций генов и идентификации мишеней новых лекарственных препаратов. При создании лекарственных препаратов метод РНКи также может использоваться для оценки специфичности и изучения механизма действия нового химического соединения, прежде чем начнется его продвижение в качестве лекарственного препарата [33]. Кроме того, с помощью РНКи получают трансгенных мышей со стабильно выключенными генами. Для внутриклеточного производства миРНК (из кшРНК) можно использовать индуцибельные или тканеспецифичные промоторы, что позволит получать животных, у которых экспрессия гена выключена в определенном типе клеток или тканей [34]. Поскольку последовательности РНК отключают экспрессию в различной степени, можно получить трансгенных мышей с различным уровнем выключения генов. Использование РНКи также позволяет создавать мышей с двумя отключенными генами, которые располагаются рядом друг с другом на одной хромосоме. Кроме того, выбирая в качестве мишени консервативный участок последовательности, можно отключать целое семейство генов с помощью одной-единственной миРНК [32].

Хотя метод РНКи предлагает наиболее быстрый путь получения трансгенных мышей, степень его надежности пока точно неизвестна. Необходимы дополнительные исследования, которые помогут понять, насколько воспроизводимо может быть отключена экспрессия генов во всех тканях или специфических тканях-мишенях в определенный момент времени, чтобы иметь возможность получать организмы с разным фенотипом.

13.5.2. Терапевтический подход

Малые интерферирующие РНК представляют собой новый интересный класс терапевтических средств, отличающихся широким спектром применения, относительной простотой и низкой стоимостью синтеза (по сравнению с рекомбинантными белками или моноклональными антителами). Так, миРНК можно напрямую использовать для выключения экспрессии генов, ответственных за возникновение или прогрессирование заболевания [35]. В нескольких исследованиях были показаны терапевтические возможности миРНК: они защищали

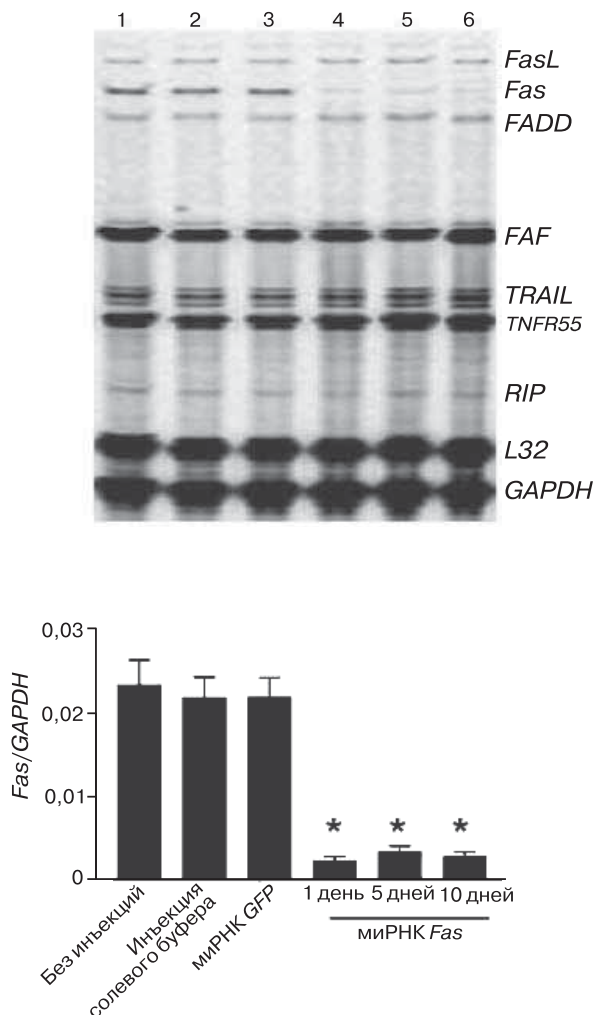


Рис. 13.2. Использование метода защиты от РНКазы для изучения экспрессии миРНК *Fas* в гепатоцитах мышей. Дорожки: 1 — контрольный образец; 2 — предварительная инъекция (за 24 ч) солевого буфера; 3 — предварительная инъекция миРНК флуоресцентного белка GFP (последовательность 1); 4 — предварительная инъекция миРНК *Fas* (последовательность 1). Дорожки 5 и 6 отражают подавление экспрессии *Fas* в мышах, которым была сделана инъекция миРНК *Fas*, через 5 и через 10 суток соответственно. Экспрессия других генов, связанных с *Fas*, а также генов «домашнего хозяйства» (*L32* и *GAPDH*) не изменялась. Нижний рисунок отражает результаты денситометрического анализа и показывает отношение *Fas/GAPDH* (средние значения для трех мышей в каждой колонке). Уровень мРНК *Fas* в гепатоцитах был значительно ниже ($*P < 0,001$) у мышей, подвергшихся воздействию миРНК *Fas*, по сравнению с контрольными животными. Воспроизводится из работы [36] с разрешения авторов

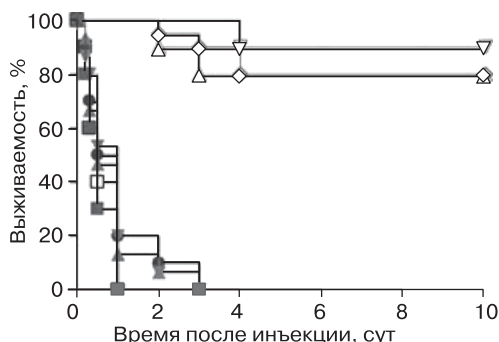


Рис. 13.3. Выживаемость мышей, которым была сделана инъекция миРНК *Fas*, по сравнению с выживаемостью мышей, которым был введен солевой раствор или миРНК GFP; предварительно животным была сделана интраперитонеальная инъекция *Fas*-специфических антител. За животными наблюдали на протяжении 10 суток, а потом умерщвляли. Последовательности, отключавшие *Fas* на 80% и более, защищали животных от фульминантного гепатита, а последовательности, которые не выключали экспрессию или выключали ее недостаточно эффективно, не оказывали защитного действия. * $P < 0,0001$. ■ и ▲ — GFP ($n = 10$); ▼ — солевой буфер ($n = 15$); ◇ — *Fas* (последовательность 1) ($n = 20$); ● — *Fas* (последовательность 2) ($n = 10$); □ — *Fas* (последовательность 4) ($n = 10$); △ — *Fas* (последовательность 5) ($n = 10$); ▽ — *Fas* (последовательность 6) ($n = 10$). Воспроизводится из работы [36] с разрешения авторов

мышей от фульминантного гепатита [36], вирусной инфекции [37], сепсиса [38], роста опухоли [39] и дегенерации желтого пятна [40]. Выключение гена *Fas*-рецептора (ответственного за апоптоз гепатоцитов), опосредованное миРНК, может иметь терапевтическое значение для предотвращения или лечения остро и хронического поражения печени, гепатита, печеночной недостаточности и отторжения пересаженной печени. Такое терапевтическое действие было показано путем введения мышам миРНК против гена *Fas* в двух моделях аутоиммунного гепатита [36]. миРНК вводили мышам в хвостовую вену методом гидродинамической инъекции. Уровень мРНК и белка *Fas* в гепатоцитах мышей значительно снижался после инъекций, причем это продолжалось не менее 10 дней (рис. 13.2). Фульминантный гепатит индуцировали путем введения животным агонистических *Fas*-специфичных антител. Среди животных, подвергавшихся лечению миРНК против *Fas*, через 10 дней выживало 82%, тогда как без лечения животные погибали через три дня (рис. 13.3). Эти результаты говорят о том, что эффективного выключения генов в гепатоцитах можно добиться с помощью гидродинамических инъекций миРНК в хвостовую вену, причем достигается достаточно стойкий эффект, поскольку гепатоциты представляют собой редко делящиеся клетки.

Кроме того, миРНК способны повысить эффективность препаратов первой линии при лечении определенных заболеваний. Так, было показано, что миРНК усиливают действие иматиниба (специфического конкурентного ингибитора

Ab1-киназы). миРНК использовали для снижения уровня белков Vcr/Ab1, что усиливает действие иматиниба [41]. Одна из важнейших проблем лечения онкологических больных с помощью химиотерапевтических препаратов состоит в развитии лекарственной устойчивости, связанной с экспрессией гена MDR (кодирующего Р-гликопротеин, который выполняет функцию переносчика многих лекарственных препаратов). В экспериментах *in vitro* было показано, что метод РНКи позволяет подавить экспрессию MDR1 и преодолеть устойчивость к даунорубину в опухолевых клетках поджелудочной железы и желудка на 90% и более [42]. В настоящее время проводятся многочисленные клинические испытания, направленные на изучение возможностей применения миРНК в качестве терапевтического агента.

13.5.3. Доставка миРНК внутрь клеток

13.5.3.1. *In vitro*

Эффективное выключение гена можно провести либо путем трансфекции клеток *in vitro* с помощью химически синтезированных миРНК, либо путем трансфекции клеток с помощью транскрипта, закодированного на плазмидной ДНК. В любом случае вводимые в клетку молекулы — миРНК или плазмидная ДНК — являются гидрофильными полианионами, и для их эффективного переноса в клетку требуется определенный вектор. Однако введение в клетку химически синтезированных миРНК обычно провести проще, чем введение транскрипта. Дело в том, что для выключения генов молекулы миРНК обязательно попадают в цитоплазму клетки, тогда как для образования миРНК на основании плазмидной ДНК эта плазида должна быть доставлена в ядро. Более того, выключение генов путем трансфекции клеток млекопитающих дуплексами миРНК является временным и зависит от количества молекул миРНК, поступивших в клетку. В клетках млекопитающих отсутствует фермент РНК-зависимая РНК полимеразы, которая могла бы амплифицировать молекулы миРНК в клетке. Таким образом, количество действующих молекул миРНК в клетке уменьшается с каждым делением. Оми и его коллеги показали, что активность миРНК в пролиферирующих клетках сохраняется от 3 до 7 дней, однако может присутствовать более трех недель в терминально дифференцированных клетках (нейроны) [43]. Экспрессию гена можно выключить в линиях клеток млекопитающих, в первичных клетках и даже в эмбриональных стволовых клетках [44].

Эльбашир с соавторами первыми сообщили о трансфекции культивируемых клеток млекопитающих дуплексами миРНК [26]. Синтезировали дуплексы миРНК гена люциферазы и вносили их в клетки вместе с плазмидой с геном люциферазы. Для трансфекции использовали катионные липосомы и разные линии клеток млекопитающих: NIH/3T3, COS-7 и HeLa S3. Экспрессию гена люциферазы анализировали через 20 ч после проведения трансфекции. Оказалось, что дуплексы миРНК способны специфическим образом подавлять экспрессию гена люциферазы, но по-разному в разных клеточных линиях. Еще одним инте-

ресным результатом этого эксперимента было то, что миРНК оказались чрезвычайно мощными реагентами, поскольку свое действие они проявляли в концентрации, которая на несколько порядков ниже обычно требуемой концентрации других антисмысловых реагентов.

Ввести миРНК в клетки млекопитающих можно с помощью векторов на основе липидов путем конъюгации с пептидами или методом электропорации. Пептиды ММР представляют собой амфипатические пептиды, способные проникать через двойную липидную мембрану клетки без энергетических затрат. Тиолсодержащие миРНК конъюгировали с МРР (пенетратин, транспортан) путем создания дисульфидных мостиков [45]. Пептиды обеспечивали доставку миРНК в цитоплазму, поскольку при вхождении в клетку дисульфидные мостики восстанавливались, высвобождая миРНК. Конъюгаты МРР–миРНК успешно включали экспрессию генов GFP и люциферазы в стабильно трансфицируемых клеточных линиях. Линия клеток яичников китайского хомячка (СНО-АА8-Luc Tet-Off), стабильно экспрессирующая ген люциферазы, использовалась для сравнения трансфицирующей активности комплекса МРР–миРНК и реагента для трансфекции липофектамина с миРНК. В последнем случае через два дня после трансфекции активность люциферазы в клетках падала на 36%, но на третий день она возвращалась к исходному уровню. Напротив, комплекс пенетратина с миРНК на второй день после трансфекции снижал уровень люциферазы на 53%, причем на третий день этот низкий уровень экспрессии гена сохранялся. Эти результаты указывают на более высокую эффективность трансфекции с помощью МРР по сравнению с липофектаминол для этой линии клеток.

13.5.3.2. *In vivo*

Первое успешное введение миРНК *in vivo* было проведено с помощью инъекции миРНК в физиологическом растворе в хвостовую вену мыши под высоким давлением. Этот метод быстрого экстрагирования под давлением позволяет ввести миРНК в органы с развитой сосудистой сетью, такие как печень, легкие, почки, селезенка и поджелудочная железа. В печени мыши уровень экспрессии гена-мишени снижался почти на 90%, однако этот эффект продолжался не более недели. Такой способ введения миРНК или кшРНК в организм грызунов применялся во многих исследованиях и приводил к эффективной доставке молекул и выключению экспрессии гена-мишени. Однако этот метод, вполне пригодный для трансфекции клеток грызунов, не имеет клинического применения для лечения людей.

Соренсен с соавторами первыми показали, что введение синтетических миРНК с помощью катионных липосом может специфическим образом ингибировать экспрессию экзогенных и эндогенных генов в организме взрослой мыши [38]. Катионные липосомы (на основе 1,2-диолеил-3-N,N,N-триметиламинопропана) образовывали комплекс с плазмидой, кодирующей зеленый флуоресцентный белок (GFP), а родственную ему миРНК вводили взрослым мышам внутривенно. Через три дня после инъекции экспрессия гена GFP была в значительной степени подавлена под действием миРНК в печени и селезенке мышей

по сравнению с контрольными мышами, которым вводили несовпадающую/неактивную миРНК. Кроме того, терапевтическую эффективность синтетических молекул миРНК изучали в условиях *in vivo* на модельных мышах, у которых был индуцирован сепсис. Мышам линии BALB/c предварительно интраперитонеально вводили миРНК против TNF- α , а затем — летальную дозу липополисахарида, способного вызвать септический шок. Было обнаружено выраженное защитное действие миРНК, что подтверждалось числом мышей, переживших септический шок, в отличие от контрольной группы мышей, получивших неактивную миРНК. Этот эффект объясняли снижением уровня TNF- α в результате специфического ингибирования экспрессии гена TNF- α под действием миРНК.

Поскольку высокая концентрация миРНК может вызвать неспецифический иммунный ответ, для ее транспорта нужны такие векторы, которые в условиях *in vivo* способны доставлять миРНК непосредственно к заданному участку. Так, для доставки миРНК в головной мозг мыши был использован липидный вектор. Смесь катионных липидов JetSITM использовали для связывания плазмидной ДНК, кодирующей люциферазу, и миРНК против люциферазы в пиколярной концентрации [46]. Образующиеся полиплексы вводили в головной мозг животных методом стереотаксической интрацеребровентрикулярной инъекции. Было показано, что JetSITM в сочетании с другим фузогенным липидом — диолеилфосфатидилэтаноламином — эффективно ингибирует экспрессию гена-мишени *in vivo*, даже при введении миРНК в пиколярной концентрации. Выключение экспрессии гена было дозозависимым и специфичным.

Значительная часть исследований в условиях *in vivo* выполняется на грызунах, однако в одной недавней работе было показано, что вызванное интерференцией РНК выключение экспрессии гена может быть успешно произведено и на приматах, что подчеркивает возможность терапевтического использования миРНК также и в более высокоразвитых организмах, чем грызуны. Обезьянам циномогус методом болюсной внутривенной инъекции вводили липосомальный препарат, содержащий миРНК против гена аполипопротеина В (АроВ) [47]. Через 48 ч после инъекции уровень мРНК гена-мишени в печени был значительно понижен. Снижение уровня белка АроВ начиналось уже через 24 ч после инъекции миРНК и продолжалось 11 дней. Кроме того, не было обнаружено признаков активации системы комплемента, продукции провоспалительных цитокинов или токсического действия. Единственным зарегистрированным изменением в организме приматов после введения липосомального препарата миРНК было транзиторное повышение концентрации ферментов печени, которое проходило через шесть дней после инъекции.

Молекулы миРНК могут образовывать комплексы с поликатионными полимерами, образуя при этом полиплексы. Так, способные к самостоятельной сборке наночастицы, содержащие миРНК, были синтезированы на основе полиэтиленимина (ПЭИ), конъюгированного с ПЭГ, к дистальному концу которого присоединен пептидный лиганд Arg-Gly-Asp (RGD) [48]. Использование RGD в качестве лиганда позволяет связываться с интегринами, экспрессирующимися на растущих сосудах опухолевой ткани, и таким образом направленно

доставлять миРНК к опухоли. Для получения способных к самостоятельной сборке и тканеспецифичных наночастиц использовали полимер, имеющий три функциональные составляющие: (1) разветвленный ПЭИ как катионный комплексобразующий полимер; (2) ПЭГ в качестве защитного внешнего слоя; (3) пептид RGD как нацеливающий лиганд. Наночастицы этого полимера использовали для доставки миРНК, ингибирующей рецептор фактора роста сосудистого эндотелия (VEGFR-2), к сосудам опухоли для торможения опухолевого ангиогенеза. Наночастицы с миРНК вводили мышам с подкожными опухолями (вызванными инъекцией клеток N2A) один раз в три дня путем инъекций в хвостовую вену. Было отмечено накопление наночастиц в опухолевых тканях со специфическим ингибированием экспрессии VEGFR-2 и торможением опухолевого ангиогенеза и самого роста опухоли (рис. 13.4).

Для повышения эффективности доставки миРНК без применения других трансфецирующих агентов используют подход, заключающийся в химической модификации миРНК. Так, липофильные миРНК синтезируют путем ковалентного присоединения к 5'-концу РНК производных холестерина, литохолоевой кислоты или лауриновой кислоты [49]. Было показано, что эти конъюгаты повышают эффективность доставки миРНК к клеткам печени и снижают экспрессию конструктора, содержащего *LacZ*. В другом исследовании к 3'-концу миРНК с помощью пирролидинового фрагмента присоединяли молекулу холестерина. Это повысило устойчивость миРНК против расщепления нуклеазами, увеличило стабильность в кровотоке, а также усилило захват миРНК клетками печени.

Рекомбинантные вирусные векторы, например векторы на основе ААV, могут обеспечивать доставку и долгосрочное выключение генов как в делящихся, так и в неделящихся клетках млекопитающих. Lentивирусы, продуцирующие миРНК, могут осуществлять трансдукцию неделящихся клеток; такие вирусы используют для доставки миРНК в эмбриональные стволовые клетки для создания нокаутных* мышей. Для трансфекции эмбриональных стволовых клеток мышцы Кунат с коллегами использовали конструкции на основе вирусных векторов, экспрессирующие кшРНК для белка, активирующего GTP-азу [50]. Полученные мыши имели приблизительно те же дефекты, что и животные, которых получают традиционным методом гомологичной рекомбинации. Несмотря на преимущества вирусных векторов для доставки миРНК в нетрансфицируемые клетки, их использование в терапевтических целях ограничено из-за неспецифической стимуляции синтеза интерферона, связанной с высоким уровнем экспрессии кшРНК. Вирусные векторы, экспрессирующие миРНК, в значительной степени снижают экспрессию экзогенных и эндогенных генов в головном мозге и в печени *in vitro* и *in vivo* [51]. Для внутриклеточной экспрессии миРНК против GFP и β -глюкуронидазы были созданы рекомбинантные аденовирусные векторы. Клетки HeLa заражали вирусными векторами, экспрес-

* Нокаутные животные — животные с выключенной экспрессией определенного гена. — *Прим. перев.*

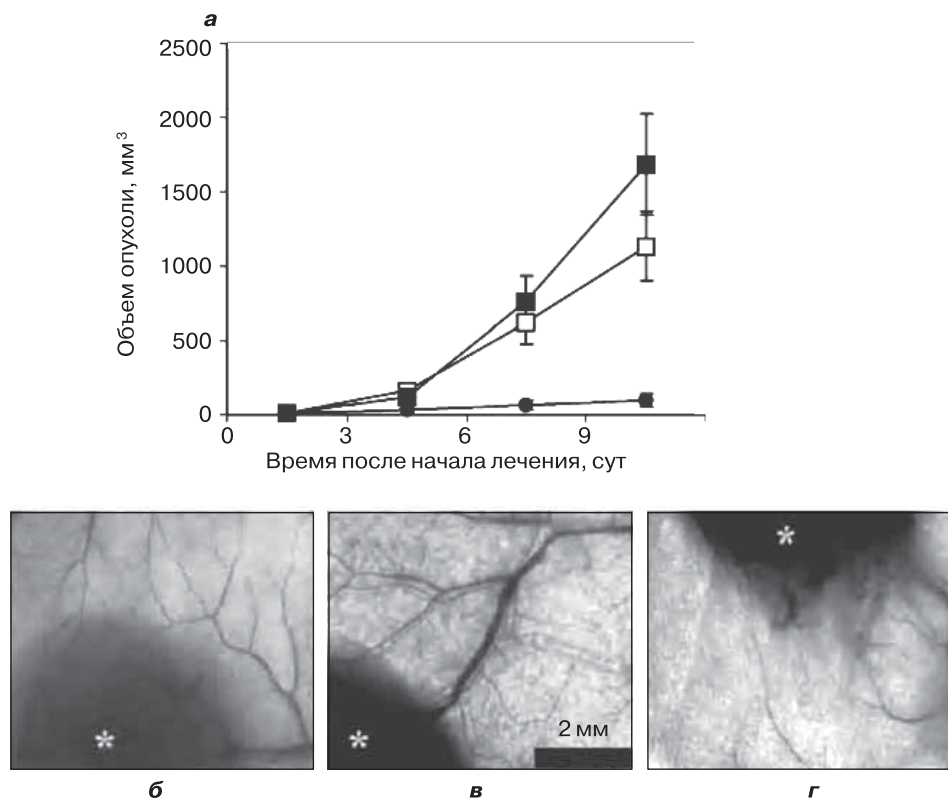


Рис. 13.4. Ингибирование роста опухоли с помощью наночастиц (RGD–ПЭГ–ПЭИ-наноплексов), содержащих миРНК против VEGFR-2. Мышам вводили опухолевые клетки N2A и оставляли их без лечения (белые квадратики) или один раз в три дня вводили им RGD–ПЭГ–ПЭИ-наноплексы с миРНК против LacZ (черные квадратики) или RGD–ПЭГ–ПЭИ-наноплексы с миРНК против VEGFR-2 (кружочки) в дозе 40 мкг на мышь. Лечение начинали в тот момент, когда опухоли становились пальпируемыми (около 20 мм³). Только специфичная к VEGFR-2 миРНК ингибировала рост опухоли, тогда как введение миРНК против LacZ не влияло на скорость опухолевого роста по сравнению с контрольной группой (без лечения) ($n = 5$). (б–г) Неоваскуляризация опухоли при лечении RGD–ПЭГ–ПЭИ-наноплексами. В конце эксперимента по ингибированию роста опухоли (а) репрезентативные опухоли вырезали и анализировали методом световой микроскопии с небольшим увеличением. Трансиллюминация опухоли и окружающей кожной ткани выявляет значительное разрастание сосудистой ткани у мышей, не подвергавшихся лечению (б), и у мышей, получавших в качестве лечения миРНК против LacZ (в). Напротив, при лечении миРНК против VEGFR-2 процесс неоваскуляризации и разветвления новых сосудов был заторможен (г). Звездочкой обозначена опухолевая ткань. Длина черной полосы составляет 2 мм. Воспроизводится из работы [48] с разрешения авторов

сирующими миРНК против β -глюкуронидазы, и лизировали через 72 ч. Происходило специфическое снижение экспрессии гена β -глюкуронидазы, приводящее к 60%-му сокращению активности фермента. Для исследований *in vivo* аденовирусные векторы, экспрессирующие миРНК против GFP, вводили в область полосатого тела головного мозга трансгенных мышей, экспрессирующих GFP. После локальной инъекции в головной мозг векторов AAV, производящих миРНК, на протяжении 5 дней наблюдалось эффективное выключение соответствующего гена.

13.5.4. Проблемы

13.5.4.1. Специфичность

Неспецифическое ингибирование экспрессии генов является важной проблемой при использовании двунитовых РНК (днРНК) для интерференции РНК. Известно, что днРНК активируют днРНК-зависимую протеинкиназу, и это приводит к общему торможению синтеза белка и неспецифическому распаду мРНК, присутствующей в клетке. Однако использование синтетических молекул миРНК позволяет решать проблему этой неспецифической активации. Тем не менее до сих пор появляются публикации, в которых отмечается способность молекул миРНК вызывать неспецифический ответ вне клеток-мишеней. Это может быть связано с некоторой гомологией между последовательностью миРНК и другими последовательностями мРНК [52, 53]. Большая часть неспецифических реакций может быть ликвидирована с помощью тщательного подбора последовательностей миРНК. Неспецифичное воздействие миРНК на экспрессию гена также зависит от концентрации миРНК, свойств последовательности, метода доставки и типа клеток [54]. Повышение концентрации миРНК усиливает неспецифические эффекты.

13.5.4.2. Резистентность

Клетки могут стать устойчивыми к действию миРНК в результате потери генов, необходимых для образования комплексов RISC, либо в результате селекции супрессоров, ингибирующих деградацию [35]. Кроме того, не все последовательности мРНК способны быть мишенями действия миРНК, поскольку некоторые последовательности-мишени скрыты РНК-связывающими белками или сложными вторичными структурами. Недавние исследования показали, что всего через 25 суток могут возникать устойчивые к миРНК штаммы вирусов (ВИЧ) [55]. Чтобы снизить вероятность развития подобной устойчивости, необходимо использовать несколько последовательностей для связывания с одной мишенью и несколько мишеней для одного вирусного генома. Однако заметим, что до настоящего времени не было сообщений о развитии резистентности клеток млекопитающих при введении миРНК.

13.5.4.3. Стабильность

Для успешного применения *in vivo* молекулы миРНК должны обладать достаточной стабильностью в системном кровотоке и необходимыми фармакокинетическими свойствами. Эти молекулы должны связываться с белками крови в такой степени, чтобы немедленно не выводиться, однако при этом связывание не должно вызывать токсического действия [56]. Исследования показывают, что пик распада миРНК достигается через 36–48 ч после их введения, а ослабление распада происходит через 96 ч. Биораспределение меченных радиоактивной меткой миРНК изучали после их внутривенного и внутрибрюшинного введения мышам [57]. В первую очередь миРНК накапливаются в печени и почках, но также в сердце, селезенке и легких. Такой характер распределения означает, что для успешного выключения экспрессии генов *in vivo* необходимо усовершенствовать фармакокинетические свойства миРНК.

Продолжаются исследования в области химических модификаций миРНК, которые могли бы повысить их стабильность и в то же время сохранить необходимую способность выключения генов для терапевтического применения. Химические модификации могут быть проведены во всем дуплексе миРНК или в нескольких отдельных основаниях. В принципе, такой подход помогает повысить устойчивость миРНК по отношению к нуклеазам, улучшает стабильность в сыворотке крови, а также изменяет профиль биораспределения. Следует отметить, что преимущественное распределение миРНК в тканях-мишенях позволяет значительно снизить нежелательное неспецифическое действие. Введение фосфоротиоатных связей повышает устойчивость к действию нуклеаз и улучшает стабильность в сыворотке [57]. Однако введение таких модификаций часто сопряжено с цитотоксичностью и токсичностью *in vivo*; кроме того, пока не изучено влияние этих модификаций на эффективность действия миРНК *in vivo*. Химические модификации остатков сахара в последовательности миРНК в значительной степени изменяют термостабильность и могут оказывать влияние на способность миРНК выключать экспрессию. Было показано, что функциональные и нефункциональные миРНК имеют разный термодинамический профиль. Например, при исследовании влияния нескольких модификаций по 2'-положению на экспрессию генов в культивируемых клетках было обнаружено, что способность выключать экспрессию генов сохранялась после частичной замены оснований 2'-фторзамещенными основаниями [58].

13.6. Заключение

Успехи молекулярной биологии и химии полимеров позволяют осуществлять контроль поведения клеток с помощью введения в них определенных молекул ДНК/РНК. Это продвинуло исследования в области идентификации новых генов, ответственных за возникновение и прогрессирование заболеваний. В настоящее время трансфекция клеток молекулами ДНК и РНК становится рутинным инструментом исследований, однако применение этого подхода для терапевтических целей пока ограничено из-за недостатка безопасных и эффективных методов трансфекции.

Благодарности

Работа выполнена благодаря финансовой поддержке Национального института здравоохранения США и полученной Джасприотом К. Вазиром стипендии Американской ассоциации кардиологов.

Литература

1. Li Z., et al. Murine leukemia induced by retroviral gene marking. *Science* 2002; 296: 497.
2. Vasir J.K., Labhasetwar V. Polymeric nanoparticles for gene delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2006; 3: 325–344.
3. Wiethoff C.M., Middaugh C.R. Barriers to nonviral gene delivery. *J. Pharm. Sci.* 2003; 92: 203–217.
4. Lechardeur D., Lukacs G.L. Intracellular barriers to non-viral gene transfer. *Curr. Gene Ther.* 2002; 2: 183–194.
5. Pouton C.W., Seymour L.W. Key issues in non-viral gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 46: 187–203.
6. Lee E.J., Jameson J.L. Gene therapy of pituitary diseases. *J. Endocrinol* 2005; 185: 353–362.
7. Ohno T., et al. Gene therapy for vascular smooth muscle cell proliferation after arterial injury. *Science* 1994; 265: 781–784.
8. Lee R.J., et al. VEGF gene delivery to myocardium: deleterious effects of unregulated expression. *Circulation* 2000; 102: 898–901.
9. Bettinger T., Carlisle R.C., Read M.L., Ogris M., Seymour L.W. Peptide-mediated RNA delivery: a novel approach for enhanced transfection of primary and postmitotic cells. *Nucleic Acids Res.* 2001; 29: 3882–3891.
10. Sweeney P., et al. Efficient therapeutic gene delivery after systemic administration of a novel polyethyleneimine/DNA vector in an orthotopic bladder cancer model. *Cancer Res.* 2003; 63: 4017–4020.
11. Vernejoul F., et al. Antitumor effect of *in vivo* somatostatin receptor subtype 2 gene transfer in primary and metastatic pancreatic cancer models. *Cancer Res.* 2002; 62: 6124–6131.
12. Prabha S., Labhasetwar V. Nanoparticle-mediated wild-type p53 gene delivery results in sustained antiproliferative activity in breast cancer cells. *Mol. Pharm.* 2004; 1: 211–219.
13. Cohen H., et al. Sustained delivery and expression of DNA encapsulated in polymeric nanoparticles. *Gene Ther.* 2000; 7: 1896–1905.
14. Bernkop-Schnurch A., Krajcicek M.E. Mucoadhesive polymers as platforms for peroral peptide delivery and absorption: synthesis and evaluation of different chitosan-EDTA conjugates. *J. Control Release* 1998; 50: 215–223.
15. Artursson P., Lindmark T., Davis S.S., Ilium L. Effect of chitosan on the permeability of monolayers of intestinal epithelial cells (Caco-2). *Pharm. Res.* 1994; 11: 1358–1361.
16. Roy K., Mao H.Q., Huang S.K., Leong K.W. Oral gene delivery with chitosan-DNA nanoparticles generates immunologic protection in a murine model of peanut allergy. *Nat. Med.* 1999; 5: 387–391.
17. Roman S., Lindeman R., O'Toole G., Poole M.D. Gene therapy in plastic and reconstructive surgery. *Curr. Gene Ther.* 2005; 5: 81–99.
18. Baltzer A.W., Lieberman J.R. Regional gene therapy to enhance bone repair. *Gene Ther.* 2004; 11: 344–350.

19. Madeddu P. Therapeutic angiogenesis and vasculogenesis for tissue regeneration. *Exp. Physiol.* 2005; 90: 315–326.
20. Kasahara H., et al. Biodegradable gelatin hydrogel potentiates the angiogenic effect of fibroblast growth factor 4 plasmid in rabbit hindlimb ischemia. *J. Am. Coll. Cardiol.* 2003; 41: 1056–1062.
21. Nagaya N., et al. Hybrid cell-gene therapy for pulmonary hypertension based on phagocytosing action of endothelial progenitor cells. *Circulation* 2003; 108: 889–895.
22. Michiels F., et al. Arrayed adenoviral expression libraries for functional screening. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20: 1154–1157.
23. Ziauddin J., Sabatini D.M. Microarrays of cells expressing defined cDNAs. *Nature* 2001; 411: 107–110.
24. Honma K., et al. Atelocollagen-based gene transfer in cells allows high-throughput screening of gene functions. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2001; 289: 1075–1081.
25. Fire A., et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 1998; 391: 806–811.
26. Elbashir S.M., et al. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* 2001; 411: 494–498.
27. Reynolds A., et al. Rational siRNA design for RNA interference. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 326–330.
28. Couzin J. Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science* 2002; 298: 2296–2297.
29. Paddison P.J., et al. A resource for large-scale RNA-interference-based screens in mammals. *Nature* 2004; 428: 427–431.
30. Berns K., et al. A large-scale RNAi screen in human cells identifies new components of the p53 pathway. *Nature* 2004; 428: 431–437.
31. Hemann M.T., et al. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes *in vivo*. *Nat. Genet.* 2003; 33: 396–400.
32. Dorsett Y., Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004; 3: 318–329.
33. Wall N.R., Shi Y. Small RNA: can RNA interference be exploited for therapy? *Lancet* 2003; 362: 1401–1403.
34. Gupta S., Schoer R.A., Egan J.E., Hannon G.J., Mittal V. Inducible, reversible and stable RNA interference in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 1927–1932.
35. Ryther R.C., Flynt A.S., Phillips J.A., 3rd, Patton J.G. siRNA therapeutics: big potential from small RNAs. *Gene Ther.* 2005; 12: 5–11.
36. Song E., et al. RNA interference targeting Fas protects mice from fulminant hepatitis. *Nat. Med.* 2003; 9: 347–351.
37. Song E, et al. Sustained small interfering RNA-mediated human immunodeficiency virus type 1 inhibition in primary macrophages. *J. Virol.* 2003; 77: 7174–7181.
38. Sorensen D.R., Leirdal M., Sioud M. Gene silencing by systemic delivery of synthetic siRNAs in adult mice. *J. Mol. Biol.* 2003; 327: 761–766.
39. Yoshinouchi M., et al. *In vitro* and *in vivo* growth suppression of human papillomavirus 16-positive cervical cancer cells by E6 siRNA. *Mol. Ther.* 2003; 8: 762–768.
40. Reich S.J., et al. Small interfering RNA (siRNA) targeting VEGF effectively inhibits ocular neovascularization in a mouse model. *Mol. Vis.* 2003; 9: 210–216.
41. Wohlbold L., et al. Inhibition of bcr-abl gene expression by small interfering RNA sensitizes for imatinib mesylate (STI571). *Blood* 2003; 102: 2236–2239.

42. Wilda M., Fuchs U., Wossmann W., Borkhardt A. Killing of leukemic cells with a BCR/ABL fusion gene by RNA interference (RNAi). *Oncogene* 2002; 21: 5716–5724.
43. Omi K., Tokunaga K., Hohjoh H. Long-lasting RNAi activity in mammalian neurons. *FEBS Lett.* 2004; 558: 89–95.
44. Leung R.K., Whittaker P.A. RNA interference: from gene silencing to gene-specific therapeutics. *Pharmacol. Ther.* 2005; 107: 222–239.
45. Muratovska A., Eccles M.R. Conjugate for efficient delivery of short interfering RNA (siRNA) into mammalian cells. *FEBS Lett.* 2004; 558: 63–68.
46. Hassani Z., et al. Lipid-mediated siRNA delivery down-regulates exogenous gene expression in the mouse brain at picomolar levels. *J. Gene Med.* 2005; 7: 198–207.
47. Zimmermann T.S., et al. RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature* 2006; 441: 111–114.
48. Schifflers R.M., et al. Cancer siRNA therapy by tumor selective delivery with ligand-targeted sterically stabilized nanoparticle. *Nucleic Acids Res.* 2004; 32: e149.
49. Lorenz C., Hadwiger P., John M., Vornlocher H.P., Unverzagt C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004; 14: 4975–4977.
50. Kunath T., et al. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 559–561.
51. Xia H., Mao Q., Paulson H.L., Davidson B.L. siRNA-mediated gene silencing in vitro and *in vivo*. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20: 1006–1010.
52. Bridge A.J., Pebernard S., Ducraux A., Nicoulaz A.L., Iggo R. Induction of an interferon response by RNAi vectors in mammalian cells. *Nat. Genet.* 2003; 34: 263–264.
53. Sledz C.A., Holko M., deVeer M.J., Silverman R.H., Williams B.R. Activation of the interferon system by short-interfering RNAs. *Nat. Cell. Biol.* 2003; 5: 834–839.
54. Persengiev S.P., Zhu X., Green M.R. Nonspecific, concentration-dependent stimulation and repression of mammalian gene expression by small interfering RNAs (siRNAs). *RNA* 2004; 10: 12–18.
55. Boden D., Pusch O., Lee F., Tucker L., Ramratnam B. Human immunodeficiency virus type 1 escape from RNA interference. *J. Virol.* 2003; 77: 11531–11535.
56. Paroo Z., Corey D.R. Challenges for RNAi *in vivo*. *Trends Biotechnol.* 2004; 22: 390–394.
57. Braasch D.A., et al. Biodistribution of phosphodiester and phosphorothioate siRNA. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2004; 14: 1139–1143.
58. Harborth J., et al. Sequence, chemical, and structural variation of small interfering RNAs and short hairpin RNAs and the effect on mammalian gene silencing. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev.* 2003; 13: 83–105.

МНОГОУРОВНЕВЫЕ МОДЕЛИ КОКУЛЬТУР В ВОССТАНОВЛЕНИИ ЗОН КОНТАКТА КОСТИ И МЯГКИХ ТКАНЕЙ

Хелен Г. Лу и И-Нин Е. Ван

14.1. Введение

Ткани и органы представляют собой сложные системы, поддержание и репарация которых регулируются за счет взаимодействий между клетками, клетками и матриксом, а также с помощью физических и химических сигналов. Данные сигналы обеспечивают гомеостаз органов и их физиологическую активность. Межклеточные контакты обычно основаны на одном или нескольких типах взаимодействий: непосредственном межклеточном контакте, сообщений посредством внеклеточного матрикса (ВКМ) или растворимых медиаторов. Непосредственное межклеточное взаимодействие предполагает прямой физический контакт, а контакты клеток с матриксом инициируются связыванием трансмембранных белков с ВКМ или поверхностью биоматериала. В роли химических медиаторов выступают секретируемые растворимые факторы и цитокины, определяющие локальное и системное межклеточное сообщение. Данные молекулы подразделяют на аутокринные, паракринные и эндокринные. Непосредственное межклеточное сообщение необходимо для инициации одного или всех типов перечисленных выше взаимодействий, а секреция растворимых факторов обеспечивает удаленные контакты и обеспечивает связь между прилежащими тканями и органами.

Возможность управления клеточным микроокружением путем воздействия на межклеточные контакты и контакты клеток с матриксом играет важную роль в регенерации систем тканей [1–3]. В настоящее время механизмы, лежащие в основе взаимодействий между различными типами клеток соединительных тканей, не до конца изучены. Поэтому возникает необходимость создания адекватных моделей *in vitro* и *in vivo*, на которых изучалась бы роль клеточных взаимодействий в регенерации систем тканей и гомеостазе органов. В этой главе обсуждается значение клеточных взаимодействий при создании сложных тканей в ортопедии, описан процесс регенерации зоны контакта между костью, связками и сухожилиями. За кратким обзором моделей кокультур последует рассмотрение возможности их применения для изучения механизмов регенерации зон контакта посредством контролируемых взаимодействий между клетками соединительных тканей: остеобластами, фибробластами и хондроцитами.

14.2. Межклеточные взаимодействия в зоне контакта мягких тканей и костей

Связки и сухожилия соединяются с костью через зону волокнистого хряща [4–10]. Его восстановление очень важно для приживления трансплантатов мягких тканей. Волокнистый хрящ состоит из нескольких переходящих друг в друга типов тканей, каждая из которых характеризуется определенным фенотипом клеток и составом матрикса. Вполне вероятно, что взаимодействия между различными клетками значимы для поддержания и репарации участков матрикса в зоне контакта. На модельной системе зоны соединения передней крестообразной связки, ПКС, с костью доказывается возможность применения кокультур *in vitro* для изучения роли гетеротипных межклеточных взаимодействий в регенерации.

Анатомически соединение ПКС с костью представляет собой три переходящих друг в друга тканевых участка: связку, волокнистый хрящ и кость. В зоне волокнистого хряща выделяют обызвествленные и минерализованные области. Связка содержит фибробласты, включенные в матрикс, богатый коллагеном. Матрикс обызвествленного волокнистого хряща построен из хондроцитов яйцевидной формы. В другом матриксе, обогащенном протеогликанами, найдены коллагены типа I и II. Гипертрофированные хондроциты располагаются в зоне обызвещенного волокнистого хряща, а околоклеточный матрикс содержит коллаген типа X [8, 11]. Последний участок — субхондральная кость, где остеобласты, остеоциты и остеокласты включены в структуру, состоящую из коллагенов типа I. Многоклеточная организация и контролируемая гетерогенность клеток играют важную роль в минимизации стрессовой нагрузки и разделении ее между костью и окружающими тканями [5, 12]. Сейчас не совсем понятна организация зоны контакта, а невозможность ее воссоздания после хирургического восстановления связок — главная причина отторжения трансплантата [13–16].

Хотя механизм регенерации зоны контакта неизвестен, *in vivo* было замечено, что срастание связки и кости при восстановлении ПКС приводит к образованию в костном туннеле слоя фиброваскулярной ткани [17–20]. В процессе срастания этот слой превращается в ткань, напоминающую волокнистый хрящ. Образование слоя волокнистого хряща происходит только там, где пересаженное сухожилие непосредственно контактирует с костной тканью. Это говорит о том, что для регенерации волокнистого хряща большое значение имеют взаимодействия между клетками сухожилия, например фибробластами, и клетками кости, остеобластами [2]. Контакт остеобластов с фибробластами может приводить к трансдифференциации остеобластов и/или фибробластов, а также к миграции предшественников мезенхимальных стволовых клеток к зоне контакта мягких тканей и кости. Предшественники стволовых клеток, по-видимому, ответственны за образование волокнистого хряща, и их окончательная дифференциация может регулироваться путем взаимодействия между остеобластами и фибробластами.

Для проверки этих гипотез были предложены модели кокультур *in vitro*, позволяющие оценить роль клеточных контактов в формировании специфических маркеров волокнистого хряща [21–23]. В норме преобладающими клетками в зоне соединения связок и кости являются фибробласты, фиброхондроциты и остеобласты, причем каждый тип клеток окружен характерным внеклеточным матриксом. Таким образом, идеальная модель зоны контакта кости и мягких тканей должна объединять сложные пространственные и многоуровневые взаимодействия, относящиеся к макро-, микро- и наноуровням клеточной организации.

14.3. Модели кокультур

Сообщение между клетками бывает двунаправленным или многомерным, и изучать его возможно как на макро-, так и на микроуровне. В зависимости от деталей проверяемой гипотезы, модели кокультур используют для изучения индивидуального вклада и суммарного взаимодействия физического контакта и влияния растворимых факторов. Существующие модели классифицируют либо как системы, способствующие реализации межклеточных контактов, либо как системы, препятствующие им (рис. 14.1). Далее кратко обсудим преимущества и недостатки каждого типа моделей.

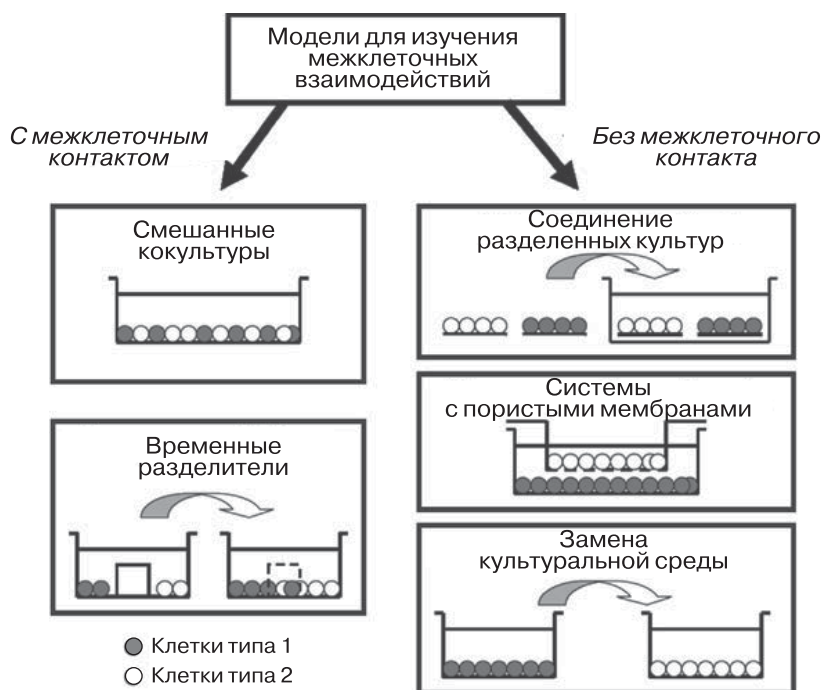


Рис. 14.1. Схема моделей, предназначенных для оценки взаимодействий между клетками разных типов

14.3.1. Системы кокультур, способствующие межклеточным контактам

14.3.1.1. Смешанные кокультуры

Простейшая система кокультивирования, обеспечивающая физический контакт между клетками, представляет собой смешанный монослой клеток интересующих видов. Такую культуру получают соединением суспензий различных клеток в определенном соотношении с последующим посевом полученной смеси в лунки (см. рис. 14.1). В другом варианте лунки второго типа высевают поверх уже сформировавшегося монослоя клеток первого типа. «Смешанная» модель успешно применялась для изучения взаимодействий между фибробластами и гепатоцитами [24–26], фибробластами и стромальными клетками [27], фибробластами и хондроцитами [28] и остеобластами и хондроцитами [21, 29–31]. Эта простая и удобная система позволяет усиливать локальные взаимодействия между клетками разных типов и служит для контроля уровня гомотипических и гетеротипических взаимодействий при изменении плотности посева клеток. Однако при интерпретации результатов необходимо учитывать зависимость клеточного ответа от разбавления, а также метаболические различия разных типов клеток.

14.3.1.2. Временные разделители

Межклеточный контакт можно контролировать с помощью физических барьеров, позволяющих проводить посев клеток по определенному плану (см. рис. 14.1). Затем барьер убирают, чтобы клетки могли мигрировать, и наблюдают физические контакты между ними. Модели такого типа использовали для изучения взаимодействий между фибробластами и гепатоцитами [26] и остеобластами и фибробластами (рис. 14.2, *a*, на цв. вклейке) [22]. Данная модель предоставляет возможность контроля за гетеротипическими и гомотипическими взаимодействиями, обеспечивая при этом физический контакт между клетками и влияние растворимых факторов. Однако техническое воплощение схемы достаточно сложно, поскольку отдельные компартменты необходимо разделить непроницаемой перегородкой. Кроме того, клеточный ответ и транспорт растворимых факторов зависят от физических и химических свойств материала разделителя.

14.3.2. Системы кокультур без межклеточных контактов

14.3.2.1. Соединение разделенных культур

Для предотвращения межклеточных контактов можно использовать метод соединения разделенных культур. В этом случае сначала готовят культуры клеток каждого типа, а затем совместно культивируют их в тех же условиях. Например, получают монослой каждого типа клеток на покровном стекле, а затем

культивируют их вместе с целью изучения гетеротипических межклеточных взаимодействий. По сравнению со смешанными кокультурами, главным преимуществом системы культивирования на покровных стеклах является анализ ответа клеточной субпопуляции. Данный метод применяли для анализа взаимодействий между хондроцитами и синовиальными клетками [32] и между фибробластами и остеобластами [22]. Недостаток модели состоит в невозможности полного предотвращения физического клеточного контакта в течение долгого времени, так как клетки мигрируют с покровных стекол, образуя гетерогенные культуры на стеклах или в лунках.

14.3.2.2. Системы с пористыми мембранами

Появление мембран для клеточного культивирования помогло решить ряд экспериментальных проблем, связанных с совместным выращиванием разного рода клеток, и позволило создать надежные и воспроизводимые системы кокультур. Мембраны «Transwell» имеют настолько малые поры, что препятствуют миграции клеток, но проницаемы для различных факторов и других биологических молекул. «Transwell» обеспечивает дополнительную поверхность роста, эффективно препятствуя контакту клеток разных типов. Мембраны широко использовались при изучении механизма эндохондрального окостенения путем анализа взаимодействий между хондроцитами и мезенхимальными стволовыми клетками [33, 34], хондроцитами и остеобластами [35, 36], остеобластами и фибробластами [37] и между другими типами клеток [38–40]. Достоинство данной модели состоит в воспроизводимости условий и легкости экспериментального воплощения, хотя влияние растворимых факторов здесь однонаправленно. Поскольку избыточный рост клеток приводит к засорению пор мембраны, в этом случае межклеточные взаимодействия ограничиваются лишь нижним монослоем, что недостаточно для проявления значительного ответа в кокультуре.

14.3.2.3. Замена культуральной среды

Еще один метод изучения роли растворимых факторов состоит в замене культуральной среды. При этом культуральную жидкость от одной клеточной культуры приливают к культуре клеток второго типа. Этот способ в сочетании с физическим контактом использовали для изучения механизма взаимодействия между фибробластами и стволовыми клетками [27, 41], фибробластами и хондроцитами [28] и остеобластами и фибробластами [42]. Преимуществами метода являются простота, быстрая регистрация влияния растворимых факторов и потенциальная возможность их последующей идентификации путем количественного анализа. К недостаткам относится ограниченность питательных веществ, поскольку вторая группа клеток получает уже истощенную среду лишь с незначительными добавками свежей. Еще одна проблема — воспроизводимость временных параметров и оптимальной концентрации растворимых факторов.

14.4. Использование моделей кокультур для восстановления скелетной соединительной ткани

Как отмечалось в разд. 14.2, в идеальной модели кокультур для изучения роли межклеточного взаимодействия для восстановления скелетной соединительной ткани должны учитываться сложные взаимодействия в зоне контакта мягких тканей и кости. В целях оптимизации существующие модели кокультур комбинируют между собой и совершенствуют для создания возможности анализа межклеточных взаимодействий в зоне контакта. Ниже будет рассмотрено применение таких моделей для изучения влияния физического межклеточного контакта и контакта посредством растворимых факторов.

14.4.1. Кокультуры остеобластов и фибробластов

Для определения особенностей взаимодействия фибробластов с остеобластами в формировании волокнистого хряща Вонг с сотрудниками предложили использовать новую модель кокультур, где одновременно происходят физический контакт клеток и паракринные взаимодействия [22]. Эта модель имитирует условия *in vivo*, когда связка непосредственно контактирует с костной тканью в ходе приживления трансплантата после хирургического восстановления ПКС. Сначала остеокласты и фибробласты высевали в противоположных частях лунки для культивирования тканей (см. рис. 14.2, *a* на цв. вклейке). В центре лунки помещали разделяющий гидрогель. Как только клетки с каждой стороны начинали сливаться, разделительный гель удаляли, так что остеобласты и фибробласты могли мигрировать и контактировать. Два типа клеток взаимодействовали между собой посредством паракринных и аутокринных факторов, а также путем физического контакта. Оказалось, что контакт остеобластов и фибробластов приводил к ослаблению пролиферации клеток, уменьшению опосредованной остеобластами минерализации и повышению минерализующего потенциала фибробластов [23].

К сожалению, в данной модели не учитывался вклад растворимых факторов и физического контакта клеток; кроме того, специфический ответ каждого типа клеток в отдельности остался невыяснен. Дальнейшее усовершенствование модели раздельного культивирования клеток на покровных стеклах показало, что наблюдаемые изменения фенотипа зависят от типа клеток [22]. Например, удвоение числа остеобластов в кокультуре заметно подавляло пролиферацию клеток, что свидетельствует о связи снижения митотической активности с влиянием остеобластов, а не фибробластов. Для изучения воздействия физического контакта клеток и растворимых факторов использовали модель с заменой культуральной среды. Шан и сотрудники добавляли три типа культуральных сред (osteoblastов, fibroblastов и кокультуры fibroblastов/osteoblastов) к индивидуальным культурам fibroblastов и osteoblastов и анализировали пролиферацию и дифференциацию каждого типа клеток [42]. Оказалось, что изме-

нения фенотипа кокультуры фибробластов и остеобластов вызваны как аутокринными, так и паракринными воздействиями. Однако интенсивность ответа культур, обработанных культуральной средой от других клеток, была значительно ниже таковой в кокультуре [42], что свидетельствует об определенной роли физического контакта в трансдифференциации клеток. Заметим, что культуральная среда, где одновременно присутствовали остеобласты и фибробласты, вызывала иной ответ, чем возникающий при действии сред остеобластов или фибробластов, выращенных по отдельности.

Полученные данные показывают, что взаимодействия остеобластов и фибробластов изменяют фенотипы клеток и могут приводить к трансдифференциации. До сих пор неизвестно, какой именно тип клеток, если таковой имеется, непосредственно отвечает за регенерацию зоны контакта, поскольку взаимодействия клеток все же оказывают определенное влияние: либо направляют трансдифференциацию остеобластов или фибробластов, либо вызывают привлечение и индукцию клеток-предшественников или стволовых клеток для образования волокнистого хряща.

14.4.2. Кокультуры остеобластов и хондроцитов

Поскольку в постнатальном периоде зона контакта связки и кости содержит клетки, напоминающие хондроциты [43], необходимо изучать поведение кокультуры остеобластов и хондроцитов. С этой целью Жианг с коллегами использовали модель смешанных кокультур, высевая монослой остеобластов на поверхности плотной микромассы хондроцитов [21]. Такая система обеспечивала прямой физический контакт двух типов клеток, сохраняя пространственную организацию культуры хондроцитов. Хотя хондроциты продолжали синтезировать коллаген типа II, отложение протеогликана в кокультуре значительно уменьшилось. Активность щелочной фосфатазы в остеобластах не изменилась, а их минерализующая способность заметно снизилась.

14.4.3. Модели тройных культур остеобластов, хондроцитов и фибробластов

Вонг с соавторами создали модель тройной культуры, содержащей фибробласты, хондроциты и остеобласты. Каждый тип клеток преобладает в зоне контакта связок, волокнистого хряща и кости соответственно (см. рис. 14.2, б) [44]. Для сохранения характерной сферической формы клеток хондроцитов их включали внутрь гидрогелевого разделителя, применявшегося в модели кокультуры остеобластов и фибробластов (см. рис. 14.2, а) [22]. Происходило аналогичное предыдущему опыту (см. ссылку [42]) ослабление пролиферации остеобластов и фибробластов, вызванное межклеточным взаимодействием. Количество хондроцитов в гидрогеле практически не изменялось. В данной модели наблюдалось ослабление минерализации, вызванной остеобластами, но происходило ее

усиление, опосредованное фибробластами. Хондроциты продолжали синтезировать протеогликаны, и в области контакта были обнаружены коллагены обоих типов — I и II.

Потом данную модель использовали для сравнения влияния взаимодействия фибробластов с остеобластами на реакцию стромальных клеток и фибробластов связок [45]. Стромальные клетки и фибробласты инкапсулировали в разделяющий гидрогель вместо хондроцитов. Изменения фенотипа фибробластов в тройной культуре были весьма незначительны, при этом в стромальных клетках сильно повышалась активность щелочной фосфатазы. Более того, присутствие в тройной культуре стромальных клеток вызывало экспрессию коллагена типа II и протеогликанов. Полученные результаты подтверждают, что контакт остеобластов с фибробластами может инициировать дифференциацию стволовых клеток или клеток-предшественников в процессе регенерации волокнистого хряща.

14.5. Изменения в кокультуре на макроскопическом и микроскопическом уровнях

Описанные выше модели кокультур позволяют оценить роль клеточных взаимодействий лишь на макроскопическом уровне, однако известно, что физиологически важные взаимодействия происходят на микроскопическом и наноровнях. Современные методы анализа поведения и распределения клеток позволяют изучать гораздо более сложные межклеточные контакты. Для исследования поведения разных типов клеток в кокультуре на микроуровне применяется ряд микромоделей и микрожидкостных моделей [1, 23, 46–51]. Например, используют фотолитографию, микроконтактную печать, микроформование, струйную печать и метод погружного пера [46–50, 52]. Преимуществом данных микросистем является возможность контроля расстояний при диффузии клеток. Создаются и биомиметические модели, воспроизводящие реальные межклеточные взаимодействия. По сравнению с макросистемами, малые объемы растворов и низкие концентрации эффекторов, применяемые в исследованиях на микроскопическом уровне, позволяют повысить чувствительность систем и, возможно, обнаружить локальные влияния непосредственных и опосредованных межклеточных контактов.

Несмотря на то что использование такого рода микросистем открывает целый ряд возможностей, их применение ограничено проведением химической или биохимической модификации поверхности. К сожалению, длительное наблюдение за межклеточными взаимодействиями невозможно, поскольку происходит миграция клеток и изменение их поведения. Эти препятствия преодолевают с помощью микрожидкостной технологии. Главное преимущество микрожидкостных моделей — возможность пространственного контроля движения жидкости и концентрации растворимых факторов, а также долговременный анализ поведения клеток в кокультуре.

Микромоделли кокультур более приближены к реальности при воспроизведении зон контакта нескольких тканей, поскольку в норме зона контакта связки и кости у человека имеет протяженность не более 200–300 мкм [8]. Тсай с соавторами исследовали влияние микрораспределения остеобластов и фибробластов на функционирование и организацию клеток [23]. Их микромодель кокультуры (см. рис. 14.2, в) была создана с помощью методов мягкой литографии и отливки реплик, а для наблюдения использовалась микрожидкостная технология. Неудивительно, что результаты исследования роста и дифференциации клеток, полученные с помощью микросистем, отличаются от таковых в макросистемах [22].

14.6. Двумерные и трехмерные модели кокультур

При анализе поведения клеток в кокультуре следует учитывать не только уровень (макро- или микро-) взаимодействий между клетками, но и влияние пространственного фактора. В большинстве исследований по изучению соединительных тканей используют двумерные модели, хотя очевидно, что в трехмерном пространстве клеточные реакции протекают совсем по-другому. Кукиерман с сотрудниками изучали адгезию человеческих фибробластов крайней плоти на различных двумерных и трехмерных матрицах [53] и обнаружили, что на трехмерной матрице адгезия и миграция клеток протекали значительно эффективнее. В похожей работе Спалацци с соавторами исследовали поведение кокультуры остеобластов и хондроцитов как функцию архитектуры матрицы [3]. Они показали, что поведение хондроцитов на внеклеточном матриксе, сформированном остеобластами на плоских дисках или в микросферах, различается. Например, время, распространения нетипичных хондроцитов в микросферах больше, чем на дисках. Экспрессия адгезионных комплексов и характеристики преформированного внеклеточного матрикса для двумерных и трехмерных субстратов также отличны [3, 53].

Спалацци с коллегами также рассматривали взаимодействия остеобластов и фибробластов в трехмерной кокультуре с помощью трехфазной матрицы, сконструированной для целей тканевой инженерии. Оказалось, что фазовое распределение клеток в кокультуре приводило к образованию и поддержанию различных, но связанных между собой участков: связок, зон контакта и костного матрикса [54]. В отличие от двумерных моделей пролиферация клеток в трехмерном пространстве не была ограничена, поэтому распространение внеклеточного матрикса было гораздо более обширным. Возможно, поведение кокультуры в трехмерном пространстве адекватнее отражает системный эффект клеточных взаимодействий, в то же время культивирование на двумерных матрицах выявляет локальные эффекты. Описанные наблюдения подчеркивают влияние многоуровневых и многомерных факторов на клеточные взаимодействия и подтверждают целесообразность использования модельных систем кокультур *in vitro* для изучения механизмов регенерации зон контакта.

14.7. Механизм клеточных взаимодействий в кокультуре

Известно, что физическое взаимодействие между клетками регулируется различными адгезионными молекулами и контактами. Среди них особо важная роль в регуляции межклеточной адгезии принадлежит кадгеринам — большому семейству кальций-зависимых трансмембранных адгезионных молекул. Кадгеринины — мощные модуляторы тканевого морфогенеза в ходе эмбрионального развития, поскольку они управляют дифференциацией клеток [55, 56], их миграцией [57, 58] и адгезией [59, 60]. Структурно кадгеринины подразделяют на подгруппы I и II, а их название определяется типом ткани, из которой они впервые были выделены. К кадгеринам типа I относится кадгерин E (эпителиальный), N (нервный), P (плацентарный) и R (относящийся к сетчатке; от англ. *retinal*). К типу II принадлежат кадгерин-5, -6, -8, -11 и -12 [61]. В эмбриогенезе сортировка клеток регулируется дифференцированной экспрессией кадгеринов, что обеспечивает формирование разных типов тканей. Например, преимущественная экспрессия E-кадгерина в эктодерме и N-кадгерина в развивающемся нейроэпителии позволяет им разделиться и начать формироваться по отдельности [55, 56]. Компартиментализация тканей и их разграничение также регулируются кадгеринами [62, 63]. В организме взрослого человека они поддерживают гомеостаз активно растущих тканей: эпидермиса [64–66] и костной ткани [67]. Кадгеринины также способствуют сохранению тканевой организации, стимулируя контактное ингибирование и предотвращая распространение опухолевых клеток [60, 68]. Внутриклеточный домен кадгерина связывается с цитоплазматическими белками, катенинами (α и β) и p120, которые затем взаимодействуют с цитоскелетом, облегчая миграцию клеток и изменение их формы [69].

Механизмы различных взаимодействий между остеобластами, фибробластами и хондроцитами до сих пор неизвестны. Межклеточные сообщения, обусловленные кадгеринами, возможно, играют важную роль после хирургического восстановления связок, когда фибробласты и остеобласты контактируют друг с другом в зоне соединения мягких тканей и кости. Формирование фенотипа остеобластов непосредственно регулируется N-кадгеринами [70–72], экспрессия которых повышается при остеогенной дифференциации [67, 70, 73]. Полагают, что кадгеринины также вовлечены в остеоиндукцию мезенхимальных стволовых клеток путем образования сигнального пути с участием β -катенина [74]. Кроме кадгеринов важная роль в организации контактов между соседними остеобластами, остеоцитами и периостальными фибробластами принадлежит коннексинам — белкам межклеточных щелевидных контактов. По некоторым данным, кадгеринины также участвуют в образовании щелевидных контактов [75, 76].

Межклеточная адгезия важна и для хондрогенеза [77–79], поскольку N-кадгерин экспрессируется в мезенхиме зачатков конечностей цыпленка, причем по мере его конденсации, экспрессия усиливается [77, 78]. Если активность N-кадгерина нейтрализовать связыванием с антителами, произойдет замедление конденсации и хондрогенеза [77]. Конденсация далее опосредуется одновремен-

ной экспрессией Са-независимых мембранных гликопротеинов, например молекул клеточной адгезии (САМ). В частности, N-САМ, возможно, участвует в хондрогенезе [79–81].

Кадгерин-11 (ОВ-кадгерин) — маркер слабо связанных и мигрирующих элементов мезенхимы. Он конститутивно экспрессируется в остеобластах, непосредственно влияя на сортировку, выравнивание и разделение клеток при дифференциации [82]. В сухожилиях сгибателей пальцев крысы были обнаружены щелевидные контакты, а именно коннексины 32 и 43, что указывает на сложный механизм межклеточных коммуникаций [83]. Кроме того, в присутствии фибробластов сухожилия *in vitro* происходила регуляция экспрессии N-кадгерина и винкулина [84]. Хотя экспрессия молекул адгезии в фибробластах связок не изучена, в синовиоцитах обнаружили экспрессию кадгерина-11, что, вероятно, имеет значение для организации синовиальной ткани [69]. Таким образом, при формировании многоклеточной зоны контакта между связкой или сухожилием и костью межклеточная адгезия при участии комплексов кадгеринов и белков щелевидных контактов, по-видимому, облегчает межклеточное сообщение, необходимое для контроля миграции клеток или организации тканей в зоне контакта.

Современные представления о функциях кадгеринов основаны на исследованиях онтогенетики, и неизвестно, можно ли экстраполировать их на область тканевой инженерии. Хотя модель повреждения тканей в физиологическом смысле вполне достоверно описывает контакт трансплантата мягкой ткани с костью, экспрессия и распределение кадгеринов и плотных контактов при сращивании связки и кости мало изучены.

14.8. Заключение

Многоуровневые и многомерные межклеточные взаимодействия играют важную роль в гомеостазе, репарации и регенерации органов. Биометрические модели кокультур — надежный инструмент для определения индивидуального вклада физического межклеточного контакта, растворимых факторов, геометрии матрицы и т. д. Модельные исследования кокультур позволили получить информацию о роли межклеточных взаимодействий в регенерации зон контактов мягких тканей и костей. Точный механизм клеточного взаимодействия, управляющий организацией и гомеостазом тканей в областях контакта, неизвестен. Продолжение исследований в этом направлении будет способствовать разработке живляемых фиксирующих устройств нового поколения, а также созданию новых методов тканевой инженерии для получения сложных тканей и систем органов.

Благодарности

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку Фонду Уоллеса Куллера и Национальному институту здравоохранения США.

Литература

1. Bhatia S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M. Effect of cell—cell interactions in preservation of cellular phenotype: cocultivation of hepatocytes and nonparenchymal cells. *FASEB J.* 1999; 13: 1883–1900.
2. Lu H.H., Jiang J. Interface tissue engineering and the formulation of multiple-tissue systems. *Adv. Biochem. Eng. Biotechnol.* 2006; 102: 91–111.
3. Mikos A.G., et al. Engineering complex tissues. *Tissue Eng.* 2006; 12: 3307–3339.
4. Cooper R.R., Misol S. Tendon and ligament insertion: a light and electron microscopic study. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1970; 52: 1–20.
5. Benjamin M., Evans E.J., Copp L. The histology of tendon attachments to bone in man. *J. Anat.* 1986; 149: 89–100.
6. Niyibizi C., Visconti C.S., Kavalkovich K., Woo S.L. Collagens in an adult bovine medial collateral ligament: immunofluorescence localization by confocal microscopy reveals that type XIV collagen predominates at the ligament-bone junction. *Matrix Biol.* 1995; 14: 743–751.
7. Wei X., Messner K. The postnatal development of the insertions of the medial collateral ligament in the rat knee. *Anat. Embryol. (Berl)* 1996; 193: 53–59.
8. Petersen W., Tillmann B. Structure and vascularization of the cruciate ligaments of the human knee joint. *Anat. Embryol. (Berl)* 1999; 200: 325–334.
9. Thomopoulos S., Williams G.R., Gimbel J.A., Favata M., Soslowky L.J. Variations of biomechanical, structural, and compositional properties along the tendon to bone insertion site. *J. Orthop. Res.* 2003; 21: 413–419.
10. Wang I.N., Mitroo S., Chen F.H., Lu H.H., Doty S.B. Age-dependent changes in matrix composition and organization at the ligament-to-bone insertion. *J. Orthop. Res.* 2006; 24: 1745–1755.
11. Niyibizi C., Sagarrigo V.C., Gibson G, Kavalkovich K. Identification and immunolocalization of type X collagen at the ligament—bone interface. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1996; 222: 584–589.
12. Woo S.L., Buckwalter J.A. AAOS/NIH/ORS workshop. Injury and repair of the musculoskeletal soft tissues. Savannah, Georgia, June 18—20, 1987. *J. Orthop. Res.* 1988; 6: 907–931.
13. Friedman M.J., et al. Autogeneic anterior cruciate ligament (ACL) anterior reconstruction of the knee: a review. *Clin. Orthop.* 1985; 9–14.
14. Kurosaka M., Yoshiya S., Andrish J.T. A biomechanical comparison of different surgical techniques of graft fixation in anterior cruciate ligament reconstruction. *Am. J. Sports Med.* 1987; 15: 225–229.
15. Robertson D.B., Daniel D.M., Biden E. Soft tissue fixation to bone. *Am. J. Sports Med.* 1986; 14: 398–403.
16. Yahia L. *Ligaments and Ligamentoplasties.* Springer Verlag; Berlin Heidelberg: 1997.
17. Blickenstaff K.R., Grana W.A., Egle D. Analysis of a semitendinosus autograft in a rabbit model. *Am. J. Sports Med.* 1997; 25: 554–559.
18. Yoshiya S., Nagano M., Kurosaka M., Muratsu H., Mizuno K. Graft healing in the bone tunnel in anterior cruciate ligament reconstruction. *Clin. Orthop.* 2000; 278–286.
19. Eriksson K., Kindblom L.G., Wredmark T. Semitendinosus tendon graft ingrowth in tibial tunnel following ACL reconstruction: a histological study of 2 patients with different types of early graft failure. *Acta Orthop. Scand.* 2000; 71: 275–279.

20. Rodeo S.A., Arnoczky S.P., Torzilli P.A., Hidaka C., Warren R.F. Tendon-healing in a bone tunnel: a biomechanical and histological study in the dog. *J. Bone Joint Surg. Am.* 1993; 75: 1795–1803.
21. Jiang J., Nicoll S.B., Lu H.H. Co-culture of osteoblasts and chondrocytes modulates cellular differentiation *in vitro*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 338: 762–770.
22. Wang I.E., et al. Role of osteoblast-fibroblast interactions in the regeneration of the ligament-to-bone interface. *J. Orthop. Res.* 2007; 25: 1621–1628.
23. Tsai J., Wang I.E., Kam L.C., Lu H.H. Novel micropatterned microfluidic system for osteoblast and fibroblast co-culture. *Trans. Soc. Biomate.* 2005, p. 30.
24. Guguen-Guillouzo C., et al. Maintenance and reversibility of active albumin secretion by adult rat hepatocytes co-cultured with another liver epithelial cell type. *Exp. Cell Res.* 1983; 143: 47–54.
25. Langenbach R., et al. Maintenance of adult rat hepatocytes on C3H/10T1/2 cells. *Cancer Res.* 1979; 39: 3509–3514.
26. Shimaoka S., Nakamura T., Ichihara A. Stimulation of growth of primary cultured adult rat hepatocytes without growth factors by coculture with nonparenchymal liver cells. *Exp. Cell Res.* 1987; 172: 228–242.
27. Ogiso B., Hughes F.J., Melcher A.H., McCulloch C.A. Fibroblasts inhibit mineralised bone nodule formation by rat bone marrow stromal cells *in vitro*. *J. Cell Physiol.* 1991; 146: 442–450.
28. Nevo Z., et al. Adhesion characteristics of chondrocytes cultured separately and in co-cultures with synovial fibroblasts. *Cell Biol. Int.* 1993; 17: 255–273.
29. Nakamata T., et al. *In vitro* demonstration of cell-to-cell interaction in growth plate cartilage using chondrocytes established from p53^{-/-} mice. *J. Bone Miner. Res.* 2003; 18: 97–107.
30. Shimoaka T., et al. Regulation of osteoblast, chondrocyte and osteoclast functions by fibroblast growth factor FGF-18 in comparison with FGF-2 and FGF-10. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 7493–7500.
31. Jiang J., Leong N.L., Mung J., Hidaka C., Lu H.H. Interaction between zonal populations of articular chondrocytes suppresses chondrocyte mineralization and this process is mediated by PTHrP. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2008; 16(1): 70–82.
32. D'andrea P., Calabrese A., Grandolfo M. Inter cellular calcium signalling between chondrocytes and synovial cells in co-culture. *Biochem. J.* 1998; 329(Pt 3): 681–687.
33. Gerstenfeld L.C., et al. Chondrocytes provide morphogenic signals that selectively induce osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *J. Bone Miner. Res.* 2002; 17: 221–230.
34. Gerstenfeld L.C., Barnes G.L., Shea C.M., Einhorn T.A. Osteogenic differentiation is selectively promoted by morphogenetic signals from chondrocytes and synergized by a nutrient rich growth environment. *Connect. Tissue Res.* 2003; 44 (1 Suppl): 85–91.
35. Lacombe-Gleize S., Gregoire M., Demignot S., Hecquet C., Adolphe M. Implication of TGF beta 1 in co-culture of chondrocytes-osteoblasts. *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.* 1995; 31: 649–652.
36. Sanchez C., et al. Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage* 2005; 13: 988–997.
37. Kinto N., et al. Fibroblasts expressing sonic hedgehog induce osteoblast differentiation and ectopic bone formation. *FEBS Lett.* 1997; 404: 319–323.
38. Spector J.A., et al. Co-culture of osteoblasts with immature dural cells causes an increased rate and degree of osteoblast differentiation. *Plas. Reconstr. Surg.* 2002; 109: 631–642.

39. Fillinger M.F., O'Connor S.E., Wagner R.J., Cronenwett J.L. The effect of endothelial cell coculture on smooth muscle cell proliferation. *J. Vasc. Surg.* 1993; 17: 1058–1067.
40. Burch M.G., Pepe G.J., Dobrian A.D., Lattanzio F.A., Jr., Albrecht E.D. Development of a coculture system and use of confocal laser fluorescent microscopy to study human microvascular endothelial cell and mural cell interaction. *Microvasc. Res.* 2005; 70: 43–52.
41. Sakai H., et al. Fibroblasts from the inner granulation tissue of the pseudocapsule in hips at revision arthroplasty induce osteoclast differentiation, as do stromal cells. *Ann. Rheum. Dis.* 2002; 61: 103–109.
42. Shan J.M., Wang I.E., Lu H.H. Osteoblast-fibroblast interactions modulate cell phenotypes through paracrine and autocrine regulations. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 2007.
43. Sun W.S., Moffat K.L., Lu H.H. Characterization of fibrochondrocytes derived from the ligament-bone insertion. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 2007.
44. Wang I.E., Lu H.H. Triculture of bovine anterior cruciate ligament fibroblasts, osteoblasts and chondrocytes with application in interface tissue engineering. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 2005.
45. Wang I.E., Mitroo S., Poli R., Sun W.S., Lu H.H. Fibroblast and osteoblast interactions modulate the potential of bone marrow stromal cells to differentiation into fibrochondrocyte-like cells. *Trans. Orthop. Res. Soc.* 2007. (53rd meeting).
46. Bhatia S.N., Yarmush M.L., Toner M. Controlling cell interactions by micropatterning in co-cultures: hepatocytes and 3T3 fibroblasts. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997; 34: 189–199.
47. Bhatia S.N., Balis U.J., Yarmush M.L., Toner M. Microfabrication of hepatocyte-fibroblast co-cultures: role of homotypic cell interactions. *Biotechnol. Prog.* 1998; 14: 378–387.
48. Yamato M., Konno C., Utsumi M., Kikuchi A., Okano T. Thermally responsive polymer-grafted surfaces facilitate patterned cell seeding and co-culture. *Biomaterials* 2002; 23: 561–567.
49. Khademhosseini A., et al. Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures. *Biomaterials* 2004; 25: 3583–3592.
50. Whitesides G.M., Ostuni E., Takayama S., Jiang X., Ingber D.E. Soft lithography in biology and biochemistry. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2001; 3: 335–373.
51. Albrecht D.R., Tsang V.L., Sah R.L., Bhatia S.N. Photo- and Electropatterning of Hydrogel-Encapsulated Living Cell Arrays. *Lab. Chip.* 2005; 5(1): 111–118.
52. Chen C.S., Mrksich M., Huang S., Whitesides G.M., Ingber D.E. Geometric control of cell life and death. *Science* 1997; 276: 1425–1428.
53. Cukierman E., Pankov R., Stevens D.R., Yamada K.M. Taking cell-matrix adhesions to the third dimension. *Science* 2001; 294: 1708–12.
54. Spalazzi J.P., Doty S.B., Moffat K.L., Levine W.N., Lu H.H. Development of controlled matrix heterogeneity on a triphasic scaffold orthopedic interface tissue engineering. *Tissue Eng.* 2006; 12: 3497–3508.
55. Takeichi M. Morphogenetic roles of classic cadherins. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 1995; 7: 619–627.
56. Price S.R., De Marco Garcia N.V., Ranscht B., Jessell T.M. Regulation of motor neuron pool sorting by differential expression of type II cadherins. *Cell* 2002; 109: 205–216.
57. Keller R. Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* 2002; 298: 1950–1954.
58. Zhong Y., Briher W.M., Gumbiner B.M. Analysis of C-cadherin regulation during tissue morphogenesis with an activating antibody. *J. Cell. Biol.* 1999; 144: 351–359.

59. Hay E.D., Zuk A. Transformations between epithelium and mesenchyme: normal, pathological, and experimentally induced. *Am. J. Kidney Dis.* 1995; 26: 678–690.
60. Cano A., et al. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat. Cell. Biol.* 2000; 2: 76–83.
61. Leckband D., Prakasam A. Mechanism and dynamics of cadherin adhesion. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 2006; 8: 259–287.
62. Kim S.H., Jen W.C., De Robertis E.M., Kintner C. The protocadherin PAPC establishes segmental boundaries during somitogenesis in xenopus embryos. *Curr. Biol.* 2000; 10: 821–830.
63. Tepass U., Godt D., Winklbauer R. Cell sorting in animal development: signalling and adhesive mechanisms in the formation of tissue boundaries. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2002; 12: 572–582.
64. Hermiston M.L., Wong M.H., Gordon J.I. Forced expression of E-cadherin in the mouse intestinal epithelium slows cell migration and provides evidence for nonautonomous regulation of cell fate in a self-renewing system. *Genes Dev.* 1996; 10: 985–996.
65. Tinkle C.L., Lechler T., Pasolli H.A., Fuchs E. Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 552–557.
66. Kobiela A., Fuchs E. Alpha-catenin: at the junction of intercellular adhesion and actin dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2004; 5: 614–625.
67. Stains J.P., Civitelli R. Cell–cell interactions in regulating osteogenesis and osteoblast function. *Birth Defects Res. C Embryo Today* 2005; 75: 72–80.
68. Bex G., Nollet F., van Roy F. Dysregulation of the E-cadherin/catenin complex by irreversible mutations in human carcinomas. *Cell Adhes. Commun.* 1998; 6: 171–184.
69. Kiener H.P., Brenner M.B. Building the synovium: cadherin-11 mediates fibroblast-like synoviocyte cell-to-cell adhesion. *Arthritis Res. Ther.* 2005; 7: 49–54.
70. Ferrari S.L., et al. A role for N-cadherin in the development of the differentiated osteoblastic phenotype. *J. Bone Miner. Res.* 2000; 15: 198–208.
71. Marie P.J. Role of N-cadherin in bone formation. *J. Cell Physiol.* 2002; 190: 297–305.
72. Stains J.P., Civitelli R. Cell-to-cell interactions in bone. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005; 328: 721–727.
73. Lin W.L., Chien H.H., Cho M.I. N-cadherin expression during periodontal ligament cell differentiation *in vitro*. *J. Periodontol.* 1999; 70: 1039–1045.
74. Castro C.H., et al. Targeted expression of a dominant-negative N-cadherin *in vivo* delays peak bone mass and increases adipogenesis. *J. Cell. Sci.* 2004; 117: 2853–2864.
75. Siliciano J.D., Goodenough D.A. Localization of the tight junction protein, ZO-1, is modulated by extracellular calcium and cell–cell contact in Madin-Darby canine kidney epithelial cells. *J. Cell. Biol.* 1988; 107: 2389–2399.
76. Troxell M.L., et al. Inhibiting cadherin function by dominant mutant E-cadherin expression increases the extent of tight junction assembly. *J. Cell. Sci.* 2000; 113(Pt 6): 985–996.
77. Oberlender S.A., Tuan R.S. Spatiotemporal profile of N-cadherin expression in the developing limb mesenchyme. *Cell. Adhes. Commun.* 1994; 2: 521–537.
78. Oberlender S.A., Tuan R.S. Expression and functional involvement of N-cadherin in embryonic limb chondrogenesis. *Development* 1994; 120: 177–187.
79. DeLise A.M., Fischer L., Tuan R.S. Cellular interactions and signaling in cartilage development. *Osteoarthritis Cartilage* 2000; 8: 309–334.

80. Tavella S., Raffo P., Tacchetti C., Cancedda R., Castagnola P. N-CAM and N-cadherin expression during *in vitro* chondrogenesis. *Exp. Cell. Res.* 1994; 215: 354–362.
81. Chuong C.M., et al. Roles of adhesion molecules NCAM and tenascin in limb skeletogenesis: analysis with antibody perturbation, exogenous gene expression, talpid mutants and activin stimulation. *Prog. Clin. Biol. Res.* 1993; 383B: 465–474.
82. Kii I., Amizuka N., Shimomura J., Saga Y., Kudo A. Cell–cell interaction mediated by cadherin-11 directly regulates the differentiation of mesenchymal cells into the cells of the osteo-lineage and the chondro-lineage. *J. Bone Miner. Res.* 2004; 19: 1840–1849.
83. McNeilly C.M., Banes A.J., Benjamin M., Ralphs J.R. Tendon cells *in vivo* form a three dimensional network of cell processes linked by gap junctions. *J. Anat.* 1996; 189(Pt 3): 593–600.
84. Ralphs J.R., Waggett A.D., Benjamin M. Actin stress fibres and cell–cell adhesion molecules in tendons: organisation *in vivo* and response to mechanical loading of tendon cells *in vitro*. *Matrix Biol.* 2002; 21: 67–74.

Часть III

**КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ
НАНОСТРУКТУР**

НАНОСТРУКТУРЫ В ТКАНЕВОЙ ИНЖЕНЕРИИ И РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЕ

Сиам П. Нукаварару, Сангамеш Г. Кумбар, Лакшми С. Наир
и Като Т. Лоренсин

15.1. Введение

15.1.1. Тканевая инженерия и регенеративная медицина

Нарушение работы тканей и органов — одна из основных проблем здравоохранения во всем мире. В настоящее время для восстановления или замены поврежденных или недостающих тканей или органов применяют два подхода: аутотрансплантацию или аллотрансплантацию. Однако возможности аутотрансплантации лимитируются ограниченной доступностью тканей и болезненностью донорского участка, а проведение аллотрансплантации сопряжено с возможностью передачи заболеваний и возникновением иммунных реакций. Число пациентов, нуждающихся в пересадке органа, постоянно растет. В соответствии с недавно проведенными исследованиями, только в США 89 000 больных ожидают того или иного донорского органа и 17 человек умирают ежедневно, не дождавшись пересадки сердца, печени, почки, поджелудочной железы, легкого или костного мозга [1]. В решении этой проблемы могут помочь тканевая инженерия и регенеративная медицина, суть которых состоит в применении биологических, химических и инженерных принципов для восстановления или регенерации тканей с помощью биологических материалов, клеток и факторов — по отдельности или в сочетании [2].

В настоящее время разработано три основных пути регенерации тканей на основе принципов тканевой инженерии [3]. Первый — инъекция тканеспецифичных клеток в поврежденный участок. Этот неинвазивный метод применяется при незначительных повреждениях, но его нельзя использовать для регенерации сложных тканей, построенных из нескольких типов клеток. Второй путь направленной тканевой инженерии основан на использовании биоразлагаемых матриц из высокомолекулярных соединений: полимолочной кислоты (ПМК), полигликолевой кислоты (ПГК), сополимера молочной и гликолевой кислот (ПМГК), поликапролактама (ПКЛ), полифосфазенов и т. д., которые контролируют рост клеток. Выбор материала матрицы зависит от конкретной задачи. После того как клетки заселяют необходимый участок и полностью восстанавливают повреждение, матрица распадается.

Третья, наиболее важная, стратегия состоит в использовании биоразлагаемой матрицы в сочетании с факторами роста и тканеспецифичными клетками или стволовыми клетками, которые в конечном итоге дифференцируются в клетки требуемого типа. У данного подхода есть два варианта: применение закрытых систем или применение открытых систем. В системах закрытого типа заселенные клетками матрицы заключают в тонкую полупроницаемую мембрану. Она служит ограничителем и защищает клетки от иммунных реакций организма хозяина, в то же время матрица позволяет проникать питательным веществам и продуктам жизнедеятельности клеток. Этот подход имеет много общего с экстракорпоральной технологией, с помощью которой восстанавливают деятельность некоторых органов. Чаще применяют системы открытого типа, где клетки на матрице выращивают *in vitro* до проведения имплантации. В зависимости от ситуации, необходимые для регенерации ростовые факторы либо высвобождаются из матрицы, либо доставляются с помощью специальных клеток с использованием методов генной терапии [4]. Биоразлагаемые матрицы в сочетании с клетками и ростовыми факторами успешно применяются для регенерации кожи, костей, хрящей, кровеносных сосудов и сердечных клапанов. Эта технология была дополнительно усовершенствована заменой статических методов культивирования на динамические системы культивирования в биореакторах. Выращивание клеток в биореакторах позволяет доставлять к ним необходимое количество питательных веществ и механическим образом стимулирует рост клеток за счет аэрации и перемешивания [5]. Тканевая инженерия с успехом используется для регенерации некоторых простых тканей, например кожи и хрящей, однако для ее клинического внедрения необходимо оптимизировать выбор матрицы, концентрацию клеток, а также тип и количество ростовых факторов в зависимости от конкретной задачи и состояния пациента.

15.1.2. Матрицы для тканевой инженерии

Тканевая инженерия — набор методов для создания трехмерной структуры ткани или органа из соответствующего типа клеток. Культивируемые клетки утрачивают способность к формированию пространственной структуры и образуют плоские слои без анатомических особенностей. Воссоздание трехмерной структуры достигается путем посева клеток на искусственную матрицу или носитель, которые стимулируют образование пространственной структуры, что является важным элементом тканевой инженерии [6]. Матрица для тканевой инженерии должна быть биосовместима, биологически активна, биоразлагаема или способна к саморазрушению, также она должна обладать нужными механическими свойствами и пористостью. Помимо этого, продукты разложения матрицы не могут быть токсичны. Под биосовместимостью понимают способность к поддержанию определенной клеточной активности без какого-либо отрицательного влияния на клетки и на организм хозяина в целом [7, 8]. Биологическая активность — это совокупность химических свойств поверхности, способству-

ющих прикреплению, пролиферации и дифференцировке клеток [9, 10]. Контролируемое разложение матрицы очень важно, поскольку скорость ее распада должна соответствовать скорости образования новой ткани (предполагается, что матрица будет растворена, а не удалена хирургически). Большой внутренний объем пор и их определенный размер необходимы для проведения инфильтрации клеток, а также для эффективного транспорта питательных веществ и вывода продуктов жизнедеятельности клеток. Например, для регенерации костной ткани используют носители, общий объем пор которых составляет 30%, а средний их размер равен 150 мкм [2]. Кроме того, механические свойства матрицы должны соответствовать свойствам восстанавливаемой ткани. Носители для регенерации костной ткани должны иметь высокий модуль упругости, а матрица для сосудистой ткани — низкий.

Биоразлагаемые подложки для тканевой инженерии обычно производят из синтетических полимеров: ПГК, ПМК, ПМГК, ПКЛ, полифосфазенов, полиангидридов и из природных белков и углеводов: хитозана, альгината и гиалуроновой кислоты [11, 12]. Сейчас разработано несколько технологий получения пористых трехмерных матриц из синтетических и природных полимеров. Среди типичных технологий можно назвать отливку полимера с последующим выщелачиванием включенных в него частиц [13], вспенивание газами [14], лиофилизацию [15], трехмерную печать [16] и спекание микросфер [17]. Установлено, что большинство трехмерных пористых структур способствуют адгезии и пролиферации клеток, но не способны имитировать внеклеточный матрикс, окружающий клетки в тканях. Поэтому наилучшей альтернативой оказалось использование наноструктурированных матриц, которые не только имитируют внеклеточный матрикс, но и активно взаимодействуют с белками, что в конечном итоге ускоряет адгезию клеток и способствует регенерации. Для создания носителей с особенностями микро- и наноматериалов используют следующие методы: электроспиннинг [18], разделение фаз [19], самосборку молекул [20] и нанесение определенного рисунка на поверхность матрицы [21]. В этой главе будут рассмотрены свойства матриц из наноматериалов и различные способы их получения. Особое внимание уделяется исследованиям *in vitro* и *in vivo*, где эффективность восстановления тканей удается повысить за счет применения носителей из наноматериалов.

15.1.3. Наноструктура внеклеточного матрикса

Внеклеточный матрикс (ВКМ) — способная к самосборке сеть нановолокон, построенная из макромолекул, которая окружает и поддерживает клетки в тканях [22]. ВКМ входит в состав интерстициальной ткани и базальной мембраны (рис. 15.1, *a*). Внеклеточный матрикс состоит из структурных белков, коллагена и эластина и специализированных белков, фибриллина, фибронектина и ламинина, что позволяет структурно соединять клетки, образующие ткань. Кроме того, ВКМ служит поверхностью для адгезии и миграции клеток.

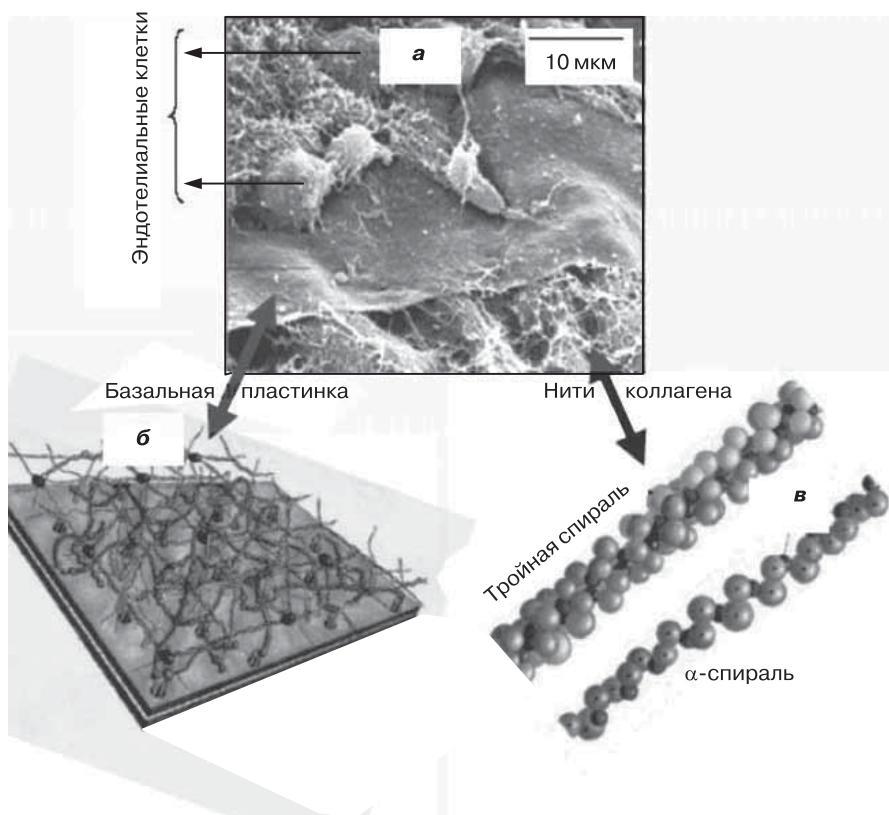


Рис. 15.1. Фотография роговицы куриного эмбриона, полученная методом сканирующей электронной микроскопии, на которой видны эпителиальные клетки, базальная пластинка и нити коллагена (а), молекулярное строение базальной пластинки (б) и коллагена (в). Воспроизводится из [22] с разрешения Роберта Трелстеда (а), John Wiley and Sons Inc. (б) и Garland Science Publishing (в)

Протеогликианы представляют собой гликоаминогликаны, хондроитинсульфат и гепарансульфат, связанные с коровыми белками. Они продуцируют химические сигналы и регулируют рост, дифференцировку и метаболическую активность клеток. Интерстициальная ткань входит в состав соединительных тканей: костной ткани, хряща и связок и контактирует с различными клетками и перечисленными выше белками. Базальная мембрана (БМ) поддерживает тонкий слой эндотелиальных, эпителиальных и некоторых мезенхимных клеток во многих органах (см. рис. 15.1, б). Функция БМ — обеспечение активного барьера для инфильтрации и миграции клеток; она также служит источником ряда ростовых факторов.

Внеклеточный матрикс и базальная мембрана состоят из нитей коллагена, эластина и фибронектина (см. рис. 15.1, в). Диаметр нитей — несколько нанометров, что намного меньше диаметра клеток — несколько микрометров.

Основным компонентом ВКМ является коллаген, образующий его фибриллярный остов, причем в организме человека коллаген присутствует как минимум в 28 формах. Обычно этот белок формирует фибриллярные структуры, состоящие из вытянутых молекул длиной 300 и толщиной 1,5 нм, находящихся в тройной спирали. Каждая спираль состоит из 1050 аминокислотных остатков, также свернутых в правозакрученную тройную спираль. Взаимодействие нескольких тройных спиралей коллагена между собой приводит к образованию нитей толщиной около 50 нм. Соседние молекулы белка в фибриллах смещены друг от друга на расстояние 67 нм, поэтому под электронным микроскопом нити коллагена выглядят поперечно-исчерченными. Другой важный компонент внеклеточного матрикса — фибронектин, который «склеивает» клетки и ВКМ в различных тканях. Фибронектины — это димеры двух похожих пептидов длиной 60–70 нм и толщиной 2–3 нм. Данные белки содержат нанодомены с последовательностью аргинин–глицин–аспарагиновая кислота–серин, обладающие высоким сродством к коллагену, фибрину и поверхностным клеточным рецепторам. Размер прочих белков, входящих в состав внеклеточного матрикса, также лежит в нанометровом диапазоне, и они влияют на поведение клеток на разных уровнях.

15.2. Матрицы на основе нановолокон

Клетки внутри тканей так или иначе включены в структуру нановолокон ВКМ. Например, на рис. 15.2, *а* показано изображение роговой оболочки глаза крысы, полученное методом сканирующей электронной микроскопии; из рисунка видно, что данная ткань состоит из фибробластов, окруженных нанофибриллами внеклеточного матрикса. Аналогичная клеточная организация наблюдается при культивировании клеток на матрице из нановолокон *in vitro* (см. рис. 15.2, *б*).

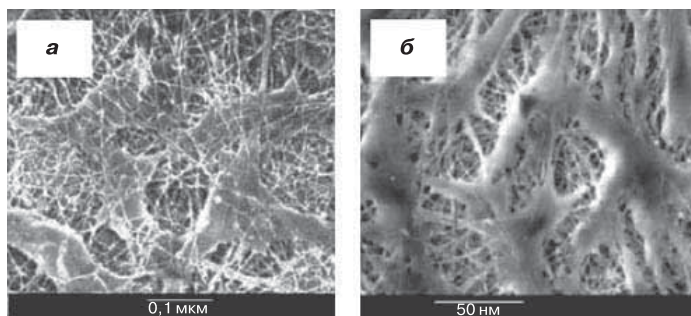


Рис. 15.2. Электронные изображения: *а* — роговицы глаза крысы, в которой фибробласты окружены фибриллами внеклеточного матрикса (воспроизводится в соответствии с [22] с разрешения Garland Science Publishing); *б* — фибробластов кожи человека, культивируемых *in vitro* на нановолокнах поликапролактама (воспроизводится в соответствии с Appl. Biochem. Biotechnol. 2005; 125: 147–158, с разрешения Humana Press Inc.)

Подобное расположение клеток на наноструктурированной матрице побудило исследователей к разработке усложненных методов получения нановолокон, которые бы точнее имитировали внеклеточный матрикс и служили матрицей для регенерации тканей. Ниже обсуждаются способы изготовления матриц на основе нановолокон, а именно электроспиннинг, разделение фаз и самосборка молекул.

15.2.1. Электроспиннинг

Электроспиннинг — простой, эффективный и недорогой метод получения сверхтонких нитей (см. также разд. 1.5 и 6.4). Схема стандартного устройства для электроспиннинга представлена на рис. 15.3, *а*. В этом процессе к капилляру, заполненному раствором или расплавом полимера, удерживаемого силами поверхностного натяжения, подается большой электрический потенциал в несколько киловольт. Такое электрическое напряжение вызывает отталкивание между молекулами полимера внутри капли, находящейся на острие наконечника шприца. Когда электростатические силы превосходят силы поверхностного



Рис. 15.3. Методология получения матриц на основе нановолокон в зоне контакта: *а* — типичная установка для проведения электроспиннинга и полученные матрицы с неупорядоченным и упорядоченным расположением нановолокон (воспроизводится в соответствии с [33] с разрешения Elsevier); *б* — стадии процесса разделения фаз, индуцированного изменением температуры, и полученные нановолокна и пены со сферическими порами (воспроизводится в соответствии с [19] с разрешения Elsevier); *в* — процесс самосборки молекул и полученные нановолокна и сформированная из них матрица (воспроизводится в соответствии с [49] с разрешения AAAS)

натяжения в растворе или расплаве полимера, из наконечника шприца выбрасываются тонкие струйки полимера, в конечном итоге достигающие заземленного коллектора. В ходе процесса растворитель испаряется, а струйки полимера превращаются в длинные и чрезвычайно тонкие волокна, диаметром от десятков нанометров до нескольких микрометров. Сравнительно недавно электроспиннинг привлек внимание исследователей, занимающихся проблемами тканевой инженерии. Из синтетических и природных полимеров было создано множество носителей со случайным или упорядоченным расположением нитей, в их число входят структуры типа «стержень–оболочка», пористые структуры и т. д. Такие системы используются в тканевой инженерии и при доставке лекарственных препаратов (см. рис. 15.3, а) [23–27].

Полученные методом электроспиннинга нетканые волокна имеют диаметр, соответствующий размеру элементов внеклеточного матрикса, а большая площадь поверхности созданных матриц обеспечивает возможность прикрепления множества клеток. Кроме того, до 90% объема подобных носителей составляют поры, размеры которых позволяют клеткам свободно мигрировать [27]. Матрицы на основе нановолокон обеспечивают возможность эффективного транспорта питательных веществ и продуктов жизнедеятельности клеток между носителем и окружающими тканями.

Возможность применения электроспиннинга для создания матриц для тканевой инженерии была продемонстрирована и запатентована Лоренсином и К^о [28]. Они впервые получили сверхтонкие нити ПМГК методом электроформования. Данные нити имели морфологическое сходство с внеклеточным матриксом природных тканей, их диаметр составлял 500–800 нм, а пористость превышала 90% [27]. Исследования *in vitro* показали активную адгезию и хорошее распределение мышечных фибробластов на нановолокнах ПМГК. На основании полученных результатов был сделан вывод, что диаметр пор 25–100 мкм подходит для миграции мезенхимных стволовых клеток человека и разрастания ткани. Для улучшения заживления поврежденных тканей в нановолокна включали различные лекарственные препараты, были созданы матрицы для тканевой инженерии на основе нановолокон из полифосфазенов [29]. Новые носители обеспечивали прикрепление и пролиферацию эндотелиальных клеток коронарной артерии и напоминающих остеобласты клеток MC3T3-E1 [30]. В настоящее время ведутся работы по созданию различных структур на основе полифосфазенов и полифосфазенов в сочетании с ПМГК, предназначенных для регенерации костной ткани и производства раневых повязок.

Многие исследовательские группы успешно применяли электроспиннинг для получения матриц из нетканых волокон на основе биоразлагаемых полиэфиров: ПМК, ПГК и ПМГК [31, 32]. Электроспиннинг ПМК позволяет получать нановолокнистые материалы с ориентированной и случайной организацией нитей диаметром 300–700 нм. Рамакришна с соавторами изучали биосовместимость нановолокон ПМК, используя нервные стволовые клетки [33]. Клетки прикреплялись и пролиферировали на матрице как со случайной, так и с ориентированной укладкой нитей. Кроме того, проводили электрофор-

мование волокон из ПКЛ и смеси ПКЛ с полиортоэфирами. Показано, что хондроциты зародыша быка, высеянные на матрицу из нановолокон ПКЛ со средним диаметром волокна 700 нм, сохраняли фенотип на протяжении трех недель культивирования [34]. Женг с соавторами установили, что эндотелиальные клетки пупочной вены человека лучше прикрепляются и пролиферируют на волокнах из сополимера *L*-молочной кислоты и ϵ -капролактама (соотношение 50 : 50) диаметром 300 нм, чем на волокнах диаметром 7 мкм из того же сополимера [35]. Метод электроспиннинга также применялся для формирования полимерных волокон из различных природных полимеров, которые обладают биосовместимостью и биофункциональностью. Для создания усовершенствованных матриц использовали нановолокна из природных полимеров: коллагена, фибриногена, альгината, гиалуроновой кислоты, хитозана и крахмала, в чистом виде и в сочетании с синтетическими полимерами [36, 37]. Матрицы на основе нановолокон, образованных из молекул, входящих в состав внеклеточного матрикса, не только по структурным параметрам, но и по химическим и биологическим характеристикам напоминали природный матрикс. В частности, провели электроформование волокон из коллагенов типа I и III с использованием в качестве растворителя 1,1,1,3,3,3-гексафтор-2-пропанола (гексафторпропанола); волокна коллагена I имели диаметр 100 нм, а коллагена III — около 250 нм [38]. Созданные на основе этих волокон матрицы поддерживали рост клеток гладких мышц, а также позволяли им проникать внутрь коллагеновой сети. Для улучшения механических свойств носителя из коллагеновых нановолокон применяли покрытие из ПКЛ. Оно повышало механическую прочность матрицы, но при этом на ее поверхности сохранялись участки свободного коллагена, необходимые для прикрепления и пролиферации фибробластов кожи человека [39]. Впрочем, при проведении электроспиннинга было показано, что при данном процессе нарушается биологическая структура некоторых природных полимеров. Возможно, это связано с применением органических растворителей, которые могут вызвать денатурацию белков. Поэтому возможности электроформования природных полимеров ограничены, и данное направление развивается не так активно, как электроспиннинг синтетических полимеров.

15.2.2. Разделение фаз

Разделение фаз полимеров давно и активно используется при производстве мембран немедицинского назначения [40]. Сравнительно недавно технологию термически индуцированного разделения фаз начали применять при изготовлении пористых наноструктурированных трехмерных матриц для тканевой инженерии [41]. В этом методе полимер сначала растворяют в подходящем растворителе при высокой температуре. При снижении температуры происходит разделение фаз жидкость–жидкость или жидкость–твердое вещество, причем в одной фазе концентрация полимера высокая, а в другой — низкая. Удаление растворителя выпариванием или лиофилизацией приводит к образованию пор

в зонах с низким содержанием полимера, в то же время в зонах высокого содержания полимера формируется трехмерная сетчатая структура (см. рис. 15.3, б). Пористость и толщину нитей полимера в матрице можно контролировать путем изменения состава растворителя, концентрации полимера и температуры.

Применение метода разделения фаз в тканевой инженерии вызвало интерес исследователей по двум причинам. Во-первых, контролируемая пористость матрицы — удобное свойство для поддержания пролиферации клеток и образования трехмерной структуры ткани. Во-вторых, трехмерная структура нановолокон способна имитировать природную структуру коллагена. На рис. 15.3, б изображена пористая матрица, построенная из алифатических полиэфиров, поли-*L*-молочной кислоты, поли-*D,L*-молочной кислоты и ПМГК, полученных методом разделения фаз [42–44]. Однако синтез нановолокон происходит лишь при высокой степени кристалличности полимера, например поли-*L*-молочной кислоты. В одной из работ было изучено влияние температуры застывания, концентрации полимера и типа растворителя на пористость матрицы и диаметр образующихся волокон ПМК. Процесс дополнительно усложняли модификацией полимера порогеном; таким образом, удавалось получать сеть макропор в матрице со стенками из пористых нановолокон [41].

15.2.3. Самосборка молекул

Самосборка молекул — спонтанный процесс организации молекул в стабильную структуру со строго определенным порядком, происходящий за счет слабых сил и нековалентных взаимодействий. К ним относятся водородные и ионные связи, гидрофобные и ван-дер-ваальсовы взаимодействия. В последнее время самосборка молекул стала использоваться в качестве одного из основных методов получения нановолокон для тканевой инженерии. Свойства и структура матриц на основе нановолокон напоминают соответствующие параметры природного внеклеточного матрикса.

В качестве «строительных блоков» для создания наноструктурированных носителей в тканевой инженерии часто применяют белки, пептиды и липиды. Сама природа использует механизм самосборки молекул для создания коллагена или кератина [45]. Впервые трехмерная пептидная матрица была получена за счет самосборки пептида $(\text{Ala-Glu-Ala-Glu-Ala-Lys-Ala-Lys})_2$, ЕАК16, в физиологической среде или в солевом растворе [46]. Пептиды с чередующимися гидрофильными и гидрофобными аминокислотными остатками, при определенных значениях рН и концентрации соли, образуют устойчивые матрицы из переплетенных нановолокон. Метод самосборки положил начало новому этапу исследований, поскольку раствор пептидов *in vivo* способен формировать матрицу со свойствами ВКМ, что позволяет восстанавливать поврежденные или отсутствующие ткани. На основе данного подхода компания «BD biosciences» создала пептидный гидрогель PuraMatrix с диаметром волокон 10 нм и размером пор 50–200 нм. В условиях *in vitro* было показано, что эта матрица способствует дифференцированию предшественников гепатоцитов [47], нейронов из срезов гиппокампа [48] и росту аксонов клеток PC12 [96].

Стапп с соавторами синтезировали наноцилиндры из амфифильных пептидов с неполярными углеводородными хвостами и гидрофильными пептидными головками (см. рис. 15.3, в) [49]. Образование наноцилиндров происходит при изменении pH от 8 до 4. Образующиеся волокна диаметром $7,6 \pm 1$ нм для прочности соединяли между собой перекрестными сшивками путем реакции окисления. Включение в пептидную последовательность фосфорилированного остатка серина обеспечивало кальцефильную природу матрицы, придающую ей способность к образованию минерального покрытия из гидроксиапатита, что открыло новые возможности в инженерии костной ткани [50]. Исследования на различных трехмерных пептидных матрицах *in vitro* выявили хорошую пролиферацию, функциональную дифференцировку и активную миграцию многих типов клеток [51]. В экспериментах с хондроцитами быка, включенными в пептидную матрицу, была обнаружена активная продукция собственного внеклеточного матрикса, состоящего из разных видов коллагена и гликозаминогликанов при сохранении фенотипа клеток [52]. Также выяснилось, что самосборка молекул позволяет представлять клеткам биологически активные эпитопы. Например, матрица из нановолокон, содержащая эпитоп ламинина, белка, способствующего росту аксонов, состава изолейцин–лизин–валин–аланин–валин избирательно вызывала быструю дифференцировку предшественников нервных клеток в нейроны [99].

Электроспиннинг, разделение фаз и самосборка молекул представляют собой активно используемые методы создания матриц на основе нановолокон. Электроспиннинг позволяет получать нановолокна на основе синтетических и природных полимеров, включая коллаген и фибриноген. Несмотря на то что разделение фаз пригодно лишь для работы с полимерами высокой степени кристалличности, сам процесс экономически выгоден и может использоваться для производства трехмерных матриц, аналогичных анатомическому строению соответствующей части тела. Преимущество самосборки молекул состоит в использовании природных молекул: белков, протеинов и липидов. Более того, данный метод позволяет синтезировать тканеспецифичные матрицы путем подбора нужных «строительных блоков» и создания необходимой формы *in vivo*. И хотя с помощью перечисленных выше технологий можно получать матрицы, приближенные к естественному внеклеточному матриксу, необходимы дальнейшие исследования, направленные на повышение механической прочности носителей для применения в тканевой инженерии.

15.3. Матрицы со структурированной поверхностью

Для решения задач тканевой инженерии структура матричной поверхности играет более важную роль, чем свойства внутреннего пространства, поскольку клетки заселяют поверхность и реагируют на индуцируемые сигналы до и после прикрепления к ней. Известно, что клетки отвечают на сигналы, определенным образом организованные во времени и пространстве, и могут распознавать элементы подложки, размер которых составляет всего 10 нм [53]. Нанесение

рисунка на поверхность матрицы позволяет воспроизвести *in vivo* оптимальную для роста и функционирования клеток нано- или микросреду. Данная поверхность должна контролировать дифференцировку и пролиферацию и многоклеточную организацию сложных тканей, что недостижимо на гладкой подложке. К микро- и нанотехнологическим процессам, используемым для получения матриц, относятся методы фотолитографии и мягкой литографии, например контактная печать, отливка реплик и импринтная литография. Эти методы позволяют размещать на поверхности носителя решетки, лунки, углубления, прорезы и островки [54]. Фотолитография традиционно используется при создании поверхностей определенного рельефа в промышленных и биомедицинских целях. Однако, несмотря на популярность этого метода, его применение для создания биологических поверхностей, в том числе для тканевой инженерии, ограничено структурой производственного процесса, требующего больших капитальных и технологических затрат. Методы мягкой литографии более приемлемы, поскольку они позволяют сразу создавать матрицы различной формы и с высокой точностью. Кроме того, в отличие от традиционной литографии, в данном случае нет необходимости в использовании растворителей, вредных для биологических систем. К мягкой литографии относят целую группу методов, позволяющих получать или воспроизводить различные структуры с помощью эластомерных печатей, отливок и плотно прилегающих фотошаблонов с применением полидиметилсилоксана или фторсиликона. Резиновые формы готовят по образцу, который обычно изготавливают фотолитографией или электронно-лучевой литографией. В последние годы методы мягкой литографии стали широко применяться для создания поверхностей с нано- или микроособенностями [55, 60, 64]. В настоящее время уже можно соединить преимущества литографии с технологиями создания трехмерных матриц с наноструктурой для применения в тканевой инженерии.

15.3.1. Микро- и наноконтактная печать

В последние годы микро- и наноконтактная печать — основные технологии для нанесения рисунка на поверхность материалов, применяемые в биологии вообще и в тканевой инженерии в частности. Среди методов мягкой литографии контактная печать стала первой использоваться для нанесения требуемого рисунка на самоорганизующиеся монослои (САМ) алкантиолов на поверхности золота [55]. Принцип метода состоит в следующем: печать из ПДМС покрывают алкантиолом и оставляют след на поверхности золота; в области контакта подложки с печатью остается отпечаток алкантиола. Поверхность промывают, и не затронутые участки золота покрывают другим алкантиолом, в результате чего вся поверхность оказывается покрытой рисунком с двумя типами концевых групп. Матрицы с подобной поверхностью, неспецифически не взаимодействующей с белками, применяют для связывания требуемых белков. Например, если поверхность с двумя типами участков, покрытых молекулами с концевыми остатками этиленгликоля и метильными группами соответственно, помес-

тить в раствор фибриногена, фибронектина или иммуноглобулина, белки адсорбируются на участках с концевыми метильными группами (рис. 15.4, *a* на цв. вклейке). Затем поверхности с нанесенным белковым рисунком используют для связывания клеток. В одном из исследований бычьей клетки эндотелия капилляров взаимодействовали с поверхностью САМ, покрытой фибронектином [56]. Поскольку большинству клеток млекопитающих для прикрепления нужны якорные молекулы, эндотелиальные клетки связываются лишь в участках САМ с концевыми метильными группами, несущими фибронектин (см. рис. 15.4, *b*).

Микро/наноконтактная печать — недорогой, простой и эффективный метод размещения рисунка на плоских и неплоских поверхностях для тканевой инженерии. Лиш с соавторами получили специфический рисунок молекул ингибитора для создания зон роста пигментных эпителиальных клеток радужной оболочки на капсуле хрусталика глаза человека с целью трансплантации клеток сетчатки [57]. Данный способ создания рисунка на аутологичной человеческой ткани может найти применение для замены пигментного эпителия сетчатки при возрастной дегенерации макулы. Недавно методом контактной печати формировали наноструктуры с помощью ПДМС с высоким модулем эластичности и высокомолекулярных красителей. Была продемонстрирована возможность проведения наноконтактной печати с разрешением менее 50 нм путем комбинирования тонких и твердых печатей ПДМС и слабо диффундирующих высокомолекулярных красителей [58]. Еще одна модификация наноконтактной печати состоит в использовании гибких печатей из ПДМС для нанесения рисунка на неровные поверхности. Эта технология может применяться для модификации матрицы в тканевой инженерии при клиническом использовании [59].

15.3.2. Литография на основе капиллярных сил

Группа ученых из Массачусетского технологического института предложила еще один простой способ нанесения рисунка белков или клеток, названный литографией на основе капиллярных сил [60]. Метод состоит в отливке ровных пленок полиэтиленгликоля (ПЭГ), гиалуроновой кислоты или хитозана (при температуре выше температуры стеклования) с использованием капиллярных свойств этих соединений, а также их способности к смачиванию печатей из ПДМС. Поверхностные тонкие пленки полисахаридов могут препятствовать адгезии органического материала, поэтому участки, покрытые гиалуроновой кислотой и хитозаном, отталкивают белки и клетки [61], в то же время участки матрицы свободные от гиалуроновой кислоты и хитозана адсорбируют их. В одном исследовании в качестве отталкивающего покрытия применяли диметилакрилат ПЭГ, а связывающую часть матрицы покрывали фибронектином, адсорбированным клетками NIH3T3. В другом эксперименте проводили послойное нанесение гиалуроновой кислоты (ГУК) и поли-L-лизина (ПЛ) для связывания с поверхностью клеток кокультуры (см. рис. 15.4, *в*) [62]. Адсорбцию ПЛ на участках ГУК за счет ионных сил использовали для того, чтобы области

поверхности, покрытые ГУК, не отталкивали, а притягивали клетки кокультуры. Фрагменты подложки, покрытые фибронектином и ПЛ, предназначались для селективной адсорбции клеток кокультуры, содержащей гепатоциты, эмбриональные стволовые клетки мыши (ES) и фибробласты NIH3T3 (см. рис. 15.4, *з*). Формирующиеся кокультуры не зависели от порядка закрепления клеток и порядка их посева и оставались стабильными в течение пяти суток. Впоследствии цитотоксичный ПЛ был заменен на коллаген, являющийся компонентом природного внеклеточного матрикса и способный образовывать ионные комплексы с ГУК [63].

Литография на основе капиллярных сил — недорогой и эффективный метод поверхностного микрораспределения клеток в кокультуре для изучения взаимодействий между клетками и клетками и матриксом с целью регенерации тканей сложной структуры.

15.3.3. Нанесение рисунка биомолекул

Нанесение рисунка биомолекул представляет собой упорядоченное распределение биологических молекул: белков и ДНК, а также клеток на какой-либо поверхности. Недавно для нанесения рисунка биомолекул на силиконовую или стеклянную подложку стали применять фотокаталитическую литографию, сканирующую зондовую литографию и лазерную абляцию. В фотокаталитической литографии свет определенной длины волны используется для химической активации материала на печати, контактирующей с тонкой окисляемой пленкой. В данном методе силиконовый или стеклянный носитель модифицируют покрытием тиолированного ПЭГ, которое препятствует адсорбции биологического материала [64]. Избирательное удаление фрагментов, подвергшихся воздействию света, оголяет матрицу, образуя сеть адсорбирующих и неадсорбирующих участков. Затем немодифицированную поверхность стекла или силикона заполняют адгезивным веществом — аминопропилсиланом (АПС), наносят меченный флуоресцеинизотиоцианатом (ФИТЦ) белок нейтравидин и изучают поверхность методом флуоресцентной микроскопии. На рис. 15.4, *д* показано, что белок связывается с адгезивными *L*-участками (светлые), но не с покрытыми полиэтиленгликолем отталкивающими фрагментами (темные). Рис. 15.4, *е* иллюстрирует прикрепление клеток HeLa к матрице и их пролиферацию. Клетки были трансфицированы тубулином и помечены зеленым флуоресцентным белком. Приведенные фотографии свидетельствуют, что HeLa способны функционировать на участках поверхности, покрытых АПС.

Нанесение рисунка с помощью сканирующей туннельной микроскопии или атомно-силовой микроскопии (АСМ) называют методом сканирующей зондовой литографии. Этот способ литографии весьма практичен, так как нанесение рисунка, получение изображения и его анализ последовательно проводят под микроскопом. Данный метод позволяет изучать иммобилизованный на поверхности материал *in situ*. Чой с соавторами продемонстрировали заданное распределение стрептавидаина на модифицированной полиэтиленгликолем силиконо-

вой поверхности методом АСМ. Они равномерно покрыли силиконовую матрицу низкомолекулярным белком, отталкивающим метокси-ПЭГ силан [65]. Силан полиэтиленгликоль превращался в SiO_2 реакцией анодного окисления с приложением напряжения 10–20 В между поверхностью (анод) и острием иглы (катод). При напряжении 14 В получались квадраты SiO_2 глубиной 2–3 нм; их реакционная способность была выше, чем у необработанных участков. Квадраты модифицировали введением функциональных групп с высоким сродством к белкам. Сначала поверхность оксида кремния изменяли при помощи способных к самосборке молекул, несущих аминокислотные группы. Взаимодействие белка с такими матрицами происходило по двум путям: в первом случае на модифицированной аминокислотными группами подложке SiO_2 иммобилизовали стрептавидин, конъюгированный с золотом; во втором — для активации аминокислотных групп применяли глутаровый альдегид, что позволяло затем присоединять белок за счет образования ковалентных связей между альдегидными группами и аминокислотными группами стрептавидина. Покрытые стрептавидином матрицы можно использовать для избирательного связывания биотинилированных материалов. Возможностью применения рисунков биомолекул с разрешением от 10 до 100 нм для создания микрочипов медицинского назначения на основе сверхплотных ДНК и белков занимаются научные группы во всем мире.

15.4. Значение наноструктурированных матриц для регенеративной медицины

В тканях и органах клетки постоянно окружает внеклеточный матрикс, представляющий самоорганизующуюся нановолоконную матрицу, состоящую из различных белков и полисахаридов. Объем внеклеточного матрикса разных органов значительно различается: его много в хрящевой и костной ткани и значительно меньше в головном и спинном мозге. Строение и функциональные особенности внеклеточного матрикса чрезвычайно разнообразны: существует минерализованный матрикс костной ткани и зубов, прозрачный матрикс роговицы, канатообразный матрикс сухожилий и базальная пластинка между эпителием и соединительной тканью. Внеклеточный матрикс есть повсюду, и везде он тесно связан с клетками, поэтому ВКМ контролирует работу клеток и определяет физические свойства тканей. Кроме того, большая площадь поверхности нановолокон внеклеточного матрикса позволяет экспонировать наружу протеогликаны, гликоаминогликаны и интегрины, способствующие взаимодействию матрикса с цитоскелетом.

Клеточные функции *in vivo* регулируются взаимодействием клеток с внеклеточным матриксом, а также растворимыми факторами. Воспроизведение естественных характеристик матрикса в синтетических матрицах для тканевой инженерии позволило бы усовершенствовать и ускорить процесс регенерации тканей.

Взаимодействие клеток с матрицей зависит от топографических факторов и химических сигналов. Топографические факторы управляют адгезией, проли-

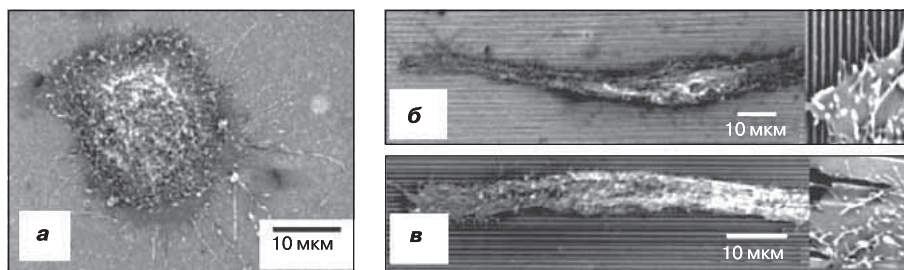


Рис. 15.5. СЭМ-изображения эпителиальных клеток роговицы человека, иммортализованных с помощью вектора SV40, на плоской поверхности (а) и на поверхности с шириной желобков 400 нм (б) и 4000 нм (в). На вставках справа показаны окончания клеточных выростов. Воспроизводится в соответствии с работой [67] с разрешения The Company of Biologists

ферацией, миграцией, дифференцировкой и экспрессией генов в зависимости от свойств поверхности подложки. Известно, что элементы поверхностного рельефа с размерами от 10 нм до 100 мкм влияют на организацию цитоскелета и, в конечном итоге, на поведение клеток [66]. Карури с соавторами наблюдали округление эндотелиальных клеток роговицы человека, иммортализованных с помощью вируса SV40, на ровной поверхности (рис. 15.5, а) и их удлинение на структурированной поверхности (см. рис. 15.5, б). На рисунке изображены удлиненные филоподии и ламеллоподии, образовавшиеся на поверхностях с гребнями и желобками [67]. В аналогичном исследовании поведения макрофагоподобных клеток на подложках с желобками шириной несколько нанометров обнаружено вытягивание клеток вдоль оси желобков, при этом элементы цитоскелета выстраиваются параллельно желобкам [68]. Актин и микротрубочки располагались вдоль стенок и краев желобков, а уплотнения актина — в неоднородностях рельефа [69]. Ламеллы и филоподии некоторых клеток изгибались по краям желобков. Несколько исследований было посвящено изучению влияния глубины желобков на ориентацию клеток почки хомячка (ВНК) и почек собаки (MDCK). Например, выравнивание клеток ВНК усиливалось с глубиной желобков, но ослабевало при увеличении их ширины, в то же время на поведение клеток MDCK ширина желобков влияния не оказывала [70]. Таким образом фибробласты, эндотелиальные клетки, клетки гладких мышц, макрофаги, лейкоциты, остеобласты и мезенхимные стволовые клетки хорошо прикрепляются, пролиферируют, мигрируют и дифференцируют на поверхностях с нанометровыми особенностями: гребнями, ступенями, лунками, наростами, стержнями, порами или сферами. При этом в клетках повышается экспрессия многих генов и усиливается синтез белков внеклеточного матрикса [71–74].

В настоящее время возникла потребность в создании наноструктурированных матриц для тканевой инженерии, которые могли бы имитировать внеклеточный матрикс, обеспечивая клеточное окружение, аналогичное *in vivo*.

15.5. Функции наноструктурированных матриц в тканевой инженерии

Во многих исследованиях *in vitro* и *in vivo* наноструктурированные матрицы применялись для восстановления костной, хрящевой, сосудистой, нервной ткани, тканей сердечных мышц и мочевого пузыря. Ниже представлено несколько последних исследований, где успешную регенерацию тканей проводили путем имитации топографии внеклеточного матрикса на наноструктурированных подложках.

15.5.1. Регенерация костной и хрящевой тканей

Многие годы создание и усовершенствование матриц для восстановления костной ткани были приоритетным направлением тканевой инженерии. При получении трехмерных матриц для регенерации костной ткани используют традиционные методы: спекание микросфер, выщелачивание, вспенивание газами и лиофилизацию [75]. Носители, полученные с помощью перечисленных технологий, имеют поры, но не обладают особенностями рельефа, существующими в природном внеклеточном матриксе. Для более точного воспроизведения ВКМ исследователи стали включать в матрицы элементы наноструктуры [76]. Была изучена способность наноструктурированных матриц к поддержанию роста культур остеобластов и мезенхимных стволовых клеток для использования их при регенерации костной и хрящевой тканей.

При создании подложек из ПМГК, Ли с соавторами применяли электроспиннинг [27]. Используя тот же метод, Вакантис с коллегами получили трехмерную биоразлагаемую матрицу из нановолокон ПКЛ [77]. Синтезированный путем электроспиннинга носитель состоял из волокон диаметром от 20 нм до 5 мкм, средний диаметр был 400 нм. Мезенхимные стволовые клетки (МСК), выделенные из костного мозга новорожденных крысят, выращивали в присутствии остеогенных компонентов. Установлено, что нановолокна матрицы обеспечивают условия, способствующие получению минерализованной ткани. Конструкции из клеток и полимерных нановолокон, образовавшиеся в динамической культуре *in vitro* за четыре недели, имплантировали в сальник крыс для формирования костной ткани *in vivo* [78]. Гистологический анализ данных образцов через четыре недели после имплантации выявил наличие остеоцитоподобных клеток и образование в образце минерализованной ткани, похожей на костную ткань, что подтверждает возможность использования этой матрицы при лечении дефектов кости. Недавно для инженерии костной ткани *in vivo* был предложен новый подход, заключающийся в сочетании методов генной терапии стволовыми клетками и применении наноструктурированных матриц [79]. Подложки из ПМГК, полученные методом электроспиннинга с культивируемыми на них трансфицированными МСК, экспрессирующими костный морфогенетический белок BMP2, имплантировали в бедренную мышцу иммунокомпетентных мышей. Спустя четыре недели после имплантации животных

умерщвляли и анализировали гетеротопическую оссификацию. На рис. 15.6, *а* (см. цв. вклейку) ясно виден рост костной ткани в участке имплантации. Гистологическим анализом было подтверждено образование костного мозга (см. рис. 15.6, *б*) и коллагена (см. рис. 15.6, *в*) внутри новой костной ткани. Данная ткань имела каналы (см. рис. 15.6, *г*), характерные для бедренной кости. Сходство механических свойств, общей микроструктуры, определенное методами наноотпечатка, нанотопографии, а также химического состава бедренной кости и воссозданной на матрице костной ткани — дополнительное подтверждение того, что наноструктурированные матрицы могут использоваться для ее регенерации.

Полагают, что методом самосборки молекул можно создавать трехмерные матрицы на основе нановолокон, диаметр которых совпадает с диаметром волокон коллагена в природном внеклеточном матриксе. Хоссейнхани с соавторами применили процесс самосборки амфифильных пептидов для создания матрицы, способствовавшей остеогенной дифференциации мезенхимных стволовых клеток [80]. Трехмерная сеть нановолокон полимера и клеток была получена перемешиванием клеточной суспензии в среде, содержащей разбавленный водный раствор пептидов. Оказалось, что на матрице, построенной из нановолокон амфифильных пептидов, значительно увеличивается пролиферация и остеогенная дифференциация МСК *in vitro* по сравнению с аналогичными показателями в статической культуре. Клеточный ответ усиливается при модификации нановолокон путем присоединения последовательности аргинин–глицин–аспарагиновая кислота. Значительное сходство с условиями *in vivo* приводило к повышению активности щелочной фосфатазы и возрастанию экспрессии остеокальцина. Механическая прочность системы повышалась при использовании гибридной матрицы, состоящей из гидрогеля, образованного самосборкой амфифильных пептидов, и коллагеновой сети, укрепленной введением полигликолевой кислоты [81]. Гибридные матрицы засевали клетками в биореакторе в перфузионном режиме культивирования и через три недели использовали в экспериментах *in vivo*. Активность щелочной фосфатазы и уровень содержания остеокальцина в подкожных тканях вокруг имплантата подтверждали способность новой гибридной матрицы поддерживать гетеротипический рост костной ткани.

Метод разделения фаз используют для создания пористых матриц, объем пор которых составляет 90% и выше, из волокон поли-*L*-молочной кислоты для восстановления костной ткани. Данные носители имеют связанные между собой сферические поры диаметром 250–420 мкм; стенки пор образованы волокнами диаметром 50–500 нм. Матрицы из нановолокон с адсорбированными на них фибронектином и витронектином усиливали адсорбцию остеобластов по сравнению с адсорбцией на подложках с твердыми пористыми стенками. В обоих случаях носители были изготовлены из одного и того же основного полимера — поли-*L*-молочной кислоты, поэтому различие в адсорбции белка и клеток объяснялось наноструктурой матриц. В той же исследовательской группе получили композиты из наногидроксиапатита и поли-*L*-молочной кислоты, имитирующие

минеральную составляющую костной ткани [82]. Данная модификация сильно повысила механическую прочность матрицы и ее способность к адсорбции белков. Микроструктура и сходство с природной костной тканью делают описанные композитные материалы лучшими кандидатами на роль матрицы для регенерации костей. Помимо этого, Ли с соавторами изучали возможность использования наноструктурированных матриц для регенерации хрящевой ткани [83]. Они исследовали процесс формирования хрящевой ткани из человеческих МСК, культивируемых на нановолоконной матрице из поликапролактама, полученной электроспиннингом; средний диаметр волокон составлял 700 нм. Активность хондрогенеза в данной системе была сравнима с таковой при традиционном способе культивирования на гранулах, обычно используемом для изучения хондрогенеза МСК [84]. В этом случае преимущество наноструктурированных матриц заключается в более высокой механической прочности, что важно для клинического применения.

Таким образом, проведенные на настоящий момент исследования *in vitro* и *in vivo* показали, что конструкции на основе нановолокон могут служить матрицами для регенерации костной и хрящевой тканей. Малый диаметр волокон обеспечивает большую площадь поверхности матрицы, что способствует лучшему прикреплению клеток и их пролиферации. Кроме того, высокая пористость таких структур способствует миграции клеток, эффективному транспорту питательных веществ и удалению продуктов жизнедеятельности клеток.

15.5.2. Регенерация сосудистой ткани

Слоистая структура и уникальные механические свойства сосудистой ткани значительно усложняют задачу ее регенерации. Кровеносные сосуды — это артерии, капилляры и вены. Стенка любого кровеносного сосуда состоит из трех оболочек: внутренней (интимы), средней и внешней (адвентиции). Внутренняя оболочка в основном построена из эндотелиальных клеток, средняя — из гладкомышечных клеток, внешняя — из фибробластов. Последние 20 лет ведется активный поиск биоразлагаемых материалов, которые можно было бы использовать для регенерации сосудистой ткани; данный материал должен иметь соответствующие биологические и механические свойства, препятствовать образованию тромбов и не вызывать иммунного ответа. С развитием новых технологий получения полимерных соединений были синтезированы биоразлагаемые полимеры с контролируемыми свойствами, которые можно применять для трансплантации сосудистой ткани. В проведенных ранее исследованиях для трансплантации сосудистой ткани использовали биоразлагаемые матрицы из полигликолевой кислоты, засеянные клетками данной ткани [85, 86]. В последнее время проводилось изучение способности наноструктурированных матриц к имитации свойств внеклеточного матрикса на то время, пока создаваемый клетками естественный матрикс не оказывался способным к выполнению необходимых биомеханических функций.

Мы с соавторами создали сополимер *L*-молочной кислоты и ϵ -капролактама (соотношение 75 : 25), представляющий собой сеть случайно ориентированных нановолокон [87]. Биосовместимость полученной матрицы была подтверждена в экспериментах по культивированию эндотелиальных клеток и гладкомышечных клеток (ГМК). Оба типа клеток пролиферировали на данной матрице и сохраняли нормальный фенотип. Далее исследователи попытались воссоздать точную ориентацию клеток во внутренней и средней оболочке стенки здорового сосуда путем получения носителя из ориентированных волокон с помощью модифицированного метода электроспиннинга [88]. Интересно, что на ориентированной матрице пролиферация ГМК происходила вдоль направления волокон; клетки хорошо прикреплялись к нановолокнам (рис. 15.7, *a* на цв. вклейке) и даже контактировали с клетками, расположенными на соседних волокнах (см. рис. 15.7, *b*). Была обнаружена связь между экспрессией и накоплением белков цитоскелета: α -актином (см. рис. 15.7, *в*) и миозином (см. рис. 15.7, *г*) в ГМК, и ориентацией нановолокон матрицы. На основе данных наблюдений был сделан вывод, что белки цитоскелета могут «заставлять» ГМК ориентироваться вдоль оси волокна. В здоровом кровеносном сосуде внутренняя оболочка состоит из эндотелиальных клеток, параллельных потоку крови, а ГМК средней оболочки располагаются перпендикулярно кровяному руслу. Результаты описанного выше исследования очень важны, так как они демонстрируют возможность выстраивания ГМК в желаемом направлении, следовательно, создаваемая сосудистая ткань лучше имитирует структуру, а значит, и функции нормального кровеносного сосуда.

Получение на внутренней поверхности искусственного сосуда дополнительного слоя, способного распознавать клетки, могло бы значительно ослабить гиперплазию интимы после вживления трансплантата. Химическая и топографическая стимуляция внеклеточного матрикса способствует контролю распространения и пролиферации, а также сохранению фенотипа эндотелиальных клеток, что актуально при синтезе биоразлагаемых матриц для регенерации сосудистой ткани. Удачным решением могла бы стать модификация поверхности наноструктурированной матрицы путем присоединения биосовместимых полимеров, например желатина или коллагена. Подобное изменение свойств носителя позволило бы повысить работоспособность трансплантата, предотвратить тромбоз и улучшить проходимость сосуда. В нескольких исследованиях пытались имитировать внеклеточный матрикс топографическими методами. Мы с сотрудниками провели присоединение желатина к нановолокнам из поликапролактама и создали искусственную базальную пластинку, которая одновременно походила на структуру внеклеточного матрикса и служила поверхностью для закрепления клеток [89]. Имобилизацию желатина на неупорядоченных и ориентированных нановолокнах ПКЛ производили с помощью воздушно-плазменной обработки, позволившей ввести на поверхность нановолокон СООН-группы, к которым ковалентно присоединяли молекулы желатина. Это покрытие повысило гидрофильность нановолокон, значительно улучшило распределение и рост эпителиальных клеток и способствовало поддержанию их нормального фенотипа. Эндотелизация сосудистого трансплантата — один из лучших способов предотвращения свертыв-

вания крови, поэтому данные матрицы идеально подходят для регенерации сосудистой ткани. Для создания подобной подложки эндотелиальные клетки человеческой коронарной артерии высевали на покрытые коллагеном нановолокна, полученные сополимеризацией *L*-молочной кислоты и капролактама (соотношение 70 : 30) методом электроспиннинга [90]. Фенотипические характеристики клеток на данных нановолокнах были значительно лучше наблюдаемых при выращивании клеток на подобных нановолокнах без коллагена. Эндотелиальные клетки коронарной артерии взаимодействовали с волокнами, и их псевдоподии ориентировались вдоль покрытых коллагеном структур. Следовательно, сочетание желатинового или коллагенового покрытия со специфической топографией нановолокон способствует более длительному поддержанию фенотипа клеток, что является важным свойством матриц для тканевой инженерии.

Ангиогенез — процесс образования новых кровеносных сосудов из ранее существовавших сосудов — играет важную роль в репарации и регенерации тканей. Поэтому был проведен ряд исследований, направленных на создание матриц, способных обеспечивать высокую локальную концентрацию ангиогенных факторов [91]. Другой подход состоит в использовании гепарина для доставки фактора роста сосудистого эндотелия (VEGF) и фактора роста фибробластов-2 (FGF-2), взаимодействующих через гепарин-связывающие домены [92, 93]. Чтобы лучше понимать и контролировать микроструктуры матрицы, содержащей гепарин, Раджанг с соавторами использовали для связывания ангиогенных факторов нановолокна из самоорганизующихся амфифильных пептидов с гепариновыми центрами [94]. Образование волокон осуществляли смешением водного раствора гепарина и ростовых факторов с водным раствором амфифильных пептидов. Положительно заряженные амфифильные пептиды агрегируют вокруг отрицательно заряженного гепарина с образованием цилиндрической наноструктуры. Факторы роста, связанные с жестким гепарином в составе нановолокон, менее подвержены броуновскому движению, что способствует упрочнению связывания лигандов с рецепторами. Эта гипотеза была доказана в условиях *in vitro*: FGF-2 гораздо медленнее высвобождался из нановолокон, образованных амфифильными пептидами и гепарином (57,1% за 10 дней), чем из геля, сформированного амфифильными пептидами в Na_2HPO_4 буфере (98% за 10 дней). Для подтверждения ангиогенной способности системы гепарин-амфифильных пептидов *in vivo* был исследован ангиогенез в роговице глаза крысы. Оказалось, что сочетание гепарин-содержащих наноструктур с ростовыми факторами VEGF и FGF-2 стимулировало образование сосудов. Таким образом, самоорганизующиеся наноструктуры способствуют активному образованию новых сосудов и могут использоваться в качестве матриц для регенерации сосудистой ткани.

15.5.3. Регенерация нервной ткани

Регенерация нервной ткани необходима после образования шрама как следствия повреждения ткани, при возникновении разрыва в сети нервных клеток

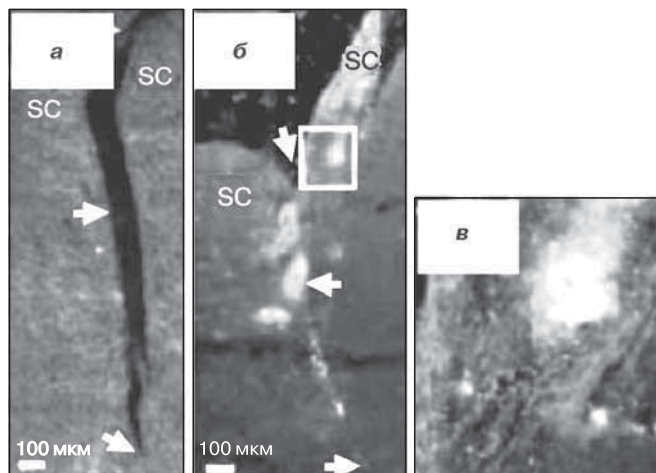


Рис. 15.8. Изображения парасагиттальных срезов головного мозга хомяка в темном поле через 30 дней после повреждения и проведенной обработки: *a* — разрез в проекции сетчатки сохранился; *б* — такое же повреждение после инъекции 10 мкл 1%-го раствора самоорганизующихся пептидов. Светлые участки соответствуют аксонам, проросшим через разрез и способствовавшим заживлению ткани. Зона, выделенная рамкой на рисунке (*б*), с большим увеличением представлена на рисунке (*в*); она соответствует области с высокой плотностью терминалей аксонов, пересекших поврежденную зону (изображение получено с помощью мечения холерным токсином). SC — верхний бугорок. Воспроизводится из [99] с разрешения Национальной академии наук США

в результате фагоцитоза, а также при нарушении роста и удлинения аксонов в центральной нервной системе взрослого млекопитающего [95].

Как упоминалось в разд. 15.2.3, пептидный гидрогель на 1% состоит из стандартного набора аминокислот и на 99% из воды. В физиологических условиях пептиды самопроизвольно формируют трехмерный гидрогель со структурой нановолокон. Матрицы из самоорганизующихся пептидных нановолокон обладают рядом преимуществ перед имеющимися на сегодня в распоряжении исследователя материалами: они имитируют естественный внеклеточный матрикс, распадаются на аминокислоты, которые используются для построения тканей и не вызывают иммунного ответа, поскольку не содержат искусственных химических и биологических добавок.

Показано, что самоорганизующиеся матрицы поддерживают рост клеток PC12 и образование действующих синапсов *in vitro* с нейронами гиппокампа крысы. Данные процессы протекают на наноструктурированной матрице, построенной из последовательностей аргинина, аланина и аспартата [96]. Активное образование отростков и формирование синапсов, наблюдавшиеся в этом исследовании, вызвали проведение аналогичного эксперимента *in vivo* для проверки возможности использования матриц из пептидных нановолокон при

срастании нервных тканей [97]. В ходе опыта в области верхнего бугорка среднего мозга взрослых и молодых хомячков производили разрез, а затем вводили в эту зону матрицу для восстановления зрительного пути. Через 30 дней в контрольной группе животных, которым в поврежденную область вводили 10 мкл физиологического раствора, заживления ткани не происходило (рис. 15.8, а), а у подопытных животных, в чей мозг вводили 10 мкл 1%-го раствора матрицы, рана затянулась (см. рис. 15.8, б), так как их аксоны проросли сквозь повреждение. Рисунок 15.8, в, демонстрирует высокую плотность иннервации: белые области соответствуют аксонам или их отросткам, выходящим из сетчатки. Это исследование подтвердило возможность использования самоорганизующихся матриц на основе пептидных нановолокон для репарации и регенерации аксонов.

После повреждения ЦНС важную роль играет ингибирование пролиферации астроцитов, предотвращающее образования рубца в глии, поскольку он препятствует элонгации аксонов [98]. Силва с сотрудниками изучали селективную дифференцировку невральных клеток-предшественников (НКП) на нановолокнах матрицы, полученной в результате самопроизвольной сборки пептидов, образующих эпителий ламинина — белка, способствующего росту нервных отростков, состава изолейцин–лизин–валин–аланин–валин (IKVAV) [99]. НКП мышей смешивали с 1%-м раствором (по массе) IKVAV в объемном соотношении 1 : 1 в ростовой среде или физиологическом растворе. Формирующаяся гелеобразная трехмерная матрица содержала кластеры клеток. Они нормально переносили самосборку матрицы, и образующиеся нейроны оказывались намного крупнее, чем в контрольных образцах. Помимо того что структура нановолокон имитирует строение внеклеточного матрикса, высокое содержание воды в носителе (99,5%) обеспечивает диффузию питательных веществ и миграцию клеток. Дифференцировка и миграция нейросфер НКП в геле IKVAV происходили значительно активнее, чем в контрольных гелях из полипептидов с нефизиологической последовательностью глутаминовая кислота–глутамин–серин или в гелях из поли-*D*-лизина. Полученная матрица не только обеспечивала быструю и избирательную дифференцировку клеток, она оказалась совместима с тканями *in vivo* и, следовательно, может использоваться для регенерации нервных тканей после травмы ЦНС при необходимости контроля дифференцировки и миграции нервных клеток.

15.5.4. Регенерация ткани сердечной мышцы

Инфаркт миокарда, образование фиброзного рубца, т. е. массовая гибель клеток в результате ишемии и нарушение работы сердца — причины сердечной недостаточности. Ее возникновение связано с тем, что кардиомиоциты представляют собой терминально дифференцированные клетки, неспособные восстанавливать сердечную мышцу после инфаркта. Конечно, пересадка сердца может помочь больному с сердечной недостаточностью, однако проблема осложняется нехваткой донорских органов и побочными эффектами, вызван-

ными проведением иммуносупрессорной терапии после пересадки. Приведенные факты заставили ученых и врачей заняться поиском других путей восстановления функций больного сердца [100]. В середине 1990-х гг. были предприняты попытки лечения сердечной недостаточности методами генной терапии и трансплантации клеток [101, 102]. Недавно появился новый подход, заключающийся в воссоздании ткани сердечной мышцы с помощью эмбриональных или неонатальных кардиомиоцитов и натуральных или синтетических биоразлагаемых матриц [103]. Были созданы лоскуты, имитирующие ткань сердечной мышцы, на основе коллагена и желатина [104, 105]. Они обладали хорошей сократимостью, но были недостаточно прочны. Альтернативный подход состоит в использовании синтетических полимеров с достаточной стабильностью и сократимостью [103]. Зонг с коллегами засеивали кардиомиоцитами матрицы из нановолокон, полученные электроспиннингом из ПМК, ПМГК (соотношение 10 : 90) в сочетании с ПМК, а также ПМГК (соотношение 75 : 25) вместе с ПЭГ/ПМК [106]. В этом исследовании проводилось сравнение роста кардиомиоцитов на матрицах с неупорядоченным расположением волокон и на подложках с локальной ориентацией волокон, достигающейся в результате одноосевого натяжения. Оказалось, что ориентация волокон направляет рост КМ; помимо этого, рост клеток зависит от состава матрицы и скорости ее разложения. Плотность КМ повышалась на более гидрофобных поверхностях, которые обычно разлагаются медленнее. Сравнительный анализ функции кардиомиоцитов на разных синтетических матрицах показал, что лучшим полимером для изготовления матриц является поли-*L*-молочная кислота.

Шин с соавторами методом электроспиннинга получили носитель из нановолокон ПКЛ и засеивали его кардиомиоцитами, выделенными из новорожденных крысят линии «Lewis» [107]. Сеть толщиной около 10 мкм и средним диаметром волокна 250 нм (вставка на рис. 15.9, *a*), имитирующая внеклеточный матрикс, была подвешена на проволочном кольце (рис. 15.9, *a*). Кардиомиоциты активно прикреплялись к поверхности и через трое суток культивирования начинали сокращаться. Спустя 14 дней клетки, сохраняя фенотип, полностью заселяли матрицу и продолжали экспрессировать типичные для сердечной ткани белки: актин, тропомиозин, тропонин-1 и коннексин-43. Кроме того, поперечный срез показал присутствие клеток во всем объеме матрицы (см. рис. 15.9, *b*). Таким образом, в данном исследовании продемонстрирована возможность получения системы для создания работоспособных участков ткани сердечной мышцы *in vitro*, что может в будущем использоваться для лечения и регенерации поврежденного сердца.

Как было описано в предыдущих разделах, в последнее время нанотехнологический подход активно применяется в тканевой инженерии и регенеративной медицине для решения многих задач, включая регенерацию костной, хрящевой, нервной, сосудистой и сердечной мышечной тканей. В настоящее время ведутся исследования, направленные на изучение возможностей регенерации кожи, мочевого пузыря и печени с помощью наноструктурированных матриц [108–100].

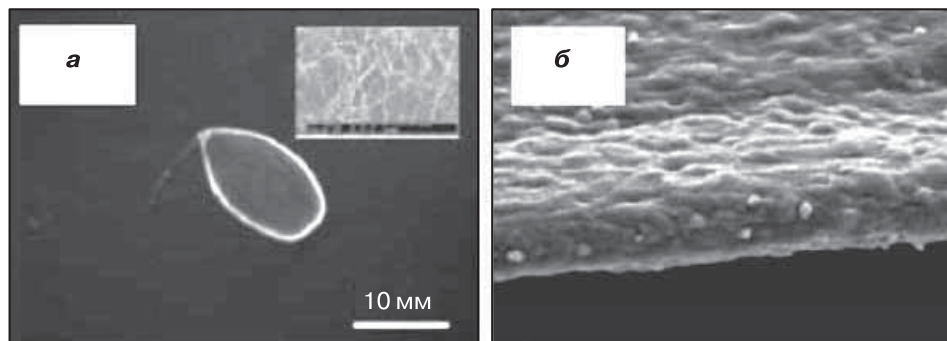


Рис. 15.9. Изображения, полученные методом сканирующей электронной микроскопии: *a* — сеть толщиной 10 мкм, состоящая из нановолокон, подвешена на проволочном кольце, которое служит в качестве пассивного остова для закрепления кардиомиоцитов при культивировании *in vitro*. На вставке показана структура сети со средним диаметром волокон 250 нм; *б* — поперечное сечение наноструктурированной матрицы через 14 дней культивирования *in vitro* показывает присутствие кардиомиоцитов во всем объеме матрицы. Воспроизводится в соответствии с [107] с разрешения Elsevier

Созданы системы для клинического использования, одобренные Управлением США по контролю за качеством лекарственных препаратов и продуктов питания и поступившие в продажу. Наиболее удачными продуктами для регенерации кожи, уже вошедшими в клиническую практику, являются «Dermagraft™» и «Apligraf™»; они используются для лечения пациентов с ожогами кожи и больных диабетом с трофическими язвами. Завершаются клинические испытания способных к сокращению лоскутов искусственной ткани для устранения повреждений сердечной мышцы, аутологичных хондроцитов в полимерном геле для лечения детей с рефлюксом мочи и взрослых женщин с недержанием мочи [111]. Кроме того, многие продукты тканевой инженерии в настоящий момент находятся на разных стадиях клинических и доклинических испытаний для использования с целью регенерации костной ткани, связок, клапанов сердца, сердечной мышцы, кровеносных сосудов и мочевого пузыря [112]*.

15.6. Заключение

Необходимость имитации свойств внеклеточного матрикса привела к разработке различных методов получения матриц для тканевой инженерии. Данные технологии позволяют создавать трехмерные матрицы из нановолокон или носители с поверхностными желобками, углублениями или выпуклостями, размеры

* Рекомендуем читателям познакомиться с новыми обзорами по данной теме, например: Mark H. Lee, et al. *Tissue Engineering Part B: Reviews*. 2010, 16(1): 41–54.

которых находятся в нанометровом диапазоне. Благодаря получению среды, напоминающей клеточное окружение *in vivo*, клетки на рассматриваемых матрицах лучше прикрепляются, дифференцируют, мигрируют и экспрессируют белки. Биосовместимые матрицы могут использоваться в системах регенерации костной, хрящевой, нервной, сосудистой и сердечной мышечной тканей. Наноструктурированные подложки уже привлекли внимание исследователей, однако в будущем, возможно, появятся новые типы матриц для тканевой инженерии, которые по своим топографическим и биохимическим свойствам будут точно воспроизводить клеточное окружение *in vivo*. Изучение наноструктурированных матриц только начинается, и еще много усилий потребуется для ответа на ряд вопросов, например: какой размер элементов структуры матрицы способствует лучшему клеточному ответу или каково поведение различных клеток на поверхностях с одинаковой топографией?

Литература

1. Data derived from American Association of Tissue Banks, Eye Bank Association of America, National Marrow Donor Program, National Kidney Foundation, Inc., and UNOS Scientific Registry; 2005.
2. Laurencin C.T., Amborsio A., Borden M.D., Cooper J.A. Tissue engineering: orthopedic applications. *Ann. Rev. Biomed. Eng.* 1999; 1: 19–46.
3. Atala A., Lanza R.P. *Methods of Tissue Engineering*. N-Y: Academic Press; 2002.
4. Kofron M.D., Laurencin C.T. Bone tissue engineering by gene delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; 58: 555–576.
5. Yu X., Botchwey E.A., Levine E.M., Pollack S.R., Laurencin C.T. Bioreactor-based bone tissue engineering: the influence of dynamic flow on osteoblast phenotypic expression and matrix mineralization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 11203–11208.
6. Langer R., Vacanti J.P. Tissue engineering. *Science* 1993; 260: 920–926.
7. Williams D.F. *The Williams dictionary of Biomaterials*. Liverpool UK: Liverpool University Press; 1999.
8. Williams D.F. Revisiting the definition of biocompatibility. *Med. Device Technol.* 2003; 14: 10–13.
9. Dankers P.Y., Harmsen M.C., Brouwer L.A., van Luyn M.J., Meijer E.W. A modular and supramolecular approach to bioactive scaffolds for tissue engineering. *Nat. Mater.* 2005; 4: 568–574.
10. Livingston T., Ducheyne P., Garino J. *In vivo* evaluation of a bioactive scaffold for bone tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 62: 1–13.
11. Griffith L.G. Polymeric biomaterials. *Acta Mater.* 2000; 48: 263–277.
12. Hayashi T. Biodegradable polymers for biomedical uses. *Prog. Polym. Sci.* 1994; 19: 663–702.
13. Mikos A.G., Thorsen A.J., Czerwonka L.A., Bao Y., Langer R. Preparation and characterization of poly(L-lactic acid) foams. *Polymer* 1994; 35: 1068–1077.
14. Mooney D.J., Baldwin D.F., Suh N.P., Vacanti J.P., Langer R. Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 1996; 17: 1417–1422.

15. Hsu Y. Y., et al. DL Effect of polymer foam morphology and density on kinetics of *in vitro* controlled release of isoniazid from compressed foam matrices. *J. Biomed. Mater. Sci.* 1997; 35: 107–116.
16. Giordano R.A., et al. Mechanical properties of dense polylactic acid structures fabricated by three dimensional printing. *J. Biomat. Sci. Polym. Ed.* 1996; 8: 63–75.
17. Borden M., Attawia M., Khan Y., Laurencin C.T. Tissue-engineered microsphere-based matrices for bone repair: design and evaluation. *Biomaterials* 2002; 23: 551–559.
18. Ramakrishna S., et al. *An Introduction to Electrospinning and Nanofibers*. Singapore: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd; 2005.
19. Ma P.X. Scaffolds for tissue fabrication. *Mater. Today* 2004; 7: 30–40.
20. Stupp S.I., et al. Supramolecular materials: self-organized nanostructures. *Science* 1997; 276: 384–389.
21. Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J., Vacanti J.P. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 2480–2487.
22. Alberts B., et al. *Molecular Biology of the Cell*. N-Y: Garland Science; 2002. p. 1090.
23. Murugan R., Ramakrishna S. Nano-featured scaffolds for tissue engineering: a review of spinning methodologies. *Tissue Eng.* 2006; 12: 435–447.
24. Pham Q.P., Sharma U., Mikos A.G. Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications: a review. *Tissue Eng.* 2006; 12: 1197–1211.
25. Kumbar S.G., Nair L.S., Bhattacharyya S., Laurencin C.T. Polymeric nanofibers as novel carriers for the delivery of therapeutic molecules. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2006; 6: 2591–2607.
26. Nair L.S., Bhattacharyya S., Laurencin C.T. Development of novel tissue engineering scaffolds via electrospinning. *Expert Opin. Biol. Ther.* 2004; 4: 659–668.
27. Li W.J., Laurencin C.T., Caterson E.J., Tuan R.S., Ko F.K. Electrospun nanofibrous structure: a novel scaffold for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002; 60: 613–621.
28. Laurencin C.T., Ko F.K. Hybrid nanofibril matrices for use as tissue engineering devices. *US Patent* 2004; 6,689,166.
29. Katti D.S., Robinson K.W., Ko F.K., Laurencin C.T. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: optimization of fabrication parameters. *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 2004; 70: 286–296.
30. Nair L.S., et al. Fabrication and optimization of methylphenoxy substituted polyphosphazene nanofibers for biomedical applications. *Biomacromolecules* 2004; 5: 2212–2220.
31. Bognitzki M., et al. Nanostructured fibers via electrospinning. *Adv. Mater.* 2001; 13: 70–72.
32. Boland E.D., Wnek G.E., Simpson D.G., Pawlowski K.J., Bowlin G.L. Tailoring tissue engineering scaffolds using electrostatic processing techniques: a study of poly(glycolic acid) electrospinning. *J. Macromol. Sci. Pure Appl. Chem.* 2001; A38: 1231–1243.
33. Yang F., Murugan R., Wang S., Ramakrishna S. Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 2005; 26: 2603–2610.
34. Li W.J., Danielson K.G., Alexander P.G., Tuan R.S. Biological response of chondrocytes cultured in three-dimensional nanofibrous poly(epsilon-caprolactone) scaffolds. *J. Biomed. Mater. Res. A* 2003; 67: 1105–1114.
35. Geng X.Y., Kwon O.H., Jang J.H. Electrospinning of chitosan dissolved in concentrated acetic acid solution. *Biomaterials* 2005; 26: 5427–5432.

36. Almany L., Seliktar D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3d cell cultures. *Biomaterials* 2005; 26: 2467–2477.
37. Schindler M., et al. A synthetic nanofibrillar matrix to promote in vivo-like organization and morphogenesis for cell in culture. *Biomaterials* 2005; 26: 5624–5631.
38. Matthews J.A., Wnek G.E., Simpson D.G., Bowlin G.L. Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromolecules* 2002; 3: 232–238.
39. Venugopal J., Ramakrishna S. Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Eng.* 2005; 11: 847–854.
40. Witte P., Dijkstra P.J., Berg J.W.A., Feijen J. Phase separation processes in polymer solutions in relation to membrane formation. *J. Membr. Sci.* 1996; 117: 1–31.
41. Ma P.X., Jennifer E. *Scaffolding in Tissue Engineering*. Boca Raton: CRC Press; 2006. p. 125.
42. Ma P.X., Zhang R. Synthetic nano-scale fibrous extracellular matrix. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999; 46: 60–72.
43. Zhang R., Ma P.X. Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000; 52: 430–438.
44. Ma P.X., Choi J. Biodegradable polymer scaffolds with well defined interconnected spherical pore network. *Tissue Eng.* 2001; 7: 23–33.
45. Gross M. *Travels to the Nanoworld: Miniature Machinery in Nature and Technology*. N-Y: Perseus Books Group; 1999.
46. Zhang S., Holmes T., Lockshin L., Rich A. Spontaneous assembly of a self-complementary oligopeptide to form a stable macroscopic membrane. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993; 90: 3334–3338.
47. Semino C.E., Merok J.R., Crane G.G., Panagiotakos G., Zhang S. Functional differentiation of hepatocyte-like spheroid structures from putative liver progenitor cells in three-dimensional peptide scaffolds. *Differentiation* 2003; 71: 262–270.
48. Semino C.E., et al. Entrapment of migrating hippocampal neural cells in 3D peptide nanofiber scaffold. *Tissue Eng.* 2004; 10: 643–655.
49. Hartgerink J.D., Beniash E., Stupp S.I. Self-assembly and mineralization of peptide amphiphile nanofibers. *Science* 2001; 294: 1684–1688.
50. Murphy W.L., Mooney D.J. Molecular scale bio-mimicry. *Nat. Biotechnol.* 2002; 20: 30–31.
51. Zhang S., et al. Self-complementary oligopeptides matrices support mammalian cell attachment. *Biomaterials* 1995; 16: 1385–1393.
52. Kisiday J., et al. Self assembling peptide hydrogel fosters chondrocyte extracellular matrix production and cell division: implications for cartilage tissue repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 9996–10001.
53. Dalby M.J., et al. Increasing fibroblast response to materials using nanotopography: morphological and genetic measurements of cell response to 13-nm-high polymer demixed islands. *Exp. Cell. Res.* 2002; 276: 1–9.
54. Geissler M., Xia Y. Patterning: principles and some new developments. *Adv. Mater.* 2004; 16: 1249–1269.
55. Kane R.S., Takayama S., Ostuni E., Ingber D.E., Whitesides G.M. Patterning proteins and cells using soft lithography. *Biomaterials* 1999; 20: 2363–2376.
56. Mrksich M., Dike L.E., Tien J., Ingber D.E., Whitesides G.M. Using microcontact printing to pattern the attachment of mammalian cells to self-assembled monolayers of alkanethiolates on transparent films of gold and silver. *Exp. Cell. Res.* 1997; 235: 305–313.

57. Lee C.J., et al. Microcontact printing on human tissue for retinal cell transplantation. *Arch. Ophthalmol.* 2002; 120: 1714–1718.
58. Li H.W., Muir B.V.O., Fichet G., Huck W.T.S. Nanocontact printing: a route to sub-50-nm-scale chemical and biological patterning. *Langmuir* 2003; 19: 1963–1965.
59. Jo J., Kim K.Y., Lee E.S., Choi B.O. Nanocontact printing of nonplanar substrate by using flexible h-PDMS stamp. *Proc SPIE* 2005; 6037: 60371T.
60. Suh K.Y., Seong J., Khademhosseini A., Laibinis P.E., Langer R. A simple soft lithographic route to fabrication of poly(ethylene glycol) microstructures for protein and cell patterning. *Biomaterials* 2004; 25: 557–563.
61. Morra M., Cassineli C. Non-fouling properties of polysaccharide coated surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1999; 10: 1107–1124.
62. Khademhosseini A., et al. Layer-by-layer deposition of hyaluronic acid and poly-L-lysine for patterned cell co-cultures. *Biomaterials* 2004; 25: 3583–3592.
63. Fukuda J., et al. Micropatterned cell co-cultures using layer-by-layer deposition of extracellular matrix components. *Biomaterials* 2006; 27: 1479–1486.
64. Bearinger J.P., et al. Biomolecular patterning via photocatalytic lithography. *Technical Proceedings of the NSTI Nanotechnology Conference and Trade Show. Volume 1; 2005; 339–342.*
65. Choi I., Kang S.K., Lee J., Kim Y., Yi J. *In situ* observation of biomolecules patterned on a PEG-modified Si surface by scanning probe lithography. *Biomaterials* 2006; 27: 4655–4660.
66. Flemming R.G., Murphy C.J., Abrams G.A., Goodman S.L., Nealey P.F. Effects of synthetic micro and nano structured surfaces on cell behavior. *Biomaterials* 1999; 20: 573–588.
67. Karuri N.W. Biological length scale topography enhances cell—substratum adhesion of human corneal epithelial cells. *J. Cell. Sci.* 2004; 117: 3153–3164.
68. Wojciak-Stothard B., Madeja Z., Korohoda W., Curtis A., Wilkinson C. Activation of macrophage-like cells by multiple grooved substrata: topographical control of cell behaviour. *Cell. Biol. Int.* 1995; 19: 485–490.
69. Wojciak-Stothard B., et al. Role of the cytoskeleton in the reaction of fibroblasts to multiple grooved substrata. *Cell. Motil. Cytoskeleton* 1995; 31: 147–158.
70. Clark P., Connolly P., Curtis A., Dow J.A.T., Wilkinsin C. Topographical control of cell behaviour. II. Multiple grooved substrata. *Development* 1990; 108: 635–644.
71. Hoch H.C., Staples R.C., Whitehead B., Comeau J., Wolf E.D. Signaling for growth orientation and cell differentiation by surface topography in *Uromyces*. *Science* 1997; 235: 1659–1662.
72. Clark P., Connolly P., Curtis A., Dow J.A.T., Wilkinson C. Topographical control of cell behavior. I. Simple step cues. *Development* 1987; 99: 439–448.
73. Rosdy M., Grisoni B., Clauss L.C. Proliferation of normal human keratinocytes on silicone substrates. *Biomaterials* 1991; 12: 511–517.
74. Spaargaren M., Bos J.L. Rab5 induces Rac dependant lamellipodia formation and cell migration. *Mol. Biol. Cell* 1999; 10: 3239–3250.
75. Liu X., Ma P.X. Polymer scaffolds for bone tissue engineering. *Ann. Biomedical. Eng.* 2004; 32: 477–486.
76. Christenson E.M., et al. Nanobiomaterial applications in orthopedics. *J. Orthop. Res.* 2007; 25(1): 11–22.
77. Yoshimoto H., Shin Y.M., Terai H., Vacanti J.P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2003; 24: 2077–2082.

78. Shin M., Yoshimoto H., Vacanti J.P. *In vivo* bone tissue engineering using mesenchymal stem cells on a novel electrospun nanofibrous scaffolds. *Tissue Eng.* 2004; 10: 33–41.
79. Pelled G., et al. Structural and nanoindentation studies of stem cell-based tissue-engineered bone. *J. Biomech.* 2007; 40: 399–411.
80. Hosseinkhani H., Hosseinkhani M., Tian F., Kobayashi H., Tabata Y. Osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells in self-assembled peptide-amphiphile nanofibers. *Biomaterials* 2006; 27: 4079–4086.
81. Hosseinkhani H., Hosseinkhani M., Tian F., Kobayashi H., Tabata Y. Ectopic bone formation in collagen sponge self-assembled peptide-amphiphile nanofibers hybrid scaffold in a perfusion culture bioreactor. *Biomaterials* 2006; 27: 5089–5098.
82. Wei G., Ma P.X. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 4749–4757.
83. Li W.J., et al. A three-dimensional nanofibrous scaffold for cartilage tissue engineering using human mesenchymal stem cells. *Biomaterials* 2005; 26: 599–609.
84. Muraglia A., et al. Formation of a chondroosseous rudiment in micromass cultures of human bone-marrow stromal cells. *J. Cell. Sci.* 2003; 116: 2949–2955.
85. Niklason L.E., et al. Functional arteries grown *in vitro*. *Science* 1999; 284: 489–493.
86. Watanabe M., et al. Tissue-engineered vascular autograft: inferior vena cava replacement in a dog model. *Tissue Eng.* 2002; 7: 429–439.
87. Mo X.M., Xu C.Y., Kotaki M., Ramakrishna S. Electrospun P(LLA-CL) nanofiber: a biomimetic extracellular matrix for smooth muscle cell and endothelial cell proliferation. *Biomaterials* 2004; 25: 1883–1890.
88. Xu C.Y., Inai R., Kotaki M., Ramakrishna S. Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 2004; 25: 877–886.
89. Ma Z., He W., Yong T., Ramakrishna S. Grafting of gelatin on electrospun poly(caprolactone) nanofibers to improve endothelial cell spreading and proliferation and to control cell orientation. *Tissue Eng.* 2005; 11: 1149–1158.
90. He W., Yong T., Teo W.E., Ma Z., Ramakrishna S. Fabrication and endothelialization of collagen-blended biodegradable polymer nanofibers: potential vascular graft for blood vessel tissue engineering. *Tissue Eng.* 2005; 11: 1574–1588.
91. Lee K.W. Sustained release of vascular endothelial growth factor from calcium-induced alginate hydrogels reinforced by heparin and chitosan. *Transplant. Proc.* 2004; 36: 2464–2465.
92. Ferrara N., Gerber H.P., LeCouter J. The biology of VEGF and its receptors. *Nat. Med.* 2003; 9: 669–676.
93. Schlessinger J., et al. Crystal structure of a ternary FGF—FGFR—heparin complex reveals a dual role for heparin in FGFR binding and dimerization. *Mol. Cell.* 2000; 6: 743–750.
94. Rajangam K., et al. Heparin binding nanostructures to promote growth of blood vessels. *Nano Lett.* 2006; 6: 2086–2090.
95. Fawcett J.W., Asher R.A. The glial scar and central nervous system repair. *Brain Res. Bull.* 1999; 49: 377–391.
96. Holmes T.C., et al. Extensive neurite outgrowth and active synapse formation on self-assembling peptide scaffolds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2000; 97: 6728–6733.
97. Ellis-Behnke R.G., et al. Nano neuro knitting: peptide nanofiber scaffold for brain repair and axon regeneration with functional return of vision. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 5054–5059.
98. Chen Z.J., Ughrin Y., Levine J.M. Inhibition of axon growth by oligodendrocyte precursor cells. *Mol. Cell. Neurosci.* 2002; 20: 125–139.

99. Silva G.A., et al. Selective differentiation of neural progenitor cells by high-epitope density nanofibers. *Science* 2004; 303: 1352–1355.
100. Koh G.Y., Soonpaa M.H., Klug M.G., Field L.J. Strategies for myocardial repair. *J. Interv. Cardiol.* 1995; 8: 387–393.
101. Malosky S., Kolansky D.M. Gene therapy for ischemic heart disease. *Curr. Opin. Cardiol.* 1996; 11: 361–368.
102. Hassink R.J., Dowell J.D., Riviere B.A., Doevendans P.A., Field L.J. Stem cell therapy for ischemic heart disease. *Trends Mol. Med.* 2003; 9: 436–441.
103. Leor J., Cohen S. Myocardial tissue engineering: creating a muscle patch for a wounded heart. *Ann. N Y Acad. Sci.* 2004; 1015: 312–319.
104. Akhyari P., et al. Mechanical stretch regimen enhances the formation of bioengineered autologous cardiac muscle grafts. *Circulation* 2002; 106: 1137–1142.
105. Kofidis T., et al. *In vitro* engineering of heart muscle: artificial myocardial tissue. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 2002; 124: 63–69.
106. Zong X., et al. Electrospun fine-textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials* 2005; 26: 5330–5338.
107. Shin M., Ishii O., Sueda T., Vacanti J.P. Contractile cardiac grafts using a novel nanofibrous mesh. *Biomaterials* 2004; 25: 3717–3723.
108. Venugopal J., Ramakrishna S. Biocompatible nanofiber matrices for the engineering of a dermal substitute for skin regeneration. *Tissue Eng.* 2005; 11: 847–854.
109. Pattison M.A., Wurster S., Webster T.J., Haberstroh K.M. Three-dimensional, nanostructured PLGA scaffolds for bladder tissue replacement applications. *Biomaterials* 2005; 26: 2491–2500.
110. Berthiaume F., Moghe P.V., Toner M., Yarmush M.L. Effect of extracellular matrix topology on cell structure, function, and physiological responsiveness: hepatocytes cultured in a sandwich configuration. *FASEB J.* 1996; 10: 1471–1484.
111. Langer R. Tissue engineering: status and challenges. *E-biomed: J. Reg. Med.* 2000; 1: 5–6.
112. Langer R., et al. Tissue Engineering: biomedical applications. *Tissue Eng.* 1995; 1: 151–162.

НАНОСТРУКТУРЫ В ДИАГНОСТИКЕ И ЛЕЧЕНИИ РАКА

Кумераш С. Соппимат и Гуру В. Бетагери

16.1. Введение

В 2006 г. 564 830 американцев умерло от рака, что составило более 1500 человек в день. В США экологические заболевания являются второй по частоте причиной смертности населения, уступая лишь сердечно-сосудистым, и уносят жизнь каждого четвертого жителя страны [1]. По экспертным оценкам, опубликованным в 2001 г., во всем мире в среднем за год регистрируется 10,9 млн новых случаев заболевания и 6,7 млн смертей, а около 24,6 млн больных живут на протяжении трех лет после постановки диагноза. Наиболее распространены рак легкого (1,35 млн), молочной железы (1,15 млн) и прямой кишки (1 млн). К летальному исходу чаще всего приводит рак легкого (1,18 млн), желудка (700 тыс.) и печени (598 тыс.) [2]. Пятилетняя выживаемость для всех видов онкологии в США за период с 1995 по 2001 год выросла до 65% по сравнению с 50%-й с 1974 по 1976 год. Это отражает успехи, достигнутые в диагностике некоторых видов рака на ранней стадии, а также появление новых методов лечения [1].

16.1.1. Ранняя диагностика рака

Несмотря на значительный прогресс, достигнутый в лечении злокачественных опухолей, в большинстве случаев болезнь диагностируют только на поздних стадиях, когда уже появляются метастазы, что значительно ухудшает прогноз. Безусловно, вероятность излечения значительно повышается, если болезнь определяют на ранней стадии. Нанотехнологии предоставляют широкие возможности для совершенствования методов диагностики рака путем создания новых поколений биосенсоров и разработки новых способов получения высокоувствительных изображений [3].

Для постановки точного диагноза, составления прогноза и мониторинга за развитием опухоли требуется проведение многочисленных тестов самого разного рода. Термин «диагностический тест» не совсем верен, поскольку данные тесты применяются не только в диагностике, но и для слежения за ходом заболевания и

результатами лечения. В зависимости от того, прогрессирует ли болезнь или наступает ремиссия, диагностические тесты применяют в следующих случаях:

- постановка диагноза, т. е. обнаружение заболевания при появлении первых симптомов;
- определение характера новообразования: некоторые виды рака подразделяются на подтипы с более или менее злокачественным течением;
- составление прогноза: по данным тестов можно предсказать вероятность выздоровления на основании сведений о пациентах, перенесших аналогичное заболевание;
- выбор стратегии: подобно многим другим болезням, опухоли по-разному поддаются лечению;
- определение реакции пациента: есть тесты, помогающие оценить результаты лечения;
- мониторинг минимальной остаточной болезни: обнаружение раковых клеток, находящихся в организме; их наличие указывает на высокую вероятность рецидива;
- наблюдение за ремиссией или прогрессированием заболевания: регулярное тестирование позволяет быстро отреагировать на возникновение рецидива после ремиссии;
- скрининг индивидов с высоким риском развития рака: идентификация аномалий ДНК или клеток у практически здоровых людей (при отсутствии симптомов заболевания) может указывать на возможное развитие опухоли;

Тесты на определение клеточной патологии проводятся на основе микроскопического анализа больных клеток.

Приборная диагностика позволяют получать изображение новообразований с помощью высокотехнологичных методов: рентгеновского исследования, компьютерной томографии (КТ), позитронно-эмиссионной томографии (ПЭТ), магнитно-резонансной томографии (МРТ) и комбинированного ПЭТ/КТ-сканирования.

Анализ крови выполняется для выявления веществ, указывающих на степень прогрессирования ракового заболевания.

Тест на опухолевые маркеры позволяет обнаруживать в крови, моче или тканях повышенную концентрацию определенных соединений, что свидетельствует о наличии злокачественного новообразования.

Геномные исследования: специфический анализ, направленный на изучение ДНК аномальных клеток [4].

Важнейшим условием успешного лечения раковых заболеваний является ранняя диагностика. В настоящее время постановка диагноза связана с исследованием изменений в клетках или тканях, которые обнаруживаются при физикальном врачебном осмотре или с помощью приборной диагностики. Однако медикам хотелось бы иметь возможность диагностировать самые ранние изменения на молекулярном уровне — задолго до того, как физикальный осмотр или какое-то другое обследование укажет на наличие заболевания. Для обнаруже-

ния рака на ранних стадиях необходимо идентифицировать изменения в молекулах, происходящие лишь в малой популяции клеток. Это означает, что соответствующие методы анализа должны обладать высокой чувствительностью. В этом случае уместно использование наноструктур, с помощью которых удается распознавать отдельные клетки.

Наномолекулярная диагностика (нанодиагностика) подразумевает применение методов нанобиотехнологии для диагностики на молекулярном уровне [3]. Вполне реально создавать различные устройства и системы, позволяющие секвенировать единичные молекулы ДНК. Учитывая, что размеры рецепторов, клеточных пор и других функциональных элементов живых клеток находятся в нанометровых пределах, можно разработать методы детального анализа данных структур с помощью новых классов нанозондов.

Большинство методов нанобиотехнологии для молекулярного анализа относят к категории биочипов или микрочипов, хотя правильнее было бы называть их «наночипы». Нанотехнология на чипах — общее определение подхода, объединяющего несколько технологий. В некоторых из них нанотехнология не используется, но, например, анализируются жидкие образцы объемом несколько нанолитров. Потенциальные возможности применения нанотехнологии в молекулярной диагностике приведены ниже [5].

16.1.2. Химиотерапия рака

Лекарственный арсенал для лечения рака за последние годы значительно расширился благодаря появлению новых химиотерапевтических препаратов. Однако по-прежнему для лечения рака применяют хирургическое вмешательство, радиотерапию и химиотерапию. Химиотерапия — метод лечения с помощью лекарственных средств с цитотоксической или цитотидной активностью, развиваемый уже более пятидесяти лет [6] и, несомненно, являющийся сильнейшим оружием в борьбе против большинства видов новообразований. Мысль о возможности системного использования алкилирующих агентов для уничтожения раковых клеток возникла в результате наблюдений за действием химического отравляющего вещества иприта [7]. После первых клинических испытаний азотного иприта, проведенных Гиллманом, стали появляться новые соединения, относящиеся к различным классам, целью создания которых было обнаружение отдельных молекул или их сочетаний, способных избирательно уничтожать раковые клетки, не нанося ощутимого вреда здоровым.

Сложность задачи состоит в том, что различия в биологии раковых и нормальных клеток зачастую весьма незначительны, и большинство синтезированных препаратов не обладают высокой специфичностью. Кроме того, долгое использование одного лекарства значительно повышает риск возникновения устойчивости к препарату [8]. Последнее обстоятельство в определенной степени преодолевается путем применения *комбинированной химиотерапии*, суть которой состоит в использовании нескольких противоопухолевых средств, назначаемых одновременно или последовательно [9].

Возможности применения нанотехнологии в молекулярной диагностике перечислены ниже [Воспроизводится по книге: *Jain K.K. Nanobiotechnology. Switzerland: Jain PharmaBiotech Publications; 2005, с разрешения издательства*].

1. Нанотехнология на чипах.
Микрожидкостные чипы для определения объема на уровне нанолитров.
Оптическое определение с использованием наночастиц.
Наночипы.
Белковые наночипы.
2. Технологии с использованием наночастиц.
Частицы золота.
Наноштрихкоды.
Магнитные наночастицы: феррожидкости, сверхмагнитные частицы в сочетании с МРТ.
Квантовые точки.
Зонды на основе наночастиц.
3. Нанозонды.
Высокопроизводительное измерение длин фрагментов ДНК.
ДНК-фингерпринтинг.
Гаплотипирование.
4. Кантилеверные системы.
Одноразовые чипы, позволяющие одновременно проводить несколько тестов (например, анализировать белки и ДНК).
Связывание простатоспецифического антигена с антителами.
5. ДНК-наномашин для молекулярной диагностики.
6. Иммуноанализ с использованием наночастиц.
Конъюгаты ДНК или белков с наночастицами.
Анализ силы взаимодействия единичных молекул с помощью наночипов.
7. Резонансное светорассеяние.
8. Наносенсоры.
Живые споры-нанодетекторы.
Нанопоровые наносенсоры.
Наносенсорный детектор глюкозы.
Оптические биосенсоры на основе метода поверхностного плазменного резонанса.
Капсулированные зонды, полученные путем биологически локализованного встраивания (PEBBLE).
9. Фотостимулированная люминесценция в наночастицах.
Кварцевые ДНК-сенсоры — нановесы.
Детекция инициированного фагом ионного каскада.

Химиотерапия сопряжена с системным токсическим действием, вызванным нежелательным воздействием лекарств на здоровые клетки. У раковых клеток много общего с обычными клетками, от которых они произошли, поэтому очень сложно создавать направленно действующие противоопухолевые препараты.

Многие из них обладают некоторой специфичностью по отношению к опухолевым клеткам за счет воздействия на репродуктивный аппарат. Но в то же время данные лекарства токсичны для нормальных быстро делящихся клеток, например для волосяных фолликулов, зародышевых и гематопозитических клеток, и, в частности, вызывают мукозит, стоматит, выпадение волос и влияют на репродуктивную функцию. Побочные эффекты химиотерапии ограничивают назначаемую дозу препарата, что нередко приводит к рецидиву заболевания [10].

Фармакокинетика противоопухолевых агентов играет важную роль в определении количественных соотношений между дозой препарата, длительностью лечения и активностью лекарства, что позволяет подобрать оптимальное количество химиотерапевтического средства для достижения наилучшего результата [11, 12]. Совершенствование фармакокинетических свойств может повышать противоопухолевую активность и снижать токсичность (фармакодинамика). Фармакокинетика препаратов определяется двумя важными факторами: способом введения и составом [12]. Большинство противораковых средств поступают в организм внутривенно, поскольку такой способ введения обеспечивает высокую биодоступность и возможность точной дозировки. Недостатками внутривенного введения являются большой объем распределения и системное действие препарата, поэтому также применяют внутриартериальный и интратекальный пути, а также инъекции непосредственно в очаг опухолевого роста [12, 13]. Однако эти методы неэффективны при глубоко расположенных опухолях.

Врачи ищут новые терапевтические подходы, которые позволили бы повысить избирательное действие лекарств на злокачественные клетки и сделали терапию более эффективной и менее токсичной. Поэтому разрабатываются различные носители для направленной доставки противоопухолевых препаратов; многие из них относятся к наночастицам.

16.1.3. Нанотехнологический подход к лечению рака

Применение нанотехнологии в области изучения и терапии рака развивается по нескольким направлениям [14]. Большинство биологических процессов, включая и те, что приводят к развитию рака, происходят на уровне молекул нанометровой величины.

Возможность одновременного взаимодействия со многими белками и нуклеиновыми кислотами на молекулярном уровне помогает лучше понять сложные регуляторные механизмы и пути передачи сигнала, лежащие в основе функционирования клеток в норме и при злокачественном перерождении.

Нанотехнология служит базисом для интеграции исследований в области протеомики — науки о строении и работе белков в клетке в другие биомедицинские отрасли, занимающиеся изучением молекулярных основ злокачественных заболеваний.

Нанотехнологический подход уже широко используется для направленной доставки противоопухолевых препаратов в организм. В этой главе мы рассмотрим несколько интересных примеров.

16.2. Применение нанотехнологии для ранней диагностики рака

16.2.1. Квантовые точки

Квантовые точки (КТ) — нанокристаллы или частицы с полупроводниковыми свойствами. Меняя состав и размер КТ, можно добиться излучения ими света в широком диапазоне длин волн — от ультрафиолетового до инфракрасного (400–4000 нм). КТ состоят из ядра, образованного неорганическим элементом (например, кадмием или ртутью), и металлической оболочки [15–18]. К тому же у КТ есть замечательные оптические свойства, которые не только позволяют проводить специфическое определение в узком диапазоне длин волн, но и делают квантовые точки более устойчивыми к фотообесцвечиванию по сравнению с органическими аналогами [18, 19]. В биологии КТ используют в качестве зондов. Они с высокой эффективностью поглощают и излучают свет, что позволяет значительно повысить чувствительность диагностических методов по сравнению с применением обычных красителей. Интенсивность излучения КТ в 10–20 раз превышает интенсивность излучения органических красителей [18–20]. Поверхность квантовых точек можно покрывать гидрофильными полимерами или присоединять к ней биоаффинные лиганды: моноклональные антитела, пептиды, олигонуклеотиды или небольшие молекулы ингибиторов. Благодаря высокому значению отношения площади поверхности к объему, удастся получать полифункциональные конъюгаты квантовых точек [20].

КТ используются в диагностике рака как *in vivo*, так и *in vitro*. Скрининг биологических жидкостей на опухолевые маркеры *in vitro* — распространенный диагностический тест, который отличается от традиционных быстротой и высокой чувствительностью. Конъюгаты КТ позволяют одновременно определять несколько маркеров [21]. Сообщалось об обнаружении с помощью КТ специфического полиморфизма одного нуклеотида в гене человеческого опухолевого супрессора p53 на микрочипе, а также о выявлении двух последовательностей ДНК с использованием двух различных КТ [22]. Еще одним возможным применением КТ *in vitro* является получение изображений клеток. Недавно были синтезированы водорастворимые КТ с очень низким уровнем неспецифического связывания для иммунофлуоресцентного мечения раковых клеток [22].

Появилась возможность получения изображения опухолевых тканей *in vivo* с помощью настраиваемых КТ. Таким образом одновременно обнаруживают несколько опухолевых маркеров, что невозможно при использовании традиционных контрастных агентов. На рис. 16.1 (см. цв. вклейку) показано многоцветное изображение КТ в живом организме [24, 25].

Квантовые точки для использования в экспериментах *in vivo* и *in vitro* выпускаются под торговыми марками Qdot[®], PLxBeads[®] и BioPixels[®]. Однако клиническое применение КТ ограничено из-за их цитотоксичности. Кроме того, необ-

ходимо более подробно изучить процессы распада и метаболизма КТ, поскольку, по некоторым данным, введенные в организм нанокристаллы накапливаются в почках, печени и селезенке [26]. Пока неизвестно, могут ли КТ быть полностью удалены из организма. Однако успехи в области модификации поверхностей и создании конъюгатов, безусловно, будут способствовать внедрению КТ-меток в клиническую практику.

16.2.2. Наноконтейнеры

Наноконтейнеры — структуры, построенные из диэлектрического ядра (обычно кремния), окруженного тонкой металлической оболочкой (как правило, золотом) толщиной 10–300 нм [27, 28]. Действие наноконтейнеров основано на опосредованном плазмонами превращении электрической энергии в свет. Как и квантовые точки, наноконтейнеры можно «настраивать» оптически; спектр излучения данных структур распространяется от ультрафиолетовой до инфракрасной области [28].

Интерес к наноконтейнерам связан с возможностью их использования для получения изображений; кроме того, в составе этих частиц нет тяжелых металлов, поэтому, в отличие от КТ, они не токсичны. Недостатком данных наноструктур является их сравнительно большой размер [28]. Покрытые полиэтиленгликолем длительно циркулирующие наноконтейнеры [29, 30] использовались *in vivo* в качестве контрастных агентов для оптической когерентной томографии [31] и фотоакустической томографии [32]. Наноконтейнеры также находят терапевтическое применение для лечения рака, поскольку с их помощью можно доставлять противоопухолевые препараты. Кроме того, они способны поглощать свет, выделяя при этом тепло, на чем основан терапевтический метод фототермальной абляции [33–35]. Одним из коммерческих вариантов наноконтейнеров является продукт AuroShell™, который используется в диагностике и лечении опухолей. Вскоре планируется начать клинические испытания этого препарата для лечения злокачественных новообразований головного мозга. После внутривенного введения такие частицы начинают накапливаться в области опухоли в результате повышенной проницаемости и удерживания (EPR-эффект). Когда наноконтейнеры сконцентрируются в опухоли, ее подвергают воздействию лазерного излучения определенной длины волны, которая наилучшим образом проникает внутрь тканей.

В отличие от металлов и других материалов частицы AuroShell сконструированы таким образом, что поглощают свет именно на данной длине волны и превращают его в тепло. В результате происходит быстрый распад опухоли [36].

16.2.3. Наночастицы золота

Наночастицы золота — один из наиболее многообещающих инструментов для диагностики и лечения рака. Преимущество этих частиц состоит в простоте получения и способности поглощать или рассеивать свет с желаемой длиной волны

[37]. Кроме того, золото разрешается использовать в терапевтических целях, поскольку оно значительно менее токсично, чем другие металлы, используемые для изготовления квантовых точек. Наночастицы золота можно применять как для диагностики *in vitro*, так и для получения изображения опухолей *in vivo* [38–40] методом фотоакустической томографии [41]. Наночастицы золота поглощают свет гораздо интенсивнее любого органического красителя, что делает их удобным инструментом для обнаружения раковых клеток [42, 43], а при активации лазером они убивают их [44, 45]. Технология «Verigene AutoLab» основана на использовании наночастиц золота, связанных с ДНК. Она состоит в использовании ДНК-зондов, способных идентифицировать определенную олигонуклеотидную последовательность. При смешении частиц золота с образцом происходит взаимодействие исключительно с комплементарными генетическими конструкциями [46]. В настоящее время эта технология используется для ранней диагностики рака.

16.2.4. Парамагнитные наночастицы

Магнитные наночастицы — продукты нового поколения, предназначенные для диагностики рака методами магнитно-резонансной томографии (МРТ) и компьютерной томографии (КТ). Преимущества этих частиц связаны с большей чувствительностью к изменениям магнитного поля, чем у традиционных контрастных веществ, например гадолиния. Наночастицы из оксида железа представляют интерес в качестве лимфотропов — нового класса контрастных агентов для МРТ, уникальные свойства которых определяют их широкое клиническое применение [47]. Сначала парамагнитные наночастицы оксида железа применялись для получения изображений печени. Оказалось, что малый размер частиц позволяет им проникать сквозь стенки капилляров и концентрироваться в лимфатических узлах, что позволило надежно охарактеризовывать лимфатические узлы любого размера. Механизм действия данных наночастиц изображен на рис. 16.2 [48–51].

Таким образом, появилась новая технология, позволяющая проводить неинвазивное обследование лимфатических узлов у пациентов с различными видами опухолей [51, 52]. Магнитные наночастицы — пример наиболее успешного диагностического внедрения нанотехнологии. Уже созданы коммерческие системы ferumoxtran-10, AMI-227 и Combidex[®], выпущенные компанией «Advanced Magnetics Inc.», а также Sinerem[®] — продукт компании «Laboratoire Guerbet».

Подобный подход значительно расширяет возможности молекулярной диагностики. Некоторые диагностические приемы, основанные на применении нанотехнологии, перечислены в табл. 16.1. Этот список очень быстро дополняется и многие новые продукты и технологии находятся на стадии испытаний. Нет сомнений в том, что сочетание новых приемов нанодиагностики и нанотерапии приведет к революционным изменениям в лечении раковых заболеваний.

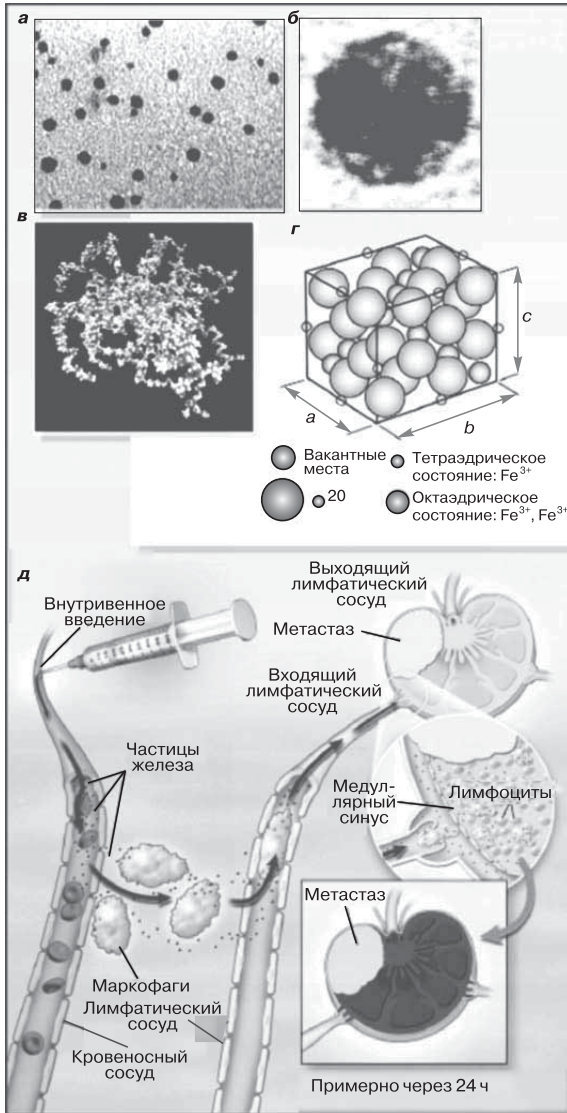


Рис. 16.2. Электронная микрофотография гексагональных лимфотропных парамагнитных наночастиц размером около 2–3 нм (*a* и *б*), молекулярная модель связанной с поверхностью частицы декстранов размером 10 кДа и упаковка кристаллов оксида железа (*в* и *г*), а также механизм действия наночастиц (*д*). Средний размер частиц, связанных с декстраном, составляет 28 нм (*в* и *г*). После системного введения длительно циркулирующие частицы достигают интерстиция и выходят в лимфатические сосуды. Нарушение тока лимфы или структуры лимфатического узла в результате образования метастаз приводит к аномальному накоплению лимфотропных наночастиц, что определяется методом МРТ. Воспроизводится в соответствии с [51] с разрешения авторов

Таблица 16.1

Нанотехнология в основе ранней диагностики рака

Продукт	Технология	Применение	Статус	Производитель
Qdot	Квантовые точки		В продаже	Invitrogen
Biopixel	Квантовые точки	Детекция клеток	В продаже	Biocrystals
Plxbead	Квантовые точки	Диагностика рака	В продаже	Crystalplex
Verigene	Связанные с ДНК наночастицы золота	Диагностика рака	В продаже	Nanosphere
Ferumoxtran-10	Наночастицы оксида железа	Диагностика рака лимфатической системы	В продаже	Advanced magnetics
Qdot 800	Конъюгаты КТ с эмиссией в близкой ИК-области	Анализ лимфоузлов толстой кишки, легкого и матки	Доклинические испытания	Quantum dot

16.3. Применение нанотехнологических методов в лечении рака

16.3.1. Липосомы

За 40 лет, прошедших с того дня, когда Алек Бэнгхем* впервые наблюдал образование двойных фосфолипидных слоев в водных средах, липосомы превратились из новых экзотических объектов биофизических исследований в широко используемые переносчики лекарств разного назначения. Использовать липосомы как переносчики химиотерапевтических препаратов предложил Грегориадис в 1981 г. [53]. Однако первые исследования показали, что липосомы быстро распознаются и выводятся из циркуляции ретикулоэндотелиальной системой [54, 55]. К тому же первые липосомные переносчики обладали высокой текучестью содержащихся в них лекарств и с трудом экстравазировались из кровотока в интерстициальную жидкость опухолевых тканей [56, 57].

* Алек Бэнгхем (1921–2010) — известный британский гематолог, первооткрыватель липосом.
Прим. перев.

В результате упорных исследований последних 15 лет был разработан ряд липосомальных препаратов, а также многие биомедицинские продукты и технологии, основанные на применении липосом.

Перечислим некоторые важные аспекты создания нанопереносчиков.

1. Структура, производство и характеристика нанопереносчиков.
2. Фармакокинетика переносчиков.
3. Механизм направленной доставки лекарств и пассивный транспорт липосом к опухолевым тканям.

Липосомы были первыми продуктами нанотехнологии, допущенными к применению в терапевтических целях, и первыми нанофармацевтическими средствами в химиотерапии раковых заболеваний.

В этой главе мы сосредоточим внимание на использовании липосом для лечения новообразований и, в частности, поговорим об уже производимых препаратах и лекарственных средствах, которые показывают хорошие результаты в клинических испытаниях.

16.3.1.1. Длительно циркулирующие липосомы

Для достижения продолжительной циркуляции липосом *in vivo* было предложено несколько подходов, в том числе покрытие поверхности липосом инертными биосовместимыми полимерами. Например, полиэтиленгликоль (ПЭГ), образует на поверхности липосом защитный слой и снижает вероятность распознавания липосом опсонинами и, следовательно, их выведение из циркуляции [58, 59]. Данные липосомы ныне широко изучаются и используются как в исследованиях *in vitro* и *in vivo*, так и в клинической практике [60]. Липосомы с полиэтиленгликолем называются «стерически стабилизированные», или липосомы Stealth®. Применение технологии длительно циркулирующих липосом позволило наладить выпуск противоопухолевого препарата доксорубинина, заключенного в липосомальные капсулы. Этот препарат, известный под торговой маркой Доксил, был допущен к клиническому использованию в США в 1995 г.

Фармакокинетика лекарств с липосомальной оболочкой зависит от следующих факторов [61].

1. Состав двойного липидного слоя.
2. Размеры липосом.
3. Природа лекарственного препарата.
4. Характер взаимодействий между лекарством и липидами.

Перечисленные параметры влияют на клиренс липосом, при этом возможны три варианта развития событий.

1. Захват липосом из циркулирующей крови ретикулоэндотелиальными системами печени и селезенки с последующим метаболизмом и выведением лекарства.

2. Высвобождение препарата с дальнейшим распределением по тканям и выведением свободного лекарства.

3. Накопление заключенного в липосомы фармакологического средства в тканях с повышенной микрососудистой проницаемостью, включая опухоли.

16.3.1.2. Размер липосом и их транспорт к новообразованиям

Размер липосом во многом определяет их судьбу в организме. Исследования показывают, что частицы размером менее 200 нм способны избежать селективного отбора в печени. Однако для проникновения в опухоль диаметр липосом должен быть настолько мал, чтобы они могли проникать через проницаемые сосуды [62, 63]. Величина данных частиц не должна превышать 150 нм; это определяется свойствами фенестрированного эндотелия печеночных капилляров. Впрочем, в одном исследовании опухолевого ксенотрансплантата у мышей было показано, что даже липосомы размером до 400 нм могут проникать через микрокапилляры опухолевой ткани [64]. Несмотря на приведенные выше данные, общим выводом из многочисленных работ, посвященных фармакологии липосом, является прямая зависимость между размером частиц и вероятностью их неспецифического захвата ретикулоэндотелиальной системой.

16.3.1.3. Доксил

Гидрохлорид доксорубина ($C_{27}H_{29}NO_{11}HCl$, молекулярная масса 579,99 Да) — известный цитотоксический антибиотик антрациклинового ряда, образуемый клетками *Streptomyces peucetius*, var. *caesius*. К сожалению, доксорубин оказывает дозозависимое кардиотоксическое действие; у 7,5% пациентов, получивших кумулятивную дозу доксорубина (550 мг/м^2), отмечались клинические проявления кардиомиопатии [65]. При тщательном анализе, учитывающем изменение фракции выброса левого желудочка и результаты закрытых клинических испытаний, число больных с признаками кардиомиопатии возрастает до 20% [66]. Поэтому была установлена предельно допустимая кумулятивная доза препарата — $450\text{--}500 \text{ мг/м}^2$ при лечении свободным доксорубином, вводимым в виде болюсов* каждые три недели. При приеме в течение недели [66] или продолжительном внутривенном введении [67] этот предел в некоторой степени удастся повысить. Включение гидрохлорида доксорубина в липосомальные капсулы качественно меняет фармакокинетику препарата.

Доксил — жидкая суспензия одноламеллярных везикул со средним размером 80–90 нм, заполненная гидрохлоридом доксорубина (рис. 16.3). Общее содержание липидов в препарате составляет примерно 16 мг/мл, концентрация доксорубина — 2 мг/мл. Препарат содержит три липидных составляющих: гидрированный фосфатидилхолин сои (ГФХС, $T_{пл}$ 52,5 °C), холестерин и конъюгат дистеароилфосфатидилэтаноламина (ДСФА) с ПЭГ (натрия карбамоилметоксиполиэтиленгликоль дистеароилглицерофосфоэтаноламин) в молярном соотношении 56 : 38 : 5 [68].

Фосфатидилхолин, холестерин и фосфатидилэтаноламин являются пищевыми липидами и естественными компонентами плазматической мембраны клеток. Данное соотношение ГФХС и холестерина в липосоме придает двойному слою прочность при температуре 37 °C и ниже, обеспечивая удерживание лекарства.

* Болюс — жидкая или полужидкая фармацевтическая или иная субстанция, вводимая внутривенно; вызывает быструю реакцию организма. — *Прим. перев.*

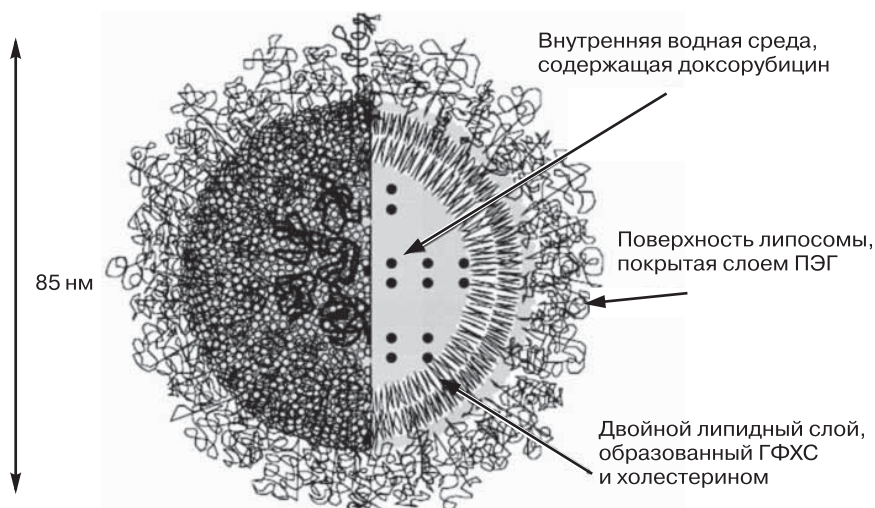


Рис. 16.3. Схема строения препарата Доксил. Двухслойная липидная мембрана, состоящая из гидрированного фосфатидилхолина сои (ГФХС), отделяет внутреннюю водную среду от внешней среды. Доксорубин включен во внутреннее пространство липосомы и плотно упакован (10 000–15 000 молекул лекарства в одной липосоме), образуя гелеобразную фазу. Линейные полимерные сегменты полиэтиленгликоля (ПЭГ) размером 2000 Да встроены во внешнюю поверхность липосомы и формируют защитный гидрофобный слой, обеспечивающий стабильность частиц. Средний диаметр липосомы составляет около 85 нм

Включение в двойной липидный слой ДСФА необходимо для ковалентного связывания гидрофобных цепей ПЭГ (молекулярная масса 2000 Да) с этаноламидной головкой ДСФА и размещения этих цепей во внутренней и внешней водных фазах. Чтобы включить лекарство в липосомы, используют градиент сульфата аммония; для этого предварительно нагруженные сульфатом аммония липосомы инкубируют с раствором препарата. Большая часть доксорубина (> 90%) включается в липосомы в форме сульфата с гелеобразной консистенцией. Образование соли не только повышает степень капсулирования, но также предотвращает преждевременное высвобождение лекарства [69–71].

Фармакокинетические свойства Доксила. Фармакокинетика и механизм доставки к опухолям Доксила и других включенных в липосомы препаратов принципиально отличаются от таковых для традиционных химиотерапевтических средств [72].

У инкапсулированных препаратов происходит 1000-кратное увеличение площади под кривой зависимости концентрации в плазме от времени (AUC) и значительное снижение клиренса и объема распределения. Время полужизни Доксила также увеличивается до 60–80 ч (см. ниже). Продолжительное время циркуляции и стабильное удерживание Доксила [73] — ключевые факторы, позволяющие

нагруженным лекарством липосомам достичь капиллярной сети в тканях с замедленной циркуляцией, которой характеризуются опухоли и некоторые участки организма [68]. Поскольку липосомы Stealth обладают высокой устойчивостью в плазме, большая часть дозы в составе липосом достигает тканей-мишеней. При транспортировке теряется не более 5% препарата, который распределяется по тканям в свободном виде [73]. При лечении Доксилем пациенток с раком молочной железы концентрация лекарства в опухоли примерно в 10 раз выше таковой в прилегающей мышечной ткани [74], что подтверждает эффективность целевой доставки препарата, как и предполагалось на основании результатов широких доклинических испытаний [75]. К сожалению, липосомы Stealth также накапливаются в здоровых тканях, например в коже [76] и, возможно, в слизистых оболочках. В результате максимально переносимое количество Доксила ниже, чем соответствующая доза доксорубина [77], хотя данные многих клинических исследований [77–79] показывают, что максимальная кумулятивная доза Доксила значительно выше таковой для доксорубина.

Таблица 16.2

Фармакокинетика Доксила и доксорубина [62, 74, 83, 85]*

Фармакокинетический параметр	Свободный доксорубин	Доксил
AUC, мг · ч/л	3,5	2325–4082
C_{\max} , мг/л	5,9	21–33
Cl, мл/ч	25 300	23–45
V_{ss} , л	365	3–5
$T_{1/2}$, ч	0,06/10,4 (a)	62–89

* Свободный доксорубин назначали в дозе около 50 мг/м² (медленное введение), а инкапсулированный препарат — в дозе 60 мг/м² (медленное введение); AUC — площадь под кривой на графике зависимости концентрации в плазме от времени; C_{\max} — максимально измеряемая концентрация; Cl — общий клиренс; V_{ss} — объем распределения в стационарном состоянии; $T_{1/2}$ — время полувыведения; (a) — фаза элиминации.

Фармакодинамические свойства Доксила. Сегодня Доксил применяется для лечения больных с раком яичников, чья болезнь прогрессирует или возобновилась после химиотерапии с применением препаратов платины. Доксил также показан при лечении саркомы Капоши у больных СПИДом, для которых комбинированная химиотерапия оказалась неэффективной, или у них наблюдается непереносимость подобной процедуры. В настоящее время проводится более трехсот клинических испытаний по изучению возможностей применения Доксила (одного или в сочетании с другими препаратами) для лечения пациентов с различными видами рака [80].

Ранние исследования действия липосомального доксорубина у больных с вызванной СПИДом саркомой Капоши показали, что действие Доксила наи-

лучшим образом описывает двухкомpartmentная линейная модель. Реакция новообразования в значительной степени связана как со средней максимальной суточной дозой доксорубина, так и с интенсивностью дозы [81]. Корреляционный анализ количества и фармакокинетических параметров Доксила и токсичности показал снижение последней и повышение противоопухолевой активности, что согласуется со значением $T_{1/2}$ у пациенток с раком молочной железы [82]. При назначении Доксила в кумулятивной дозе 500 мг/м² и более пациентам с прогрессирующими солидными опухолями было показано, что прием Доксила сопряжен с гораздо меньшим риском возникновения кардиомиопатии, чем лечение свободным доксорубином [83]. Однако доксорубин в капсулах, содержащих ПЭГ, оказывает токсическое действие на кожу, вызывая так называемую ладонно-подошвенную эритродизэстезию, неотличимую от возникающей при введении свободного доксорубина. Токсическое действие липосомального доксорубина кумулятивно и, по-видимому, зависит от промежутков между введением доз препарата [84]. Успешное применение Доксила побудило исследователей к разработке других липосомальных систем и новых нанопереносчиков для лечения рака.

16.3.1.4. Липосомы Stealth с цисплатином

Цисплатин — один из наиболее широко применяемых химиотерапевтических препаратов, используемых для лечения онкологических заболеваний людей и животных. Данное средство обладает широким спектром активности и, в частности, является основным компонентом адьювантной системной химиотерапии остеосаркомы [85]. Применение цисплатина ограничивается дозозависимым токсическим действием, например нефротоксичностью [86].

Было предложено несколько стратегий, направленных на снижение побочных эффектов: созданы менее токсичные и/или более действенные платиновые аналоги, практикуется одновременный прием нефропротекторов и длительное гидратирование [85–87]. Другой подход состоит в инкапсулировании цисплатина в липосомы, что позволяет снизить токсичность и изменить фармакокинетику и распределение в организме [88, 89].

Препарат SPI-77 представляет собой цисплатин, заключенный в липосомы Stealth, содержащие конъюгаты полиэтиленгликоля (натрия карбамоилметоксиполиэтиленгликоль дистеароилглицерофосфозтаноламин), другой фосфолипид (гидрированный фосфатидилхолин сои) и холестерин. Общее липидное содержание SPI-77 составляет около 71 мг/мл, концентрация цисплатина — 1 мг/мл, диаметр частиц — 110 нм [90]. Первые результаты клинических испытаний показали, что фармакокинетический профиль инкапсулированного препарата значительно отличается от профиля свободного цисплатина. Фармакокинетика SPI-77 в основном определяется свойствами липосом, что приводит к высокой концентрации холестерина и достаточно низкой концентрации свободной платины в плазме, лейкоцитах и опухоли [91]. Отсутствие положительных результатов в первой и второй фазах клинических испытаний заставило производителя отказаться от дальнейших исследований SPI-77 [92].

16.3.1.5. Винкристин в сфингомиелиновых липосомах

Винкаалкалоид винкристин обладает высокой активностью против опухолевых клеток при лимфомах и остром лимфобластном лейкозе [93]. Интенсивность дозы препарата ограничивается побочным действием — разрушением микротрубочек аксонов в результате связывания винкрестина с тубулином нейронов, что вызывает повышенную нейротоксичность при дозах препарата, больших 2,0 мг [94]. В большинстве экспериментальных моделей показано, что устойчивость раковых клеток к винкрестину при лейкозе вызвана ослаблением накопления и удерживания препарата. Данный эффект обычно объясняют экспрессией Р-гликопротеина и множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ-фенотип) [95]. Фармакокинетика болюсно вводимого стандартного винкрестина сильно различается у разных пациентов по клиренсу, объему распределения и времени полувыведения [96–98].

Для улучшения фармакокинетических характеристик препарата винкристин поместили в липосомальную оболочку, состоящую из сфингомиелина и холестерина; такие липосомы иногда называют «сфингосомы» [99]. Фармакокинетические исследования на животных показали, что внутривенное введение лекарства в составе сфингосом приводит к 12-кратному увеличению значения $t_{1/2}$, что объясняется протекторными свойствами липосом при быстрой начальной фазе элиминации. Снижение нейро- [100] и дерматологической токсичности [101] инкапсулированного препарата связывают с уменьшением концентрации свободного винкрестина. Увеличение длительности циркуляции препарата приводит к его преимущественному накоплению в тканях, отличающихся повышенной проницаемостью сосудов, в том числе опухолях [102]. Аналогичный подход использовали при получении инкапсулированного винорелбина — одного из наиболее липофильных винкаалкалоидов. Препарат с высоким выходом (> 90%) заключали в липосомы диаметром 100 нм с помощью метода, основанного на применении ионофоров. Стабильность полученных структур очень высока (< 5% утечки препарата, > 90% интактного препарата, размер липосом не изменялся после года хранения при 2–8 °С). Доклинические исследования винорелбина успешно завершены, сейчас проходят его клинические испытания [103].

16.3.1.6. Медленное высвобождение лекарства из липосом

Липосомы находят применение в противоопухолевой терапии в качестве системы доставки лекарственных средств с медленным высвобождением. Первым выпущенным препаратом такого рода стал ДероСут[®]. Он изготовлен по технологии ДероFoam[®] компанией «Sky Pharma» и предназначен для лечения пациентов с лимфоматозным менингитом, который является осложнением лимфомы на поздней стадии заболевания. Больным лимфоматозным менингитом назначают цитарабин, однако из-за малого времени полужизни препарата (время полувыведения из плазмы — 7–20 мин) показаны ежедневные спинномозговые инъекции, что тяжело переносится пациентами и значительно повышает стоимость ухода за ними. Применение ДероСут позволяет снизить частоту введения до одного раза в две недели и проводить амбулаторное лечение. ДероСут

используется в США с 1999 г. Он представляет собой сферические частицы, состоящие из множества внутренних отделов с инкапсулированным лекарством. Каждый компартмент отделен от других двойным липидным слоем, сформированным синтетическими аналогами природных липидов (диолеоилфосфатидилхолином, дипальмитоилфосфатидилглицерином, холестерином, триолеином) [104]. По сравнению с инъекциями свободного цитарабина, интратекальное введение ДероСут предоставляет значительные фармакокинетические преимущества, которые увеличивают терапевтический потенциал данного цитотоксического препарата в S-фазе клеточного цикла. Кроме того, более продолжительное время циркулирования инкапсулированного лекарства в спинномозговой жидкости позволяет увеличить интервал между инъекциями, что особенно важно при интратекальном (в окружающее спинной мозг пространство) способе введения [104, 105].

16.3.1.7. Липосомальные вакцины

В классических вакцинах иммуногеном служит либо очищенный антиген, либо ослабленный патогенный организм. В последнем случае может возникнуть инфекционное заболевание, против которого проводится иммунизация. С другой стороны, очищенные антигены зачастую неспособны вызвать долгосрочный иммунный ответ, а иногда он и вовсе отсутствует. В отличие от краткосрочного иммунного ответа, вызванного прямой иммунизацией антигенами, презентация антигенов в липосомах приводит к долгосрочному ответу, что важно для эффективной вакцинации. Многочисленные исследования показали, что некоторые липосомы способны образовываться из мембран злокачественных клеток, содержащих потенциальные антигены. Благодаря присутствию мембраносвязанных антигенов, препараты на основе мембран могут использоваться в качестве противоопухолевых вакцин. Некоторые мембранные препараты применяются как опухольспецифичные антигены для лечения меланомы и лимфосаркомы SL2 у мышей [106–108].

В одной работе изучали возможность терапевтического действия синтетических человеческих пептидов MUC1 (25 аминокислот), известных как BLP 25, в качестве противораковых вакцин. Для улучшения иммунного ответа MUC1 включали в состав липосом и изучали влияние физического связывания пептидов и липосом на степень иммунного ответа. Конъюгированные с липидами и свободные MUC1 помещали в липосомы, состоящие из дистеароилфосфатидилхолина, холестерина и димиристоилфосфатидилглицерина (в молярном соотношении 3 : 1 : 0,25) и монофосфорил-липида А (1% по массе от общего содержания липидов). Мышей линии C57BL/6 иммунизировали липопептидом, смесью пептида с липосомами, а также пептидом, ассоциированным с липосомами (включенным в липосомы или связанным с их поверхностью). Как инкапсулированный, так и связанный с поверхностью липосом пептид вызывал сильный антигенспецифичный Т-клеточный ответ, чего не наблюдалось при вакцинации липопептидом или смесью пептида со свободными липосомами. Следовательно, физическое взаимодействие пептида с липосомами абсолютно необходимо для формирования Т-клеточного ответа, причем тип связи не имеет

значения. Зато он оказывается решающим при гуморальном иммунном ответе. Только липосомы с поверхностными пептидами вызывали выработку MUC1-специфичных антител. Эти результаты подтверждают гипотезу о том, что различные липосомальные формы запускают разные иммунные механизмы. Данное исследование показало, что основанная на применении липосом система доставки препарата может использоваться для преимущественного инициирования либо клеточного, либо гуморального иммунного ответа [109, 110].

Канадская компания «Biomira Inc.» в содружестве с компанией «Merck KgaA» разработала липосомальную вакцину BLP 25 (L-BLP25), выпускающуюся под торговой маркой Stimuvaх®. Этот продукт применяется при лечении немелкоклеточного рака легкого и рака простаты на поздних стадиях заболевания. Клинические исследования показывают, что прием вакцины продлевает жизнь пациентов с III стадией локорегионального варианта немелкоклеточного рака легкого и способствует повышению качества жизни. Данный препарат также продемонстрировал хорошие результаты в лечении больных с раком простаты, увеличивая время удвоения простатоспецифического антигена у мужчин с биохимическими аномалиями после хирургического удаления простаты. Столь значимые клинические результаты использования относительно нетоксичной вакцины вселяют надежду на появление нового эффективного метода лечения [111–113].

16.3.1.8. Липосомы в качестве переносчиков нерастворимых в воде противоопухолевых препаратов

Липосомы идеально подходят для доставки нерастворимых в воде лекарств при внутривенном введении, поскольку они усиливают физическую и биологическую стабильность препаратов. Одним из примеров служит липосомальный аннамицин. Аннамицин — антибиотик антрациклинового ряда, который не вызывает перекрестного привыкания и обладает высоким сродством к липидным мембранам. Это соединение нерастворимо в воде, и в качестве его переносчика при внутривенном введении используются липосомы. Механизм действия аннамицина, по-видимому, связан с ингибированием топоизомеразы II. Липосомальный аннамицин (L-аннамицин) сочетает в себе свойства лекарства (отсутствие перекрестной устойчивости) с потенциальными преимуществами доставки в составе липосом (снижение кардиотоксичности и предпочтительное распределение в тканях-мишенях) [114].

Сухая заморозка липосом повышает эффективность захвата лекарства, а также физическую и химическую стабильность препарата [115]. В доклинических и клинических испытаниях показано, что липосомы усиливают противоопухолевую активность аннамицина *in vivo*, причем небольшие липосомы эффективнее крупных или суспензии антибиотика [116].

16.4. Полимерные наночастицы

В связи со значительными успехами в создании липосомальных систем транспорта фармакологических средств и новыми возможностями синтеза полиме-

ров возник интерес к получению биоразлагаемых наночастиц в качестве носителей лекарств, применяемых в противораковой терапии. Для переноса противоопухолевых препаратов с различными физико-химическими свойствами используют ряд природных и синтетических полимеров [117]. Некоторые из противораковых агентов уже производятся, а многие другие находятся на разных стадиях клинических испытаний.

16.4.1. Альбуминовые наночастицы

Паклитаксел — химиотерапевтический препарат с широким спектром противоопухолевой активности, который используется как в рамках монотерапии, так и в сочетании с другими лекарствами [118]. Палитаксел широко применяется для лечения пациентов с прогрессирующим раком молочной железы, яичников, головного мозга, легких. Однако прием препарата вызывает побочные эффекты: снижение числа лейкоцитов (нейтропения), общую слабость, повышенную чувствительность кожи и инфекционные заболевания. Все перечисленные побочные эффекты ограничивают использование препарата [119–122].

Применяемая в клинике форма паклитаксела Таксол® («Bristol-Mayers Squibb») содержит неионное поверхностно-активное вещество Cremophor EL (полиоксиэтилированное касторовое масло) и этиловый спирт для повышения растворимости лекарства [123]. Однако при внутривенном введении у 25–30% пациентов Cremophor EL вызывает гиперчувствительность [124, 125].

Преодолеть токсичность данного компонента можно, заключив паклитаксел в наночастицы из альбумина. Наночастицы образуются за счет кавитации и сил сдвига, возникающих при ультразвуковом воздействии. Сначала паклитаксел растворяют в хлористом метиле, затем раствор добавляют к человеческому сывороточному альбумину. Смесь гомогенизируют до образования грубой

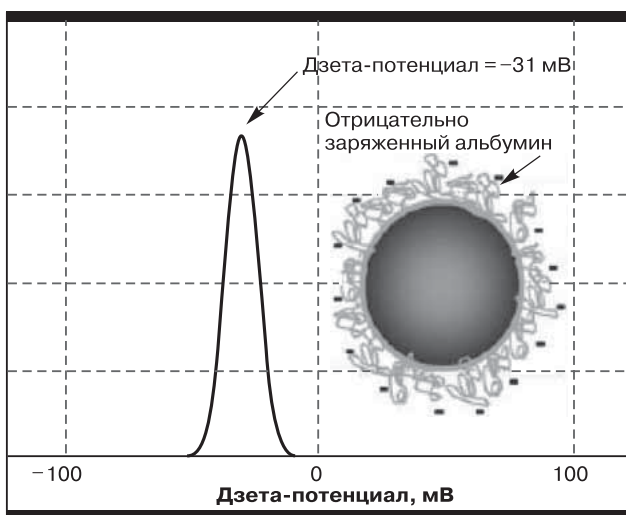


Рис. 16.4. Дзета-потенциал покрытых альбуминовой оболочкой частиц паклитаксела

эмульсии, затем опять подвергают воздействию ультразвука, после чего помещают в роторный испаритель для удаления хлористого метилена. Полученную дисперсию лиофилизуют. Порошок легко превратить в исходную дисперсию, добавляя к нему стерильную воду или физраствор [126].

Данная форма паклитаксела используется для быстрого введения, причем у пациентов отсутствует гиперчувствительность к препарату. Более того, увеличение максимально переносимой дозы и удовлетворительный профиль токсичности паклитаксела играют важную роль в эффективности химиотерапии [127–129].

В январе 2005 г. FDA разрешило выпуск этой формы паклитаксела под торговым названием Абраксан.

16.4.2. Мицеллярные наночастицы

Известно, что амфифильные полимеры в водной среде способны самопроизвольно собираться в мицеллы, захватывая внутрь нерастворимые в воде частицы. Полимерные мицеллы более устойчивы, нежели мицеллы ПАВ, что связано с понижением их критической концентрации [130]. Схема включения лекарства в мицеллярные наночастицы показана на рис. 16.5.

В настоящее время применяют мицеллярные наночастицы, образующиеся в результате самопроизвольной сборки биоразлагаемых диблок-сополимеров метоксиполиэтиленгликоля и поли(молочной кислоты). Размер частиц составляет 20–200 нм [131].

В доклинических испытаниях определено, что включение паклитаксела в состав полимерных мицелл приводит к трехкратному повышению максимально переносимой дозы и значительному увеличению противоопухолевой активности по сравнению с Таксолом [132]. Первая стадия клинических испытаний показала, что такая форма препарата не оказывает токсического действия в дозе до 300 мг/м². Однако при ее увеличении до 390 мг/м² наблюдались нейропатия, миалгия и нейтропения. Вторая стадия клинических испытаний проводится на больных с прогрессирующим раком молочной железы и мелкоклеточным раком легкого [133].

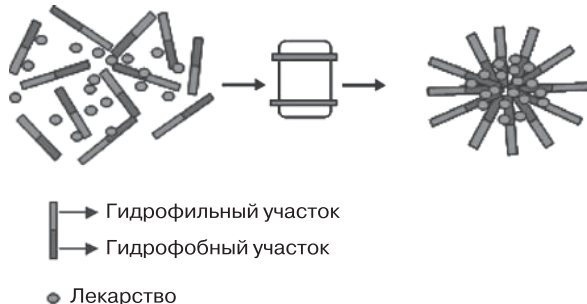


Рис. 16.5. Схема самопроизвольной сборки полимерных мицеллярных наночастиц, содержащих лекарственный препарат, в условиях диализа

Еще одним примером применения мицеллярных наночастиц служит система, полученная блок-сополимеризацией этиленгликоля и гидрофобного производного полиаминокислоты. В данные структуры включали противораковое средство цисплатин. Средний размер мицелл — 30 нм (распределение по размерам невелико). Противоопухолевая активность частиц, несущих цисплатин, сохраняется, а нефро- и нейротоксическое действие цисплатина снижается. Поэтому мицеллярная форма препарата рассматривается в качестве средства для длительного применения [134].

Сегодня липосомы и полимерные наночастицы представляют собой две эффективные системы доставки лекарственных препаратов. В табл. 16.3 перечислены некоторые противоопухолевые средства, полученные с помощью нанотехнологий.

Таблица 16.3

**Химиотерапевтические препараты,
созданные с применением нанотехнологических подходов***

Лекарство	Название продукта	Применение	Статус	Производитель
Липосомы				
Даунорубин	DaunoXome	Саркома Капоши	В продаже	Gilead Sciences
Доксорубин	Доксил	Рак яичников, рецидив рака молочной железы	В продаже	ALZA
Цитарабин		Лимфоматозный менингит	В продаже	DepoCyt SkyePharma
Липосомальная вакцина BLP25		Немелкоклеточный рак легкого. Фаза III		Biomira Inc.
Винкристин	Marqibo	Неходжкинская лимфома. Фаза II		Index Pharmaceuticals
Лурботекан	NX211	Рак яичников. Фаза II		Gilead Sciences
Иринотекан-HCl + флоксурин	CombiPlex	Прогрессирующий колоректальный рак. Фаза II		Celator Pharmaceuticals
TLK199 HCl	Telintra	Миелодиспластический синдром. Фаза II		Telik
Аннамицин		Лимфобластный лейкоз. Фаза II		Callisto Pharmaceuticals
Винорелбин		Солидные опухоли. Фаза I		Hana Biosciences
Оксалиплатин	MBP-426	Метастазирующие солидные опухоли. Фаза I		Mebiopharm

Окончание табл. 16.3

Лекарство	Название продукта	Применение	Статус	Производитель
Иринотекан	IHL-305	Солидные опухоли. Фаза I		Yakul
Доксорубин	ThermoDox	Рак молочной железы и печени. Фаза I		Celsion
Полимерные наночастицы				
Паклитаксел	Abraxane	Лечение рака	В продаже	Abraxis BioSciences
Паклитаксел	Genexol	Немелкоклеточный рак легкого. Фаза II		Samyang
Цисплатин	Nanoplatin	Лечение разных видов рака. Фаза I		NanoCarrier

*Данные на 2007 г.

16.5. Заключение

Интеграция нанотехнологических подходов в область диагностики и лечения рака происходит чрезвычайно быстро. Развитие новых технологий направлено на повышение эффективности терапии онкологических заболеваний.

Нанодиагностические методы уже дают хорошие результаты *in vitro*, однако путь к внедрению нанотехнологии в диагностику *in vivo* непрост, что связано с наличием системных токсических проявлений. В настоящее время ведутся активные исследования по изучению возможностей целевой доставки лекарств, и получаемые препараты, несомненно, внесут большой вклад в развитие клинических методов лечения злокачественных опухолей.

Нанотехнология — быстро развивающаяся область знаний, поэтому новые достижения в этой сфере позволят найти эффективные подходы в диагностике и терапии рака.

Литература

1. Cancer facts and figures. 2006. Available at <http://www.cancer.org/downloads/STT/CAFF2006PWSecured.pdf>.
2. Parkin M.D., Bray F., Ferlay J., Pisani P. Global cancer statistics, 2002. CA Cancer J. Clin. 2005; 55: 74–108.
3. Jain K.K. Nanodiagnosics: application of nanotechnology in molecular diagnostics. Expert. Rev. Mol. Design 2003; 3: 153–61.
4. Available at <http://www.ufscc.ufl.edu/Patient/content.aspx?section = testingid = 31382>.
5. Jain K.K. Nanotechnology in clinical laboratory diagnostics. Clin. Grim. Acta 2005; 358: 37–54.

6. Griswold D.P. Jr., Harrison S.D. Jr. *Cancer Metastasis Rev.* 1991; 10: 255–261.
7. Workman P., Lewis A.D., Caaseate F. Alkylating agents and related drugs. In: Peckham M., Pinedo H.M., Veronesi U., editors. *Oxford Textbook of Oncology. Volume 1.* Oxford: Oxford University Press; 1995; 495–504.
8. Moscow J.A., Cowan K.H. Multidrug resistance. *J. Natl. Cancer Inst.* 1988; 80: 14–20.
9. Shazib P. Anti-cancer drugs of today and tomorrow: are we close to making the turn from treating to curing cancer? *Curr. Pharm. Design* 2002; 8: 1723–1734.
10. Northfelt D.W., et al. Doxorubicin encapsulated in liposomes containing surface-bound polyethylene glycol: pharmacokinetics, tumor localization, and safety in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *J. Clin. Pharmacol.* 1996; 36: 55–63.
11. Katzung B.G., Section I: basic principles In: Katzung B.G., editor. *Basic and Clinical Pharmacology.* East Norwalk: Prentice-Hall international, Inc.; 1992;. 4–5.
12. Terwogt M.M.M., Schellens J.H.M., ten Bokkel Huinink W.W., Beijnen J.H. Clinical pharmacology of anticancer agents in relation to formulation and administration routes. *Cancer Treat. Rev.* 1999; 25: 83–101.
13. Cavalheiro S. Use of interferon alpha in intratumoral chemotherapy for cystic cranio-pharyngioma. *Childs Nerv. Syst.* 2005; 21: 719–24.
14. Available at http://nano.cancer.gov/about_alliance/q-and-a.asp#3 (visited 09/20/06).
15. Bruchez M. Jr., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998; 281: 2013–2016.
16. Seydel C. Quantum dots get wet. *Science* 2003; 300: 80–81.
17. Kim S., Fisher B., Elisler H.J., Bawendi M. Type II quantum dots: CdTe/CdSe (core/shell) and CdTe/ZnTe(core/shell) hetrostructures. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 11466–11467.
18. Andrew M.S., Shivang D., Shuming N., Lawrence T., Xiaohu G. Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6: 231–244.
19. Qu L., Peng X. Control of photoluminescence properties of CdSe nanocrystals in growth. *J. Am. Chem. Soc.* 2002; 124: 2049–2055.
20. Bruchez M., Moronne M., Gin P., Weiss S., Alivisatos A.P. Semiconductor nanocrystals as fluorescent biological labels. *Science* 1998; 281: 2013–2016.
21. Han My G.X., Su J.Z., Nie S. Quantum-dot-tagged microbeads for multiplexed optical coding of biomolecules. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: 631–635.
22. Gerion D., et al. Room-temperature single-nucleotide polymorphism and multi-allele DNA detection using florescent nanocrystals and microarrays. *Anal. Chem.* 2003; 75: 4766–4772.
23. Li Z., et al. ImmunoXuoresent labeling of cancer cells with quantum dots synthesized in aqueous solution. *Anal. Biochem.* 2006; 354: 169–174.
24. Weissleder R.A. Clearer vision of *in vivo* imaging. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: 316–317.
25. Gao X.H., Cui Y.Y., Levenson R.M., Chung L.W.K., Nie S.M. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 969–976.
26. Akerman M.E., Chan W.C., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. Nanocrystal targeting *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 12617–12621.
27. Hirsch L.R., et al. Nanoshell mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 3549–13554.
28. Cuenca A.G., et al. Emerging implications of nanotechnology on cancer diagnostics and therapeutics. *Cancer* 2006; 107: 459–466.
29. Wang Y., et al. Photoacoustic tomography of a nanoshell contrast agent in the *in vivo* rat brain. *Nano Lett.* 2004; 4: 1689–1692.

30. Loo C., Lowery A., Halas N., West J., Drezek R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett.* 2005; 5: 709–711.
31. Barton J.K., Halas N.J., West J.L., Drezek R. Nanoshells as an optical coherence tomography contrast agent. In: Tuchin V.V., Izatt J.A., Fujimoto J.G. editors. *Coherence Domain Optical Methods and Optical Coherence Tomography in Biomedicine VIII*. Proc SPIE: 2004; 5316: 99–106.
32. Wu C., Liang X., Jiang H. Metal nanoshells as a contrast agent in near infra-red diffuse optical tomography. *Opt. Commun.* 2005; 253: 214–221.
33. Sengupta S., et al. Temporal targeting of tumour cells and neovasculature with a nanoscale delivery system. *Nature* 2005; 436: 568–572.
34. O'Neal D.P., Hirsch L.R., Halas N.J., Payne J.D., West J.L. Photothermal tumor ablation in mice using near infrared absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* 2004; 209: 171–176.
35. Hirsch L.R., et al. Nanoshell mediated near-infrared thermal therapy of tumors under magnetic resonance guidance. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 13549–13554.
36. Hirsch L.R., Jackson J.B., Lee A., Halas N.J., West J.L. A whole blood immunoassay using gold nanoshells. *Anal. Chem.* 2003; 75: 2377–2381.
37. Paciotti G.F., et al. Colloidal gold: a novel nanoparticle vector for tumor directed drug delivery. *Drug Deliv.* 2004; 11: 169–183.
38. Copland J.A. et al. Bioconjugated gold nanoparticles as a molecular based contrast agent: implications for imaging of deep tumors using optoacoustic tomography. *Mol. Imaging Biol.* 2004; 6: 341–349.
39. Hainfeld J.F., Slatkin D.N., Smilowitz H.M. The use of gold nanoparticles to enhance radiotherapy in mice. *Phys. Med. Biol.* 2004; 49: N309–N315.
40. Hazarika P., Ceyhan B., Niemeyer C.M. Reversible switching of DNA-gold nanoparticle aggregation. *Angew. Chem. Int.* 2004; 43: 6469–6471.
41. Sokolov K. et al. Real-time vital optical imaging of precancer using anti-epidermal growth factor receptor antibodies conjugated to gold nanoparticles. *Cancer Res.* 2003; 63: 1999–2004.
42. Copland J.A., et al. Bioconjugated gold nanoparticles as a molecular based contrast agent: implications for imaging of deep tumors using optoacoustic tomography. *Mol. Imaging Biol.* 2004; 6: 341–349.
43. O'Neal DP, Hirsch LR, Halas NJ, Payne JD, West JL. Photo-thermal tumor ablation in mice using near infrared absorbing nanoparticles. *Cancer Lett.* 2004; 209: 171–176.
44. Lapotko D., Lukianova E., Potapnev M., Aleinikova O., Oraevsky A. Method of laser activated nano-thermolysis for elimination of tumor cells. *Cancer Lett.* 2006; 239: 36–45.
45. El-Sayed I.H., Huang X., El-Sayed M.A. Selective laser photo-thermal therapy of epithelial carcinoma using anti-EGFR antibody conjugated gold nanoparticles. *Cancer Lett.* 2006; 239: 129–135.
46. Jackson R.A. Nanosphere readies Verigene system for commercialization. *Nanobiotech. News* 2005; 3: 1–2.
47. Weissleder R., et al. Ultrasmall superparamagnetic iron oxide: characterization of a new class of contrast agents for MR imaging. *Radiology* 1990; 175: 489–493.
48. Michel S.C., et al. Preoperative breast cancer staging: MR imaging of the axilla with ultrasmall superparamagnetic iron oxide enhancement. *Radiology* 2002; 225: 527–536.
49. Saksena M.A., Saokar A., Harisinghani M.G. Lymphotropic nanoparticle enhanced MR imaging (LNMRI) technique for lymph node imaging. *Eur. J. Radio* 2006; 58: 367–374.

50. Nguyen B.C., et al. Multicenter clinical trial of ultrasmall superparamagnetic iron oxide in the evaluation of mediastinal lymph nodes in patients with primary lung carcinoma. *J. Magn. Reson. Imaging* 1999; 10: 468–473.
51. Harisinghani M.G., et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 2491–2499.
52. Rockall A.G., et al. Diagnostic performance of nanoparticle-enhanced magnetic resonance imaging in the diagnosis of lymph node metastases in patients with endometrial and cervical cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 2813–2821.
53. Gregoriadis G. Targeting of drugs: implications in medicine. *Lancet* 1981; II: 241–246.
54. Juliano R., Stamp D. The effect of particle size and charge on the clearance rates of liposomes and liposome encapsulated drugs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1975; 63: 651–658.
55. Poste G., et al. Analysis of the fate systemically administered liposomes and implications for their use in drug delivery. *Cancer Res.* 1982; 42: 1412–1422.
56. Hwang K.J., et al. Uptake of small liposomes by non-reticuloendothelial tissues. *Biochim. Biophys. Acta* 1987; 901: 88–96.
57. Gabizon A., Papahadjopoulos D. Liposome formulations with prolonged circulation time in blood and enhanced uptake by tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1988; 85: 6949–6953.
58. Klibanov A.L., Maruyama K., Torchilin V.P., Huang L. Amphipatic polyethyleneglycols effectively prolong the circulation time of liposomes. *FEBS Lett.* 1990; 268: 235–238.
59. Blume G., Cevc G. Molecular mechanism of the lipid vesicle longevity *in vivo*. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1146: 157–168.
60. Gabizon A. Pegylated liposomal doxorubicin: metamorphosis of an old drug into a new form of chemotherapy. *Cancer Invest.* 2001; 19: 424–436.
61. Gabizon A., Shmeeda H., Barenholz Y. Pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin review of animal and human studies. *Clin. Pharmacokinet.* 2003; 42: 419–436.
62. Hobbs S.K., et al. Regulation of transport pathways in tumor vessels: role of tumor type and microenvironment. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 4607–4612.
63. Hashizume H., et al. Openings between defective endothelial cells explain tumor vessel leakiness. *Am. J. Pathol.* 2000; 156: 1363–1380.
64. Yuan F., et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: molecular size dependence and cutoff size. *Cancer Res.* 1995; 55: 3752–3756.
65. Von Ho D.D., et al. Risk factors for doxorubicin-induced congestive heart failure. *Ann. Intern. Med.* 1979; 91: 710–717.
66. Torti F.M., et al. Reduced cardiotoxicity of doxorubicin delivered on a weekly schedule. *Ann. Intern. Med.* 1999; 99: 745–749.
67. Legha S.S., et al. Reduction of doxorubicin cardiotoxicity by prolonged continuous intravenous infusion. *Ann. Intern. Med.* 1982; 96: 133–139.
68. Working P.K., Dayan A.D. Pharmacological—toxicological expert report. CAELYX. (Stealth liposomal doxorubicin HC1). *Hum. Exp. Toxicol.* 1996; 15: 751–785.
69. Lasic D.D., Frederik P.M., Stuart M.C., Barenholz Y., Mcintosh T.J. Gelation of liposome interior: a novel method for drug encapsulation. *FEBS Lett.* 1992; 312: 255–258.
70. Lasic D.D., et al. Transmembrane gradient driven phase transitions within vesicles: lessons for drug delivery. *Biochim. Biophys. Acta* 1995; 1239: 145–156.

71. Haran G., Cohen R., Bar L.K., Barenholz Y. Transmembrane ammonium sulfate gradients in liposomes produce efficient and stable entrapment of amphipathic weak bases. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1151: 201–215.
72. Gabizon A. Liposomal anthracyclines. *Hematol. Oncol. Clin. North. Am.* 1994; 8: 431–450.
73. Gabizon A.A., et al. Prolonged circulation time and enhanced accumulation in malignant exudates of doxorubicin encapsulated in polyethylene-glycol coated liposomes. *Cancer Res.* 1994; 54: 987–992.
74. Symon Z., et al. Selective delivery of doxorubicin to patients with breast carcinoma metastases by Stealth liposomes. *Cancer* 1999; 86: 72–78.
75. Gabizon A., Martin F. Polyethylene-glycol-coated (Pegylated) liposomal doxorubicin-rationale for use in solid tumors. *Drugs* 1997; 54: 15–21.
76. Gabizon A, et al. Long-circulating liposomes for drug delivery in cancer therapy: a review of biodistribution studies in tumor bearing animals. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 1997; 24: 337–344.
77. Uziely B., et al. Liposomal doxorubicin: antitumor activity and unique toxicities during two complementary phase I studies. *J. Clin. Oncol.* 1995; 13: 1777–1785.
78. Berry G., et al. The use of cardiac biopsy to demonstrate reduced cardiotoxicity in AIDS Kaposi's sarcoma patients treated with pegylated liposomal doxorubicin. *Ann. Oncol.* 1998; 9: 711–716.
79. Muggia F.M., et al. Phase II study of liposomal doxorubicin in refractory ovarian cancer: antitumor activity and toxicity modification by liposomal encapsulation. *J. Clin. Oncol.* 1997; 15: 987–93.
80. Available at <http://www.clinicaltrials.gov> (visited 09/20/06).
81. Amantea M.A., Forrest A., Northfelt D.W., Mamelok R. Population pharmacokinetics and pharmacodynamics of pegylated-liposomal doxorubicin in patients with AIDS-related Kaposi's sarcoma. *Clin. Pharmacol. Ther.* 1997; 61: 301–311.
82. Lyass O., et al. Correlation of toxicity with pharmacokinetics of pegylated liposomal doxorubicin (Doxil) in metastatic breast carcinoma. *Cancer* 2000; 89: 1037–1047.
83. Safra T., et al. Pegylated liposomal doxorubicin (doxil): reduced clinical cardiotoxicity in patients reaching or exceeding cumulative doses of 500 mg/m². *Ann. Oncol.* 2000; 11: 1029–1033.
84. Hamilton A., et al. EORTC 10968: a phase I clinical and pharmacokinetic study of polyethylene glycol liposomal doxorubicin (Caelyx®, Doxil®) at a 6-week interval in patients with metastatic breast cancer. *Ann. Oncol.* 2002; 13: 910–918.
85. Malawer M.M., Link M.P., Donaldson S.S. Sarcomas of bone. In: Devita V.T., Hellman S., Rosenberg S.A., editors. *Cancer Principles and Practice of Oncology*. 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven; 1997; 789–852.
86. Hacker M.P., Toxicity of platinum-based anticancer drugs. In: Powis G., Hacker M.P., editors. *The Toxicity of Anticancer Drugs*. N-Y: McGraw-Hill; 1991; 82–115.
87. Schilder R.J., et al. Phase I and pharmacokinetic study of ormaplatin (tetraplatin, NSC 363812) administered on a day 1 and 8 schedule. *Cancer Res.* 1994; 54: 709–717.
88. Thamm D.H., Vail D.M. Preclinical evaluation of a sterically stabilized liposome-encapsulated cisplatin in clinically normal cats. *Am. J. Vet. Res.* 1998; 59: 286–289.
89. Working P.K., et al. Comparative intravenous toxicity of cisplatin solution and cisplatin encapsulated in long-circulating, pegylated liposomes in cynomolgus monkeys. *Toxicol. Sci.* 1998; 46: 155–165.

90. Vail D.M., et al. STEALTH liposome-encapsulated cisplatin (SPI-77) versus carboplatin as adjuvant therapy for spontaneously arising osteosarcoma (OSA) in the dog: a randomized multicenter clinical trial. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002; 50: 131–136.
91. Terwogt J.M.M., et al. Phase I and pharmacokinetic study of SPI-77, a liposomal encapsulated dosage form of cisplatin. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002; 49: 201–210.
92. Kim E.S., et al. A phase II study of STEALTH cisplatin (SPI-77) in patients with advanced non-small cell lung cancer. *Lung cancer* 2001; 34: 427–432.
93. Carbone P.P., Bono V., Frei E. 3rd, Brindley C.O. Clinical studies with vincristine. *Blood* 1963; 21: 640–647.
94. Haim N., et al. Full dose vincristine (without 2-mg dose limit) in the treatment of lymphomas. *Cancer* 1994; 73: 2515–2519.
95. Ronghe M., Burke G.A., Lowis S.P., Estlin E.J. Remission induction therapy for childhood acute lymphoblastic leukaemia: clinical and cellular pharmacology of vincristine, corticosteroids, L-asparaginase and anthracyclines. *Cancer Treat. Rev.* 2001; 27: 327–337.
96. Owellen R.J., Root M.A., Hains F.O. Pharmacokinetics of vindesine and vincristine in humans. *Cancer Res.* 1977; 37: 2603–2607.
97. Gidding C.E., et al. Vincristine pharmacokinetics after repetitive dosing in children. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1999; 44: 203–209.
98. Crom W.R., et al. Pharmacokinetics of vincristine in children and adolescents with acute lymphocytic leukemia. *J. Pediatr.* 1994; 125: 642–649.
99. Webb M.S., Bally M.B., Mayer L.D. Sphingosomes for enhanced drug delivery. US Patent 5,543,152. 1996.
100. Krishna R., Webb M.S., St. Onge G., Mayer L.D. Liposomal and nonliposomal drug pharmacokinetics after administration of liposome-encapsulated vincristine and their contribution to drug tissue distribution properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 298: 1206–1212.
101. Boman N.L., Tron V.A., Bally M.B., Cullis P.R. Vincristine-induced dermal toxicity is significantly reduced when the drug is given in liposomes. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 1996; 37: 351–355.
102. Krishna R., Webb M.S., Onge G.St., Mayer L.D. Liposomal and nonliposomal drug pharmacokinetics after administration of liposome-encapsulated vincristine and their contribution to drug tissue distribution properties. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2001; 298: 1206–1212.
103. Semple S.C., et al. Optimization and characterization of a sphingomyelin/cholesterol liposome formulation of vinorelbine with promising antitumor activity. *J. Pharm. Sci.* 2005; 94: 1024–1038.
104. Murry D.J., Blaney S.M. Clinical pharmacology of encapsulated sustained-release cytarabine. *Ann. Pharmacother.* 2000; 34: 1173–1178.
105. Howell S.B. Clinical applications of a novel sustained-release injectable drug delivery system: DepoFoam technology. *Cancer J.* 2001; 7: 219–227.
106. Neil G., Dean J., Jean-Claude B. Potentiation of melanoma vaccine immunogenicity by interleukin 2 liposomes. *Vaccine Res.* 1994; 3: 83–92.
107. Bergers, J.J., Den Otter W., Crommelin D.J.A. Vesicles for tumour-associated antigen presentation to induce protective immunity: preparation, characterization and enhancement of the immune response by immunomodulators. *J. Control Rel.* 1994; 29: 317–327.

108. Joep J.B., Den Otter W., Crommelin D.J.A. Liposome-based cancer vaccines. *J. Liposome Res.* 1996; 6: 339–355.
109. Guan H.H., et al. Liposomal formulations of synthetic MUC1 peptides: effects of encapsulation versus surface display of peptides on immune responses. *Bioconjug. Chem.* 1998; 9: 451–458.
110. Samuel J., et al. Immunogenicity and antitumor activity of a liposomal MUC1 peptide-based vaccine. *Int. J. Cancer.* 1998; 75: 295–302.
111. North S., Butts C. Vaccination with BLP25 liposome vaccine to treat non-small cell lung and prostate cancers. *Exp. Rev. Vaccines* 2005; 4: 249–257.
112. North S.A., Graham K., Bodnar D., Venner P. A pilot study of the liposomal MUC1 vaccine BLP25 in prostate specific antigen failures after radical prostatectomy. *J. Urol.* 2006; 176: 91–95.
113. Butts C., et al. Randomized phase IIB trial of BLP25 liposome vaccine in stage IIIB and IV non-small-cell lung cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 6674–6681.
114. Zou Y., Ling Y.H., Van N.T., Priebe W., Perez-Soler R. Antitumor activity of free and liposome-entrapped annamycin, a lipophilic anthracycline antibiotic with non-cross-resistance properties. *Cancer Res.* 1994; 54: 1479–1484.
115. Zou Y., Priebe W., Perez-Soler R. Submicron liposome Suspensions obtained from preliposome lyophilizates. 1999; US Patent 5,902,604. 1999.
116. Zou Y., Priebe W., Stephens L.C., Perez-Soler R. Preclinical toxicity of liposome-incorporated annamycin: selective bone marrow toxicity with lack of cradiotoxicity. *Clin. Cancer Res.* 1995; 1: 1369–1374.
117. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Release* 2001; 70: 1–20.
118. Crown J., O'Leary M. The taxanes: an update. *Lancet* 2000; 355: 1176–1178.
119. Eisenhauer E.A., et al. European—Canadian randomized trial of paclitaxel in relapsed ovarian cancer: high-dose versus low-dose and long versus short infusion. *J. Clin. Oncol.* 1994; 12: 2654–2666.
120. Smith R.E., et al. Randomized trial of 3-hour versus 24-hour infusion of high-dose paclitaxel in patients with metastatic or locally advanced breast cancer: national surgical adjuvant breast and bowel project Protocol B-26. *J. Clin. Oncol.* 1999; 17: 3403–3411.
121. Wiernik P.H., et al. Phase I trial of taxol given as a 24-hour infusion every 21 days: responses observed in metastatic melanoma. *J. Clin. Oncol.* 1987; 5: 1232–1239.
122. Socinski, M.A., et al. Phase I trial of a 96 h paclitaxel infusion with filgrastim support in refractory solid tumor patients. *Anticancer Drugs* 1998; 9: 611–619.
123. Dorr, R.T., et al. Pharmacology and toxicology of Cremophor EL diluent. *Ann. Pharmacother.* 1994; 28: S11–S14.
124. Weiss R.B., et al. Hypersensitivity reactions from taxol. *J. Clin. Oncol.* 1990; 8: 1263–1268.
125. Rowinsky E.K., Donehower R.C. Paclitaxel (taxol). *N. Eng. J. Med.* 1995; 332: 1004–1014.
126. Desai N.P., et al. Protein stabilized pharmacologically active agents, methods for the preparation thereof and methods for the use thereof; US Patent 5,916,596. 1999.
127. Ibrahim N.K., et al. Phase I and Pharmacokinetic Study of ABI-007, a cremophor-free, protein-stabilized, nanoparticle formulation of paclitaxel. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 1038–1044.
128. Ibrahim N.K., et al. Multicenter phase II trial of ABI-007, an albumin-bound paclitaxel, in women with metastatic breast cancer. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 6019–6026.

129. Gradishar et al. Superior efficacy of nanoparticle albumin-bound paclitaxel (Abraxane, ABI-007) compared with cremophor-based paclitaxel (Taxol) in women with metastatic breast cancer: Results of a phase III trial. *J. Clin. Oncol.* 2005; 23: 7794–7803.
130. Aliabadi H.M., Lavasanifar A. Polymeric micelles for drug delivery. *Expert Opin. Drug Deliv.* 2006; 3: 139–162.
131. Kim S.C., Chang E.O., Song I.S., Pai C.M. Biodegradable polymeric micelle-type drug composition and method for the preparation thereof. US Patent 6,322,805. 2001.
132. Kim S.C., et al. *In vivo* evaluation of polymeric micellar paclitaxel formulation: toxicity and efficacy. *J. Control Release* 2001; 72: 191–202.
133. Kim T.Y., et al. Phase I and pharmacokinetic study of Genexol-PM, a cremophor-free, polymeric micelle-formulated paclitaxel, in patients with advanced malignancies. *Clin. Cancer Res.* 2004; 10: 3708–3716.
134. Uchino H., et al. Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats. *Br. J. Cancer* 2005; 19 93, 678–687.

КЛИНИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ БИОЛОГИЧЕСКИХ МИКРО- И НАНОСЕНСОРОВ

Дэвид В. Г. Моррисон, Мехмет Р. Докмеси, Уткан Демирси
и Али Хадемхоссейни

17.1. Введение

Возможность высокочувствительного и специфичного определения патогенных и физиологически нормальных молекул чрезвычайно важна для ранней диагностики и лечения заболеваний. Ранняя диагностика значительно снижает затраты на уход за пациентами. Расходы на лечение больных раком и диабетом на поздних стадиях заболевания оцениваются в ~75 и ~90 млрд долларов США соответственно [1, 2].

В настоящее время рак можно диагностировать путем определения концентрации некоторых антигенов в крови или других жидкостях, а также при исследовании тканей.

Диабет определяют на основании изменения концентрации глюкозы в крови. Однако данные методы клинической диагностики имеют ряд ограничений. Например, отдельные устройства обладают длительным временем отклика, а некоторые процедуры тяжело переносятся пациентами. К тому же многие исследования дороги и ежегодно обходятся системе здравоохранения в миллиарды долларов. Следовательно, существует острая необходимость создания более эффективных и надежных диагностических методов.

Биосенсорами называют аналитические устройства, основанные на биологических принципах распознавания искомым молекул или макромолекул. Их обычно совмещают с физико-химическими преобразователями, превращающими акт биологического узнавания в регистрируемый выходной сигнал [3]. Как правило, сенсоры состоят из трех основных частей: 1) детектора, определяющего возмущение; 2) преобразователя, конвертирующего возмущение в выходной сигнал; 3) системы амплификации и визуализации сигнала в соответствующем формате [3].

Одним из первых исследований биосенсоров была работа Кларка и Лайона, опубликованная в 1962 г. [4]. В ней описывалось использование глюкозооксидазы для амперометрического определения концентрации кислорода. Катализируемое ферментом окисление глюкозы снижало давление кислорода в тестируемом растворе, которое регистрировалось электродом. Было показано, что падение давления кислорода пропорционально снижению концентрации глю-

козы в образце. К первым примерам использования живых клеток в качестве биосенсоров относится опубликованная в 1977 г. работа Рехница с сотрудниками [5], которые закрепляли клетки *Streptococcus faecium* на поверхности чувствительного к аммиаку мембранного электрода. С помощью электрода Рехница обнаруживали аминокислоту аргинин.

Внедрение микро- и нанотехнологий в биологические науки создает все условия для появления следующего поколения биосенсоров с высокой чувствительностью и более низкой стоимостью [6]. Такие технологии могут быть основаны на дальнейшей миниатюризации традиционного микропроцесса, применяющегося в микроэлектронике [7].

Современные биосенсоры могут в значительной степени повысить эффективность методов определения чужеродных частиц и токсинов и привести к созданию более дешевых, быстрых и простых в обращении аналитических устройств. Кроме того, микросенсоры легче сделать переносными, что позволяет выполнять анализ в удобном для врача и пациента месте.

В данной главе кратко описаны различные типы биосенсоров и рассмотрены возможности их применения для диагностических исследований *in vivo* и *in vitro*. Также обсуждается применение микро- и нанотехнологий для создания новых биосенсорных устройств и анализируются существующие и потенциально возможные клинические приложения данных технологий.

17.2. Типы биосенсоров

17.2.1. Классификация по механизму передачи биологического сигнала

Биосенсоры можно классифицировать либо по механизму передачи сигнала, либо по способу его преобразования. В описываемых устройствах используются пять основных механизмов передачи сигнала (рис. 17.1), которые обсуждаются ниже.

а) *Антиген–антитело*. В основе работы таких сенсоров лежит высокая специфичность взаимодействия антигенов с антителами. При этом все неспецифические взаимодействия должны быть сведены к минимуму [8]. Связывание можно регистрировать либо с помощью флуоресцентной метки, либо по изменению показателя преломления или отражательной способности среды [9].

б) *Ферменты*. В биосенсорах на основе ферментов используют каталитическую активность и способность активных центров ферментов распознавать и связывать молекулы субстрата. Продукт ферментативной реакции можно регистрировать напрямую или путем сопряжения с индикаторной реакцией [9]. Каталитическая активность ферментов позволяет определять гораздо более низкие концентрации веществ, чем традиционные методы. Действие системы зависит от сохранения нативной структуры белка [10].

в) *Нуклеиновые кислоты*. Работа биосенсоров этого класса зависит от принципа комплементарности между аденозином–тиминим и цитозином–гуанозином в составе ДНК. Данные сенсоры способны обнаруживать следовые количества

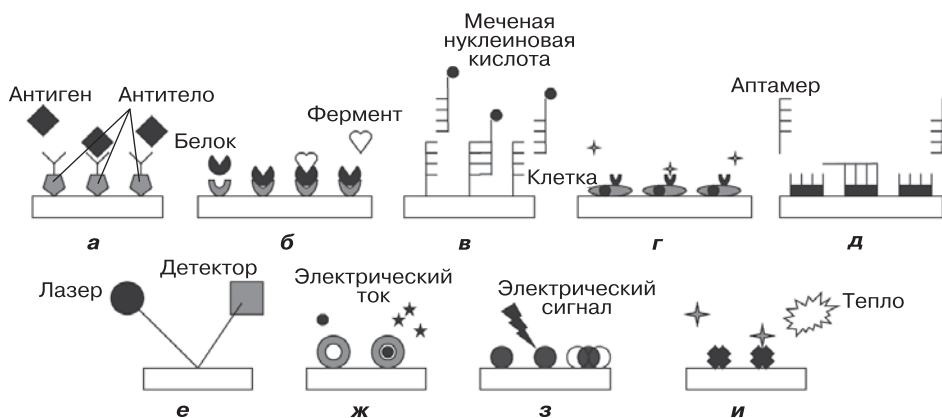


Рис. 17.1. Классификация биосенсоров для детекции *in vitro*. По механизму передачи сигнала: *а* — антиген–антитело; *б* — ферментативный катализ; *в* — нуклеиновые кислоты; *г* — клеточный механизм; *д* — биомиметики. По механизму преобразования сигнала: *е* — оптический; *ж* — электрохимический; *з* — масс-чувствительный; *и* — тепловой

микроорганизменной ДНК путем ее сравнения с комплементарной ДНК известной последовательности [8]. После разделения нитей ДНК-мишени, добавления ДНК-зонда и отжига обеих последовательностей происходит гибридизация зонда на комплементарной последовательности [10]. Если зонд несет флуоресцентную метку, за ходом гибридизации следят с помощью микроскопа. Для более точного анализа часто применяют полимеразную цепную реакцию (ПЦР), которая позволяет получать множество копий ДНК из исходного образца.

г) *Живые клетки*. В целях определения специфических молекул или «общего состояния» окружающей среды иногда используют биосенсоры на основе микроорганизмов, например бактерий или грибов [10]. Метаболизм, жизнеспособность, дыхание клеток или биолюминесценция могут служить индикаторами при детекции тяжелых металлов [10], а присутствующие в клетках белки используют в качестве рецепторов для определения специфических аналитов [11, 12].

д) *Биомиметики*. Биосенсоры-биомиметики — искусственно созданные сенсоры, имитирующие функцию биосенсоров на основе живых структур. К этому классу относятся аптасенсоры, где в качестве биокомпонента применяются аптамеры — синтетические последовательности нуклеиновых кислот, синтезируемых для распознавания аминокислотных последовательностей, олигосахаридов, пептидов и белков [8, 13].

17.2.2. Классификация по способу преобразования сигнала

Биосенсоры также можно классифицировать в соответствии с методом преобразования сигнала. Обычно в сенсорах применяется один из перечисленных ниже механизмов преобразования.

а) *Оптический*. Этот метод используется в биосенсорах, функционирующих в разных видах спектроскопии: адсорбционной, флуоресцентной, фосфоресцентной, рамановской, поверхностно-усиленной рамановской, отражательной или дисперсионной [8]. С помощью данных спектральных методов можно измерять различные параметры сигнала, например энергию, поляризацию, амплитуду, время распада или фазу. Чаще всего анализ основывается на определении амплитуды сигнала, поскольку ее легко связать с концентрацией анализируемого вещества [8].

б) *Электрохимический*. Электрохимические биосенсоры применяются для измерения силы тока, образующегося в результате окислительно-восстановительных реакций. Сила тока коррелирует либо с концентрацией электрически активных частиц, присутствующих в системе, либо со скоростью их образования или потребления [8].

в) *Масс-чувствительный*. Биосенсоры, относящиеся к этой группе, реагируют на небольшие изменения массы, вызванные химическим связыванием с мелкими пьезокристаллами. Сначала на кристаллы подается электрический сигнал, заставляющий их вибрировать с определенной частотой. Она зависит от частоты электрического сигнала и массы кристаллов. Поэтому связывание анализируемого вещества, увеличивающее массу кристаллов, изменяет частоту осцилляций, что используется при определении массы аналита [10].

г) *Тепловой*. С помощью данных биосенсоров измеряют изменение температуры, происходящее в результате ферментативной реакции с участием анализируемого вещества [14]. Оно сопряжено с количеством потребленного субстрата или количеством образовавшегося продукта.

17.3. Методы диагностики *in vitro*

Микро- и нанотехнологии могут применяться для эффективной диагностики и создания портативных диагностических устройств. Эти приборы широко используются в клинической практике, например для контроля уровня глюкозы в крови при диабете (около 85% от современного мирового производства биосенсоров) [15]. Далее мы рассмотрим примеры внедрения данных технологий.

17.3.1. Кантилеверные анализаторы

Определение взаимодействий между биомолекулами путем измерения механических сил в нанометровом диапазоне предоставляет уникальные возможности для создания высокочувствительных миниатюрных биологических сенсоров без применения радиоактивных материалов [16]. С помощью кантилеверного анализатора можно идентифицировать вещества по отклонению лазерного луча в результате взаимодействия с искомыми молекулами. Измеряя степень отклонения, вычисляют количество анализируемого вещества. Обычно используется один из трех способов преобразования полученного сигнала в микромеханическое отклонение кантилевера — отклонение в ответ на давление на поверхность, изменение массы или температуры [17] (рис. 17.2).

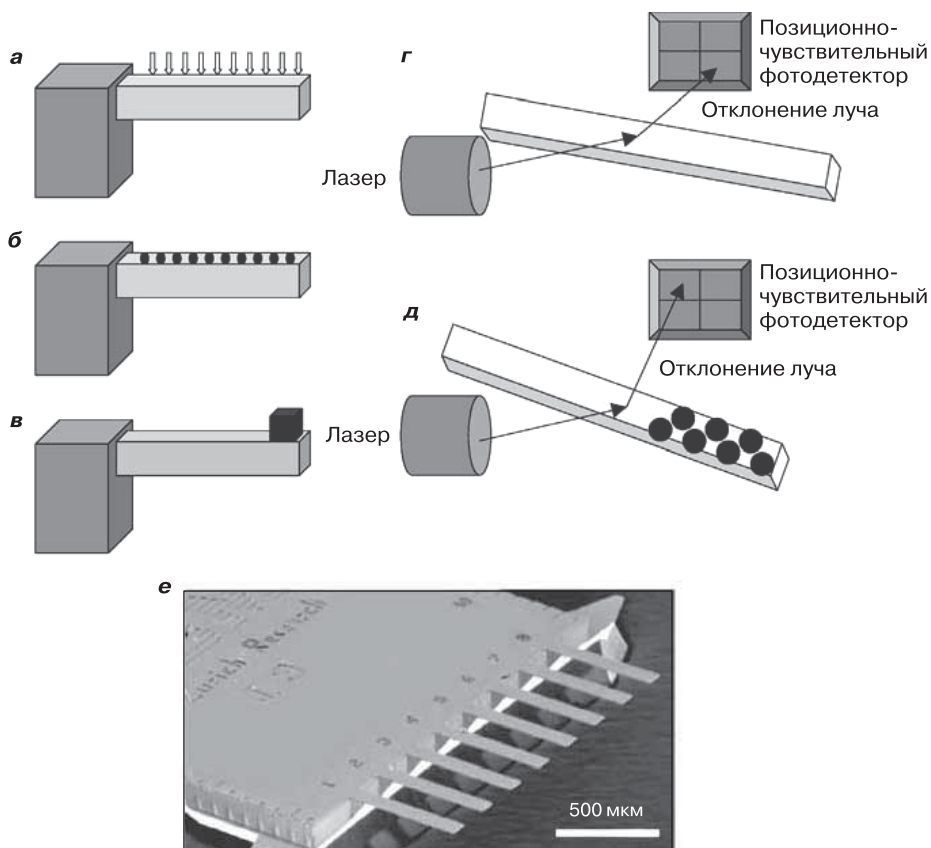


Рис. 17.2. Микрокантилеверы в качестве биосенсоров использующие различные датчики: *a* — тепловой; *б* — поверхностного отклика; *в* — массовый, а также оптические методы для измерения отклонения кантилевера: отклонение луча при нормальном положении кантилевера (*г*); отклонение луча после связывания анализируемого вещества с кантилевером (*д*); *е* — микрофотография биосенсора, состоящего из восьми силиконовых микрокантилеверов (воспроизводится в соответствии с [115] с разрешения авторов)

Отклонение лазерного луча, вызванное откликом поверхности на давление, обусловлено связыванием анализируемых молекул с одной из сторон кантилевера. Таким способом можно обнаружить молекулы стрептавидина и биотина, *L*-цистеина [18] и простатоспецифичного антигена [19]. Кроме того, для определения степени отклонения в нанометровом диапазоне используют увеличение массы кантилевера, поскольку оно влечет за собой изменение частоты осцилляций. Быстрые изменения температуры вокруг кантилевера также вызывают отклонение лазерного луча.

Изготовление кантилевера из различных материалов позволяет повысить его чувствительность. Чаще всего в промышленном производстве кантилеверов для микро- и наносенсорных устройств используются кремний, нитрид кремния и оксид кремния [17]. Хотя данные устройства чрезвычайно чувствительны, они не обладают химической или биологической специфичностью. Впрочем, обработка поверхности кантилевера биологическими молекулами, например пептидами, способными к самопроизвольному формированию монослоев, ДНК-зондами или антителами, позволяет создавать приборы, распознающие молекулы [20].

Измерение степени отклонения кантилевера можно производить оптическим, пьезорезистентным, пьезоэлектрическим или емкостным методами [21]. Измерение отклонения светового пучка — эффективный путь определения молекул при помощи кантилеверов с отражающей поверхностью [22]. В этом случае лазерный луч фокусируется на свободном крае кантилевера (обычно покрытом золотом), а отраженный луч регистрируется позиционно-чувствительным детектором (см. рис. 17.2) [22]. Для повышения чувствительности анализа при работе в нанодиапазоне используются методы переноса электронов и кантилеверы длиной несколько сотен нанометров [22].

При пьезорезистентном способе определения в кремниевый кантилевер помещают резистор, сопротивление которого изменяется при отклонении кантилевера [21]. У таких кантилеверов обычно есть две ножки, что позволяет измерять сопротивление борсодержающего канала путем соединения двух проводящих пластинок с базой кантилевера рядом с ножками.

Пьезоэлектрический метод регистрации предусматривает наличие на поверхности кантилевера пьезоэлектрического материала, например ZnO. При воздействии на материал возникает электрический потенциал, который можно измерить и соотнести с силой воздействия.

Емкостной метод основан на измерении сопротивления между металлической пластинкой на поверхности кантилевера и пластинкой, расположенной на анализируемой поверхности [22, 23]. Емкостное сопротивление обратно пропорционально расстоянию между анализируемой структурой и проводником на поверхности кантилевера. При отклонении кантилевера расстояние между его кончиком и анализируемой поверхностью меняется, что влечет за собой изменение сопротивления, соотносимого с изменением массы. Данный метод чрезвычайно чувствителен, но пригоден лишь для регистрации небольших сдвигов и не работает в жидких средах.

17.3.2. Клеточные и белковые чипы

Биосенсоры на основе живых клеток — интересная альтернатива обычным биосенсорам. Такие устройства способны повысить чувствительность и специфичность анализа [24]. Биосенсоры на основе живых клеток используются для определения неизвестных соединений и токсинов, поскольку действие таких молекул можно наблюдать непосредственно в тканях. В качестве примеров слу-

жат биосенсоры на основе клеток печени [25], сердечной мышцы [26–28] или иммунных клеток [29, 30]. Использование микро- и наноустройств позволяет имитировать функционирование клеток *in vitro* с целью создания более эффективных методов анализа и преобразования сигнала [31].

Пытаясь воспроизвести реакцию В-лимфоцитов, ответственных за гуморальный иммунитет, Райдер с соавторами показали, что иммуносенсоры можно создавать на основе клеточных чипов [24]. В-лимфоциты модифицировали таким образом, что они приобретали способность к распознаванию поверхностных белков некоторых патогенных организмов. За ходом реакции наблюдали по биолюминесценции кальций-чувствительного белка, экспрессирующегося искомыми клетками.

Были изготовлены биосенсоры на основе чипов, содержащих клетки различного фенотипа [32–34]. Так, был получен сенсор с В-клетками для определения аналитов и Т-клетками, преобразующими гуморальный иммунитет в регистрируемый сигнал.

Для конструирования биосенсора, работающего в режиме реального времени, Ким с соавторами использовали зависящее от дозы высвобождение кальция при стимуляции Т-клеточных рецепторов [29]. Путем введения в Т-клетки кальций-чувствительного красителя (*fura-2*) авторы получили возможность визуализировать Т-клеточный ответ на присутствие пептида от В-клеток.

Представляют интерес не только биосенсоры на основе клеточных чипов, но и аналогичные устройства на основе белковых чипов [35]. Как правило, биосенсоры на основе антител позволяют одновременно проводить несколько анализов [36]. Лиглер с соавторами сообщили о получении биосенсора, способного с помощью единственного чипа определять несколько веществ [37]. Для этого специфические молекулы иммобилизовали на поверхности оптического волновода на полосах, напоминающих штрих-коды. Каждая полоса «штрих-кода» связывает определенный аналит. Анализируемый образец наносили перпендикулярно расположению «штрих-кода» в проточной камере. В результате искомые молекулы аналита взаимодействовали с соответствующими участками чипа.

17.3.3. Наночастицы

Наночастицы ныне являются мощным и широко применяемым материалом для изготовления биосенсоров [38]. Связывание специфических молекул с поверхностью наночастиц позволяет изменять их биологические функции.

Достойным внимания продуктом внедрения нанотехнологии в область *in vitro* диагностики являются зонды, инкапсулированные путем биологически локализованного встраивания (PEBBLE). Зонды PEBBLE — полимерные частицы круглой формы и размером в несколько нанометров, сконструированные с целью проведения наименее инвазивного наблюдения за специфическими веществами в живых клетках. PEBBLE используются для анализа действия лекарств, токсинов и других внешних факторов на работу клетки в реальном времени [39–45]. Такие зонды обычно содержат краситель, чувствительный к аналиту, и контрольный краситель.

Путем инкапсулирования данных красителей в биологически инертную матрицу предотвращают их реакции с клеточными органеллами [46]. Хотя есть несколько вариантов PEBBLE [45, 47–49], чаще всего используют зонды с параллельным режимом анализа: присутствующие в клетке аналиты диффундируют сквозь матрицу PEBBLE (изготовленную из полиакриламида, полидецилметакрилата, золь–гель-материалов или модифицированных силикатов [46]) и взаимодействуют с красителями, заключенными в наночастицы. Реакция между анализируемым веществом и красителем вызывает конформационные изменения последнего, за которыми следят по изменению интенсивности излучения. Конформационным изменениям подвергается и краситель сравнения, интенсивность излучения которого также меняется. Соотношение между интенсивностью излучения обоих красителей позволяет правильно интерпретировать данные [46]. Золь-гелевую матрицу наночастиц PEBBLE можно модифицировать так, чтобы провести одновременное инкапсулирование гидрофобного и гидрофильного красителей [39]. Нагревая данные гели, получают оксиды высокой чистоты, которые затем взаимодействуют с чувствительными к кислороду красителями.

Путем инъекции данных наносенсоров в клетки С6-глиомы крысы удалось с высокой точностью и хорошей воспроизводимостью определить внутриклеточную концентрацию кислорода [49]. Этот пример иллюстрирует большой потенциал PEBBLE для детекции и количественного определения концентрации искомых веществ.

Другую группу наночастиц для исследований *in vitro* составляют квантовые точки (КТ) [50–53]. Квантовые точки — полупроводниковые кристаллы диаметром 2–10 нм, с уникальными электрическими и оптическими свойствами. КТ получают из нанокристаллов CdS, CdSe, CdTe или CdSe/ZnSe [54–57]. Замечательные оптические и электрические свойства КТ обусловлены квантово-механическим рассеянием электронов валентной оболочки центральной частью атомов [58], что возможно благодаря малому размеру квантовых точек. При возбуждении пучком фотонов данные наночастицы излучают яркий свет характерной частоты и поэтому используются для биоаналитических применений [52]. По сравнению с флуоресцентными метками КТ менее подвержены фотообесцвечиванию. Кроме того, они характеризуются длительным временем излучения и могут служить инструментом для эффективной визуализации клеток. Малый размер частиц и излучение света при различных фиксированных длинах волн позволяют одновременно проводить анализ нескольких веществ.

Некоторые примеры использования КТ рассматриваются в разд. 17.4.1.

17.4. Диагностика *in vivo*

Микро- и нанотехнологии находят применение для диагностики *in vivo*. Миниатюризация и модификация существующих приборов позволяют создавать новые устройства с меньшей стоимостью, отличающиеся большей эффективностью

и надежностью [34]. Например, способность отслеживать присутствие флуоресцентных наночастиц *in vivo* значительно повышает качество диагностики и лечения заболеваний.

В биосенсорах, работающих в системах *in vivo*, применяются два типа наночастиц: квантовые точки (КТ) и контрастные агенты для магнитно-резонансной томографии (МРТ).

17.4.1. Квантовые точки

Поверхность квантовых точек обычно модифицируют для повышения их биосовместимости, растворимости и функциональности (рис. 17.3) [59]. Поверхность квантовых точек модифицируют пептидами, антителами, нуклеиновыми кислотами или низкомолекулярными лигандами [59, 60]. КТ используются в качестве меток для клеток и тканей [61], длительного слежения за перемещением клеток и получения многоцветных изображений [62]. Для повышения биосовместимости КТ в их поверхность встраивают молекулы полиэтиленгликоля [60]. Дерфус с соавторами показали, что модифицированные КТ в комплексе с катионными липосомами можно использовать для мечения клеток HeLa [63].

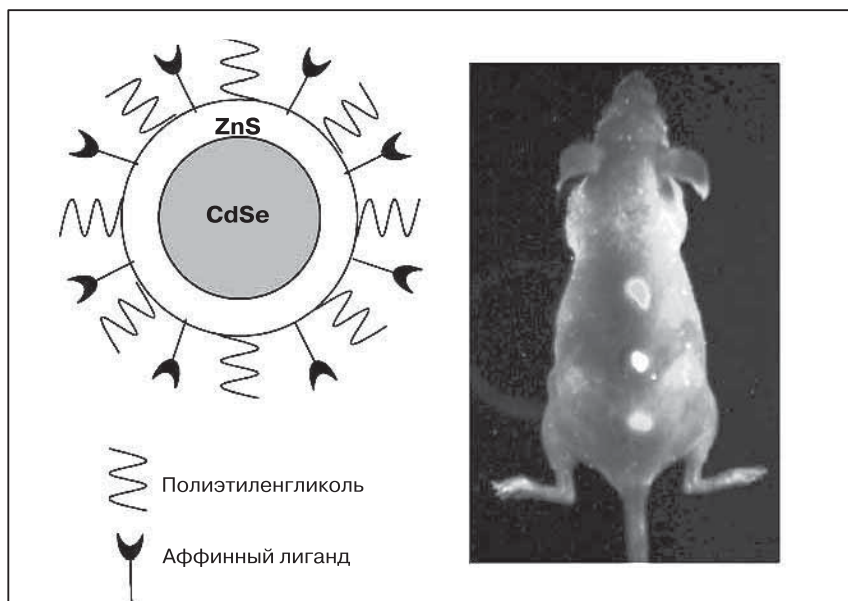


Рис. 17.3. Схема строения квантовой точки. Ядро из селенида кадмия покрыто оболочкой из сульфида цинка и полиэтиленгликоля, а также содержит аффинные лиганды, ковалентно связанные с поверхностью. На фотографии рядом показана возможность получения изображений КТ в условиях *in vivo*. Изображение получают путем возбуждения КТ вольфрамовой или ртутной лампой. Воспроизводится из [60] с разрешения авторов

17.4.2. Контрастные агенты для МРТ

Получение изображений методом МРТ с контрастными агентами — широко применяемый диагностический метод [64–66]. Контрастные агенты для МРТ приобретают все большую популярность в диагностике *in vivo* благодаря высокому пространственному разрешению [67]. Данные агенты обычно получают из оксида железа(II) или оксида железа(III) и покрывают полимером, например декстраном [67]. Было показано, что при краткосрочной экспозиции такие частицы нетоксичны и инертны, а после инъекции накапливаются в органе-мишени [68]. Кроме того, в контрастные агенты можно включать флуоресцентную метку, что позволяет проводить мониторинг не только посредством МРТ, но и путем флуоресцентной микроскопии [69].

Однако существуют некоторые ограничения. Для получения качественного изображения клетки в нее должно проникнуть много наночастиц. Это требует высокоэффективной методики мечения, но деление клеток вызывает неизбежное разведение метки [70]. Это может затруднить исследование, требующее стабильности метки. В настоящее время предпринимаются попытки преодоления данных ограничений путем создания нетоксичных, функциональных и высокоустойчивых *in vivo* контрастных агентов.

17.5. Существующие и потенциальные клинические применения микро- и наносенсоров

Биосенсоры широко применяются в медицинской диагностике и лечении инфекционных заболеваний.

В этом разделе мы обсудим современное состояние и потенциал четырех наиболее важных систем и устройств.

17.5.1. Определение глюкозы *in vivo*

Одним из основных клинических применений биосенсоров является их использование в переносных устройствах для измерения концентрации глюкозы в крови больных диабетом [71]. Первые образцы таких приборов появились в начале 1980-х гг. [71], а последнее поколение данных устройств значительно повысило качество жизни больных диабетом.

Теперь пациенты могут самостоятельно определять концентрацию глюкозы в крови и в соответствии с результатом делать инъекции инсулина.

В большинстве биосенсоров для определения концентрации глюкозы используются ферменты, относящиеся к классу оксиредуктаз [72]. Чаще других применяют глюкозооксидазу и глюкозодегидрогеназу [73]. Биосенсоры для определения концентрации глюкозы обычно снабжены электрохимическими преобразователями сигнала [73].

Традиционные амперометрические биосенсоры относительно недавно стали выпускаться в миниатюризированном варианте, что позволяет проводить их

подкожную имплантацию. В системе непрерывного мониторинга «Мини-мед-медтроник» амперометрический ферментный электрод в форме иглы совмещен с портативным регистрирующим устройством. Действие сенсора основано на описанной выше технологии, а данные с регистрирующего устройства после трех дней мониторинга можно переносить на портативный компьютер [74]. Монитор встроен в подкожную ткань, что позволяет определять концентрацию глюкозы в интерстициальной жидкости. В равновесном состоянии концентрации глюкозы в крови и интерстициальной жидкости приблизительно одинаковы [75], однако после приема пищи концентрация глюкозы в крови повышается значительно быстрее.

Еще один микромонитор для регистрации концентрации глюкозы *in vivo* — прибор GlucoWatch фирмы «Cygnus, Inc». Его действие основано на методе обратного электрофореза, при котором находящаяся в интерстициальной жидкости глюкоза транспортируется к поверхности кожи под действием слабого электрического тока, проходящего между двумя электродами [75]. На коже помещается гидрогелевая прокладка с глюкозооксидазным биосенсором, который измеряет концентрацию глюкозы в интерстициальной жидкости. Напомним, что концентрация глюкозы в крови не всегда совпадает с таковой в интерстициальной жидкости, что несколько снижает достоинства GlucoWatch.

Следовательно, необходимо создавать новое поколение неинвазивных и чувствительных к быстрым изменениям концентрации глюкозы биосенсоров.

17.5.2. Бактериальные инфекции мочевыводящих путей

Бактериальные инфекции мочевыводящих путей — второе по частоте системное инфекционное поражение организма [76]. Для определения патогенов в настоящее время используются технологии с применением микробных культур. Однако эти методы достаточно трудоемки и длительны: от взятия пробы до идентификации патогена проходит не менее двух дней [77]. Поэтому существует необходимость в создании эффективных систем анализа, где время ожидания было бы сокращено, точность определения повышена, а стоимость анализа уменьшена.

В литературе описаны электрохимические биосенсоры на основе ДНК, способные находить и идентифицировать патогенные организмы [78, 79]. В данных устройствах олигонуклеотидные зонды функционируют в качестве чувствительных рецепторов, а сигнал регистрируется электрохимическим преобразователем.

Существуют два основных типа моделей определения ДНК. Первый основан на иммобилизации ДНК-мишени с последующей ее идентификацией при помощи меченого зонда [80]. Второй известен под названием «сэндвич-гибридизация»; ДНК-мишень сначала гибридизуется с олигонуклеотидной последовательностью, затем проводят ее гибридизацию с меченым зондом для получения сигнала [80].

Лиао с соавторами использовали такой подход для быстрого определения и идентификации патогенов в образцах мочи [77]. Они создали пары связываю-

щих и идентифицирующих олигонуклеотидов на чипе для определения 16S рРНК. С помощью данного микрочипа через 45 мин после нанесения образца уже можно получить сигнал, при этом нет необходимости в амплификации или мечении последовательности-мишени. Это подтверждает возможность использования методов прямой регистрации для определения бактерий, присутствующих в клинических образцах. Эти методы могут найти широкое клиническое применение.

17.5.3. Обнаружение вируса иммунодефицита человека

В развивающихся странах, где финансовые ресурсы здравоохранения ограничены, проживают свыше 30 млн человек — носителей вируса иммунодефицита (ВИЧ). В 2002 г. Национальный совет по разведке США (NIC) предупреждал, что к 2010 г. число ВИЧ-инфицированных в странах третьего мира достигнет 80 млн.

Эффективная антиретровирусная терапия ВИЧ в развивающихся странах стала доступна более 10 лет назад, однако лишь небольшая часть инфицированных может воспользоваться этой помощью из-за отсутствия диагностики и высокой стоимости лекарств. Для повышения доступности лечения необходимы недорогие диагностические системы [81, 82].

Традиционно диагностика ВИЧ производится либо с помощью прямого флуоресцентного анализа антител, либо путем определения вирусной нагрузки [83]. Прямой флуоресцентный метод определения антител, например метод твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA), основан на использовании двух типов антител для обнаружения вируса [84]. Присутствие ВИЧ *in vivo* может также определяться путем измерения вирусной нагрузки [85]. В этом случае идентифицируют вирусную РНК в бесклеточной плазме крови с помощью амплификации, т. е. полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данный способ диагностики обеспечивает быстрое получение ответа, однако он недостаточно чувствителен и поэтому не очень достоверен [86].

Применение оптического метода определения, основанного на поверхностном плазмонном резонансе (ППР), может оказать большую помощь в исследовании ВИЧ и создании более эффективной системы обнаружения и количественного определения вируса [87]. В методе ППР поверхность биосенсора сначала покрывают иммобилизованным лигандом. Далее по микрожидкостным каналам анализируемое вещество достигает лиганда и происходит специфическое связывание. Затем детектор улавливает изменения показателя преломления, происходящие при связывании и диссоциации искомого вещества [88] (рис. 17.4).

Такой подход в значительной степени помог расширить представления о механизмах развития ВИЧ-инфекции. Фагерстам с сотрудниками использовали ППР для создания полной карты эпитопов моноклональных антител против капсидного белка вируса [89]. Позднее, опять же с помощью ППР, Алтерман с коллегами изучили взаимодействие 17 ингибиторов различной структурой с протеа-

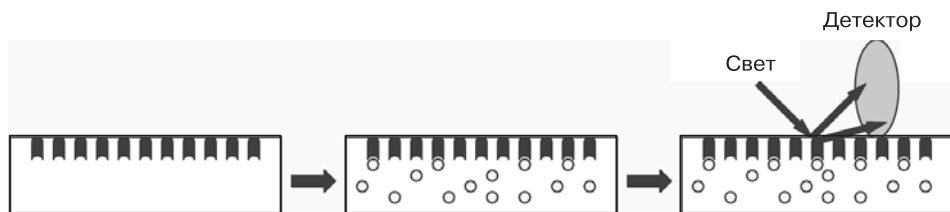


Рис. 17.4. Схематичное изображение применения метода ППР. Лиганд иммобилизован на поверхности биосенсорного чипа. Анализируемое вещество достигает поверхности лиганда по микрожидкостным каналам, и происходит специфическое связывание. Детектирующее устройство регистрирует изменение показателя преломления, происходящее при связывании и диссоциации анализируемого вещества

зой ВИЧ, иммобилизованной на электродах [90]. Эта работа оказалась чрезвычайно важна для синтеза ингибиторов протеазы ВИЧ, которые значительно расширили возможности лечения СПИДа путем прекращения репликации вируса.

Еще один подход к оценке состояния ВИЧ-инфицированных пациентов состоит в измерении числа CD4+ Т-лимфоцитов в крови. Наличие CD4+ Т-лимфоцитов определяет момент начала лечения и позволяет следить за терапевтической реакцией. Если концентрация CD4+ Т-лимфоцитов опускается ниже 200 клеток/мкл, повышается риск развития серьезных инфекций, и в этот момент необходимо срочно проводить лечение.

Дорогим способом определения CD4+ Т-лимфоцитов является проточная цитометрия, недоступная для пациентов в странах третьего мира. Необходимо создание портативных, надежных и недорогих систем, которые могли бы использоваться даже в наиболее бедных государствах. В последнее время предпринимались попытки создания более дешевых вариантов проточной цитометрии, но даже недорогие цитометры остаются слишком сложными для использования в удаленных госпиталях, так как анализы требуют применения дорогих реактивов, включают несколько подготовительных стадий и отличаются большой трудоемкостью и низкой производительностью. Простые способы определения CD4+ Т-лимфоцитов, учитывающие потребности развивающихся стран, а именно высокую производительность, низкую стоимость и доступность, стали возможны с появлением микроэлектромеханических систем (МЭМС). Начинают создаваться микрожидкостные устройства, способные преодолеть перечисленные выше ограничения, поскольку стоимость их производства невысока, они имеют малые размеры и могут выполнять самые разные биологические анализы [91]. В частности, Демирси с соавторами разработали микрожидкостной прибор, с помощью которого можно выделять и получать изображения CD4+ Т-лимфоцитов на поликарбонатном фильтре для установления их концентрации в крови (рис. 17.5 на цв. вклейке).

Микрожидкостные устройства позволяют проводить скрининг и разделение образцов крови. Например, они позволяют проводить разделение лейкоцитов и

эритроцитов в соответствии с их размерами [91]. Далее лейкоциты иммобилизуют в лунках микропланшета, окрашивают и подсчитывают число клеток определенного вида.

17.5.4. Выявление опухолевых клеток

В настоящее время около 60% пациентов с раком груди, толстой кишки, легкого или яичников имеют отдаленные метастазы [92–103]. Эффективное определение злокачественных клеток затрудняется тем, что в циркулирующей крови их мало, а удобных маркеров не существует. Однако применение нанотехнологических подходов *in vitro* и *in vivo* может помочь в повышении селективности и разрешающей способности анализа, что облегчает разработку необходимых диагностических методов.

На сегодняшний день есть несколько способов выделения опухолевых клеток. Все они трудоемки и сопряжены с предварительной подготовкой образцов вручную, что снижает воспроизводимость результатов и чувствительность методов. Циркулирующие опухолевые клетки (ЦОК) редки даже у пациентов с заболеванием на поздней стадии; их концентрация не превышает 1–10 клеток/мл [104], так что надежный счетчик должен находить приблизительно одну ЦОК в миллиарде здоровых клеток. Стандартное разделение клеток проводится с учетом размеров, плотности и дифференциальной экспрессии поверхностных антигенов; для выделения искомой клеточной популяции применяют центрифугирование в градиенте плотности, преимущественный лизис эритроцитов, разделение в градиенте плотности фиколл/гипак, пористые фильтры, иммуномагнитные частицы и клеточную фильтрацию [105]. Были созданы молекулярные методы, основанные на ПЦР-детекции опухоль-ассоциированных РНК у пациентов с меланомой, раком молочной железы и раком простаты [14–17]. Большую роль играют технологии, применение которых позволяет выделять живые или интактные клетки для морфологического, иммуноцитохимического или функционального анализа, а также полигеномных исследований. Эти дополнительные данные помогают использовать имеющуюся информацию о точном числе ЦОК и других циркулирующих предшественников метастазов.

Были предприняты попытки стандартизации подготовительных стадий с целью уменьшения разброса данных. Так, компания «Immunicon Inc.» разработала полуавтоматическую систему подготовки и анализа образцов, которая прошла серию доклинических и клинических испытаний на больных с некоторыми видами рака [94, 96, 97, 101, 106]. Стадии подготовки образца включают выделение лейкоцитов с последующей инкубацией с ферромагнитными частицами, покрытыми антителами к адгезивным молекулам эпителиальных клеток (ErSAM). Далее следует воздействие на образцы магнитного поля и отмывка. ErSAM — адгезионные молекулы гомотипичных клеток, экспрессирующихся исключительно на клетках эпителиального происхождения [107–109]. Было показано, что эти молекулы экспрессируются и на ЦОК [110]. Для улавливания клеток с низкой плотностью рецепторов модифицированная ErSAM-ферромагнитная жидкость

содержала два типа рецепторов: моноклональные антитела против ЕрСАМ и аналог биотина, связывающийся с поливалентными агрегирующими частицами. Такой метод позволил увеличить число магнитных частиц на клетку-мишень, что помогло повысить эффективность захвата клеток.

Приведенный выше пример доказывает возможность применения ЕрСАМ для выделения ЦОК из образцов крови. Однако проблемы увеличения чувствительности определения ЦОК и стандартизации клинических результатов по-прежнему актуальны.

Некоторые клеточные свойства, например размер и жесткость, использовались для выделения более крупных опухолевых клеток из образцов крови [111, 112].

Для обнаружения опухолевых клеток можно применять не только антитела, но и другие биологические молекулы — такие как пептиды или аптамеры. Биоконъюгаты наночастиц с аптамерами помогали специфически идентифицировать клетки рака простаты [113]. Оказалось, что наночастицы с аптамерами РНК гораздо эффективнее захватывались клетками, экспрессирующими простатоспецифический антиген (маркер рака простаты, экспрессия которого значительно повышена в опухолевых клетках).

Определение *in vivo* некоторых злокачественных клеток на ранних стадиях заболевания осложняется тем, что в этот момент новообразование еще не дало метастазов [92]. Поэтому большое внимание уделяется развитию техники получения изображения опухолевых клеток *in vivo*. Например, для идентификации метастазов в лимфоузлах мышей с раком простаты использовались частицы оксида железа [114]. Выяснилось, что распределение частиц оксида железа в организме нарушается в присутствии опухолевых клеток простаты, что было доказано методом МРТ.

С помощью квантовых точек удалось получить изображение клеток рака простаты в лишенных волосяного покрова мышах [60]. Накопление квантовых точек происходило по двум механизмам: за счет повышенной проницаемости и удерживания и посредством связывания антител со специфическими биомаркерами на поверхности опухолевых клеток. Данные методы анализа *in vivo* представляют собой примеры неинвазивных способов получения изображений злокачественных клеток и в будущем могут быть использованы для изучения других видов рака.

17.6. Заключение

Биосенсоры широко применяются в медицине для мониторинга или обнаружения биологических молекул при различных заболеваниях — от диабета до рака. Последние достижения в микро- и нанотехнологии еще больше расширяют возможности применения биосенсоров. Например, микрокантилеверы могут использоваться для обнаружения определенных молекул без использования метки, а наночастицы и клеточные или белковые чипы значительно повышают

чувствительность биомедицинского анализа. Вместе с тем дальнейшая миниатюризация позволяет создавать портативные, недорогие и высокочувствительные приборы для диагностики ВИЧ/СПИД в бедных странах и регионах. Таким образом, внедрение микро- и нанотехнологий в области биосенсорики позволяет надеяться на совершенствование методов диагностики и наблюдения за развитием заболеваний.

Благодарности

Авторы выражают благодарность за финансовую поддержку следующим организациям: Фонду Култера, Инженерному корпусу сухопутной армии США, СИМТ, а также Институту военной нанотехнологии.

Литература

1. American Cancer Society. Cancer Facts and Figures 2006. Atlanta: American Cancer Society; 2006.
2. Hogan P., Dall T., Nikolov P. Economic costs of diabetes in the US in 2002. *Diabetes Care* 2003; 26: 917–932.
3. Collings A.F., Caruso F. Biosensors: recent advances. *Rep. Prog. Phys.* 1997; 60: 1397–1445.
4. Clark L.C. Jr., Lyons C. Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. NY Acad. Sci.* 1962; 102: 29–45.
5. Rechnitz G.A., Kobos R.K., Riechel S.J., Gebauer C.R. A bio-selective membrane electrode prepared with living bacterial cells. *Anal. Chim. Acta* 1977; 94: 357–365.
6. Jianrong C., Yuqing M., Nongyue H., Xiaohua W., Sijiao L. Nanotechnology and biosensors. *Biotechnol. Adv.* 2004; 22: 505–518.
7. Whitesides G.M., Ostuni E., Takayama S., Jiang X.Y., Ingber D.E. Soft lithography in biology and biochemistry. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2001; 3: 335–373.
8. Kubik T., Bogunia-Kubik K., Sugisaka M. Nanotechnology on duty in medical applications. *Curr. Pharm. Biotechnol.* 2005; 6: 17–33.
9. Monk D.J., Walt D.R. Optical fiber-based biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 379: 931–945.
10. Vo-Dinh T., Cullum B. Biosensors and biochips: advances in biological and medical diagnostics. *Fresenius J. Anal. Chem.* 2000; 366: 540–551.
11. Suh K.Y., Khademhosseini A., Yoo P.J., Langer R. Fabrication of single or aggregated bacteria arrays using host—parasite and virus—antibody interactions. *Biomed. Microdevices* 2004; 6: 223–229.
12. Suh K.Y., Khademhosseini A., Jon S., Langer R. Direct confinement of individual viruses within polyethylene glycol (PEG) nanowells. *Nano Lett.* 2006; 6: 1196–1201.
13. Hermann T., Patel D.J. Adaptive recognition by nucleic acid aptamers. *Science* 2000; 287: 820–825.
14. Ramanathan K., Danielsson B. Principles and applications of thermal biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2001; 16: 417–423.
15. Newman J.D., Warner P.J., Turner A.P.F., Tigwell L.J. *Biosensors: A Clearer View*. UK: Cranfield University; 2004; p. 216.

16. Cheng M.M., et al. Nanotechnologies for biomolecular detection and medical diagnostics. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2006; 10: 11–19.
17. Ziegler C. Cantilever-based biosensors. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004; 379: 946–959.
18. Yang Y., Ji H.F., Thundat T. Nerve agents detection using a Cu₂ + /L-cysteine bilayer-coated microcantilever. *J. Am. Chem. Soc.* 2003; 125: 1124–1125.
19. Wu G., et al. Bioassay of prostate-specific antigen (PSA) using microcantilevers. *Nat. Biotechnol.* 2001; 19: 856–860.
20. Hansen K.M., Thundat T. Microcantilever biosensors. *Methods* 2005; 37: 57–64.
21. Mukhopadhyay R., et al. Cantilever sensor for nanomechanical detection of specific protein conformations. *Nano Lett.* 2005; 5: 2385–2388.
22. Lavrik N.V., Separiak M., Datskos P.G. Cantilever transducers as a platform for chemical and biological sensors. *Rev. Sci. Instrum.* 2004; 75: 2229–2253.
23. Demirci U., Ergun A., Oralkan O., Karaman M., Khuri-Yakub B. Forward-viewing CMUT arrays for medical imaging. *IEEE Trans. Ultrason. Ferroelectr. Freq. Control* 2004; 51: 887–895.
24. Rider T.H., et al. A B cell-based sensor for rapid identification of pathogens. *Science* 2003; 301: 213–215.
25. Powers M.J., et al. A microfabricated array bioreactor for perfused 3D liver culture. *Biotechnol. Bioeng.* 2002; 78: 257–269.
26. Natarajan A., Molnar P., Sieverdes K., Jamshidi A., Hickman J.J. Microelectrode array recordings of cardiac action potentials as a high throughput method to evaluate pesticide toxicity. *Toxicol. In Vitro* 2006; 20: 375–381.
27. Fairey E.R., Bottein Dechraoui M.Y., Sheets M.F., Ramsdell J.S. Modification of the cell based assay for brevetoxins using human cardiac voltage dependent sodium channels expressed in HEK-293 cells. *Biosens. Bioelectron.* 2001; 16: 579–586.
28. Gray S.A., et al. Design and demonstration of an automated cell-based biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 2001; 16: 535–542.
29. Kim H., Doh J., Irvine D.J., Cohen R.E., Hammond P.T. Large area two-dimensional B cell arrays for sensing and cell-sorting applications. *Biomacromolecules* 2004; 5: 822–827.
30. Doh J., Irvine D.J. Immunological synapse arrays: patterned protein surfaces that modulate immunological synapse structure formation in T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 5700–5705.
31. Khademhosseini A., Langer R., Borenstein J., Vacanti J.P. Microscale technologies for tissue engineering and biology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2006; 103: 2480–2487.
32. Koh W.G., Itle L.J., Pishko M.V. Molding of hydrogel multiphenotype cell microstructures to create microarrays. *Anal. Chem.* 2003; 75: 5783–5789.
33. Kim H., Cohen R.E., Hammond P.T., Irvine D.T. Live lymphocyte arrays for biosensing. *Adv. Func. Mater.* 2006; 16: 1313–1323.
34. Khademhosseini A., et al. Cell docking inside microwells within reversibly sealed microfluidic channels for fabricating multiphenotype cell arrays. *Lab. Chip* 2005; 5: 1380–1386.
35. Taitt C.R., Anderson G.P., Lingerfelt B.M., Feldstein M.J., Ligler F.S. Nine-analyte detection using an array-based biosensor. *Anal. Chem.* 2002; 74: 6114–6120.
36. Taitt C.R., et al. A portable array biosensor for detecting multiple analytes in complex samples. *Microb. Ecol.* 2004; 47: 175–185.
37. Ligler F.S., et al. Array biosensor for detection of toxins. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003; 377: 469–477.

38. Whitesides G.M. The 'right' size in nanobiotechnology. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 1161–1165.
39. Monson E., Brasuel M.A., Philbert A., Kopelman R. PEBBLE nanosensors for *in vitro* analysis. In: Vo-Dinh T., editor. *Biomedical Photonics Handbook*. Boca Raton, FL: CRC Press; 2003.
40. Cao Y., Lee Koo Y.E., Kopelman R. Poly(decyl methacrylate)-based fluorescent PEBBLE swarm nanosensors for measuring dissolved oxygen in biosamples. *Analyst* 2004; 129: 745–750.
41. Park E.J., Brasuel M., Behrend C., Philbert M.A., Kopelman R. Ratiometric optical PEBBLE nanosensors for real-time magnesium ion concentrations inside viable cells. *Anal. Chem.* 2003; 75: 3784–3791.
42. Xu H., Aylott J.W., Kopelman R. Fluorescent nano-PEBBLE sensors designed for intracellular glucose imaging. *Analyst* 2002; 127: 1471–1477.
43. Sumner J.P., Aylott J.W., Monson E., Kopelman R. A fluorescent PEBBLE nanosensor for intracellular free zinc. *Analyst* 2002; 127: 11–16.
44. Clark H.A., Hoyer M., Philbert M.A., Kopelman R. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 1. Fabrication, characterization, and methods for intracellular delivery of PEBBLE sensors, *Anal. Chem.* 1999; 71: 4831–4836.
45. Clark H.A., Kopelman R., Tjalkens R., Philbert M.A. Optical nanosensors for chemical analysis inside single living cells. 2. Sensors for pH and calcium and the intracellular application of PEBBLE sensors. *Anal. Chem.* 1999; 71: 4837–4843.
46. Buck S.M., et al. Optochemical nanosensor PEBBLES: photonic explorers for bioanalysis with biologically localized embedding. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2004; 8: 540–546.
47. Wolfbeis O.S. Fiber-optic chemical sensors and biosensors. *Anal. Chem.* 2000; 72: 81R–89R.
48. Brasuel M., Kopelman R., Miller T.J., Tjalkens R., Philbert M.A. Fluorescent nanosensors for intracellular chemical analysis: decyl methacrylate liquid polymer matrix and ion-exchange-based potassium PEBBLE sensors with real-time application to viable rat C6 glioma cells. *Anal. Chem.* 2001; 73: 2221–2228.
49. Xu H., Aylott J.W., Kopelman R., Miller T.J., Philbert M.A. A real-time ratiometric method for the determination of molecular oxygen inside living cells using sol–gel-based spherical optical nanosensors with applications to rat C6 glioma. *Anal. Chem.* 2001; 73: 4124–4133.
50. Alivisatos A.P., Gu W., Larabell C. Quantum dots as cellular probes. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2005; 7: 55–76.
51. Mansson A., et al. *In vitro* sliding of actin filaments labelled with single quantum dots. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004; 314: 529–534.
52. Smith A.M., Dave S., Nie S., True L., Gao X. Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6: 231–244.
53. Tomlinson I.D., Mason J.N., Blakely R.D., Rosenthal S.J. Peptide-conjugated quantum dots: imaging the angiotensin type 1 receptor in living cells. *Methods Mol. Biol.* 2005; 303: 51–60.
54. Dai Q., et al. Colloidal CdSe nanocrystals synthesized in noncoordinating solvents with the addition of a secondary ligand: exceptional growth kinetics. *J. Phys. Chem. B Condens. Matter Mater. Surf. Interfaces Biophys.* 2006; 110: 16 508–16513.
55. Jang E., Jun S., Pu L. High quality CdSeS nanocrystals synthesized by facile single injection process and their electroluminescence. *Chem. Commun. (Camb)* 2003: 2964–2965.

56. Skaff H., Sill K., Emrick T. Quantum dots tailored with poly(*para*-phenylene vinylene). *J. Am. Chem. Soc.* 2004; 126: 11322–11325.
57. Crouch D., Norager S., O'Brien P., Park J.H., Pickett N. New synthetic routes for quantum dots. *Philos. Trans. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2003; 361: 297–310. discussion 310.
58. Alivisatos P. The use of nanocrystals in biological detection. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22: 47–52.
59. Chan W.C., Nie S. Quantum dot bioconjugates for ultrasensitive nonisotopic detection. *Science* 1998; 281: 2016–2018.
60. Gao X., Cui Y., Levenson R.M., Chung L.W., Nie S. *In vivo* cancer targeting and imaging with semiconductor quantum. *Biotechnol.* 2004; 22: 969–976.
61. Wu X, et al. Immunofluorescent labeling of cancer marker Her2 and other cellular targets with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 41–46.
62. Jaiswal J.K., Mattoussi H., Mauro J.M., Simon S.M. Long-term multiple color imaging of live cells using quantum dot bioconjugates. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 47–51.
63. Derfus A.M., Chan W.C.W., Bhatia S.N. Intracellular delivery of quantum dots for live cell labeling and organelle tracking. *Adv. Mater.* 2004; 16: 961–966.
64. Hoehn M., et al. Monitoring of implanted stem cell migration *in vivo*: a highly resolved *in vivo* magnetic resonance imaging investigation of experimental stroke in rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002; 99: 16267–16272.
65. Yeh T.C., Zhang W., Ildstad S.T., Ho C. *In vivo* dynamic MRI tracking of rat T-cells labeled with superparamagnetic iron-oxide particles. *Magn. Reson. Med.* 1995; 33: 200–208.
66. Dardzinski B.J., et al. MR imaging of murine arthritis using ultrasmall superparamagnetic iron oxide particles. *Magn. Reson. Imaging* 2001; 19: 1209–1216.
67. Ito A., Shinkai M., Honda H., Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles. *J. Biosci. Bioeng.* 2005; 100: 1–11.
68. Hinds K.A., et al. Highly efficient endosomal labeling of progenitor and stem cells with large magnetic particles allows magnetic resonance imaging of single cells. *Blood* 2003; 102: 867–872.
69. Shapiro E.M., et al. MRI detection of single particles for cellular imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 10901–10906.
70. Kalish H., et al. Combination of transfection agents and magnetic resonance contrast agents for cellular imaging: relationship between relaxivities, electrostatic forces and chemical composition. *Magn. Reson. Med.* 2003; 50: 275–282.
71. Turner A.P., Chen B., Piletsky S.A. *In vitro* diagnostics in diabetes: meeting the challenge. *Clin. Chem.* 1999; 45: 1596–1601.
72. Wilson G.S., Hu Y. Enzyme-based biosensors for *in vivo* measurements. *Chem. Rev.* 2000; 100: 2693–2704.
73. Newman J.D., Turner A.P. Home blood glucose biosensors: a commercial perspective. *Biosens. Bioelectron.* 2005; 20: 2435–2453.
74. Pickup J.C., Hussain F., Evans N.D., Sachedina N. *In vivo* glucose monitoring: the clinical reality and the promise. *Biosens. Bioelectron.* 2005; 20: 1897–1902.
75. Bolinder J., Ungerstedt U., Arner P. Microdialysis measurement of the absolute glucose concentration in subcutaneous adipose tissue allowing glucose monitoring in diabetic patients. *Diabetologia* 1992; 35: 1177–1180.
76. Nicolle L. Epidemiology of urinary tract infection. *Infect. Med.* 2001; 18: 153–162.
77. Liao J.C., et al. Use of electrochemical DNA biosensors for rapid molecular identification of uropathogens in clinical urine specimens. *J. Clin. Microbiol.* 2006; 44: 561–570.

78. Wang J. Electrochemical nucleic acid biosensors. *Anal. Chim. Acta* 2002; 469: 63–71.
79. Drummond T.G., Hill M.G., Barton J.K. Electrochemical DNA sensors. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21: 1192–1199.
80. Campbell C.N., Gal D., Cristler N., Banditrat C., Heller A. Enzyme-amplified amperometric sandwich test for RNA and DNA. *Anal. Chem.* 2002 ;74: 158–162.
81. Sia S.K., Linder V., Parviz B.A., Siegel A., Whitesides G.M. An integrated approach to a portable and low-cost immunoassay for resource-poor settings. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2004; 43: 498–502.
82. Christodoulides N., et al. A microchip-based multianalyte assay system for the assessment of cardiac risk. *Anal. Chem.* 2002; 74: 3030–3036.
83. Whiley D.M., Sloots T.P. A 5'-nuclease real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay for the detection of a broad range of influenza A subtypes, including H5N1. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2005; 53: 335–337.
84. Ivanov A.P., Dragunsky E.M. ELISA as a possible alternative to the neutralization test for evaluating the immune response to poliovirus vaccines. *Expert Rev. Vaccines* 2005; 4: 167–172.
85. Rich J.D., et al. Misdiagnosis of HIV infection by HIV-1 plasma viral load testing: a case series. *Ann. Intern. Med.* 1999; 130: 37–39.
86. van Elden L.J., Nijhuis M., Schipper P., Schuurman R., van Loon A.M. Simultaneous detection of influenza viruses A and B using real-time quantitative PCR. *J. Clin. Microbiol.* 2001; 39: 196–200.
87. Rich R.L., Myszka D.G. Spying on HIV with SPR. *Trends Microbiol.* 2003; 11: 124–133.
88. Myszka D.G., Rich R.L. Implementing surface plasmon resonance biosensors in drug discovery. *Pharm. Sci. Technol. Today* 2000; 3: 310–317.
89. Fagerstam L.G., et al. Detection of antigen-antibody interactions by surface plasmon resonance. Application to epitope mapping. *J. Mol. Recognit.* 1990; 3: 208–214.
90. Alterman M., et al. PI/PI' modified HIV protease inhibitors as tools in two new sensitive surface plasmon resonance biosensor screening assays. *Eur. J. Pharm. Sci.* 2001; 13: 203–212.
91. Toner M., Irimia D. Blood-on-a-chip. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2005; 7: 77–103.
92. Grodzinski P., Silver M., Molnar L.K. Nanotechnology for cancer diagnostics: promises and challenges. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6: 307–318.
93. Fehm T., et al. Cytogenetic evidence that circulating epithelial cells in patients with carcinoma are malignant. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 2073–2084.
94. Cristofanilli M., et al. Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N. Engl. J. Med.* 2004; 351: 781–791.
95. Judson P.L., et al. Preoperative detection of peripherally circulating cancer cells and its prognostic significance in ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* 2003; 91: 389–394.
96. Moreno J.G., et al. Changes in circulating carcinoma cells in patients with metastatic prostate cancer correlate with disease status. *Urology* 2001; 58: 386–392.
97. Racila E., et al. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1998; 95: 4589–4594.
98. Raynor M., Stephenson S.A., Walsh D.C., Pittman K.B., Dobrovic A. Optimisation of the RT-PCR detection of immunomagnetically enriched carcinoma cells. *BMC Cancer* 2002; 2: 14.
99. Smirnov D.A., et al. Global gene expression profiling of circulating tumor cells. *Cancer Res.* 2005; 65: 4993–4997.

100. Shigematsu H., et al. Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* 2005; 97: 339–346.
101. Moreno J.G., et al. Circulating tumor cells predict survival in patients with metastatic prostate cancer. *Urology* 2005; 65: 713–718.
102. Vona G., et al. Impact of cytomorphological detection of circulating tumor cells in patients with liver cancer. *Hepatology* 2004; 39: 792–797.
103. Witzig T.E., et al. Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. *Clin. Cancer Res.* 2002; 8: 1085–1091.
104. Zieglschmid V., Hollmann C., Bocher O. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood. *Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 2005; 42: 155–196.
105. Rolle A., et al. Increase in number of circulating disseminated epithelial cells after surgery for non-small cell lung cancer monitored by MAINTRAC is a predictor for relapse: a preliminary report. *World J. Surg. Oncol.* 2005; 3: 18.
106. O'Hara S.M., et al. Multigene reverse transcription-PCR profiling of circulating tumor cells in hormone-refractory prostate cancer. *Clin. Chem.* 2004; 50: 826–835.
107. Momburg F., Moldenhauer G., Hammerling G.J., Moller P. Immunohistochemical study of the expression of a Mr 34,000 human epithelium-specific surface glycoprotein in normal and malignant tissues. *Cancer Res.* 1987; 47: 2883–2891.
108. Stoop J.A., Hendriks J.G., Berends D. Identification of malignant cells in serous effusions using a panel of monoclonal antibodies Ber-EP4, MCA-b-12 and EMA. *Cytopathology* 1992; 3: 297–302.
109. Gaffey M.J., et al. Immunoreactivity for BER-EP4 in adenocarcinomas, adenomatoid tumors, and malignant mesotheliomas. *Am. J. Surg. Pathol.* 1992; 16: 593–599.
110. Rao C.G., et al. Expression of epithelial cell adhesion molecule in carcinoma cells present in blood and primary and metastatic tumors. *Int. J. Oncol.* 2005; 27: 49–57.
111. Mohamed H. et al. Development of a rare cell fractionation device: application for cancer detection. *IEEE Trans. Nanobiosci.* 2004; 3: 251–256.
112. Shelby J.P., White J., Ganesan K., Rathod P.K., Chiu D.T. A microfluidic model for single-cell capillary obstruction by *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2003; 100: 14618–14622.
113. Farokhzad O.C., et al. Nanoparticle — aptamer bioconjugates: a new approach for targeting prostate cancer cells. *Cancer Res.* 2004; 64: 7668–7672.
114. Harishighani M.G., et al. Noninvasive detection of clinically occult lymph-node metastases in prostate cancer. *N. Engl. J. Med.* 2003; 348: 2491–2499.
115. Battiston F.M., et al. A chemical sensor based on a microfabricated cantilever array with simultaneous resonance-frequency and bending readout. *Sens. Actuators* 2001; 77: 122–131.

СОЕДИНЕНИЯ ЖЕЛЕЗА В НАНОКОНЦЕНТРАЦИЯХ, СВЯЗАННЫЕ С НЕЙРОДЕГЕНЕРАТИВНЫМИ НАРУШЕНИЯМИ

Джоанна Ф. Коллингвуд и Джон Добсон

18.1. Введение

В этой главе мы рассмотрим соединения железа, в норме присутствующие в головном мозге в наноконцентрациях, и обсудим их роль в развитии различных нейродегенеративных нарушений. Некоторые биогенные соединения железа, например ядро железа в запасном белке ферритине, встречаются повсеместно и необходимы для большинства живых существ; их формы изменяются в соответствии с состоянием организма и условиями внешней среды [1]. Биогенные соединения железа играют определенную роль в развитии нейродегенеративных процессов. Нарушение нормального метаболизма железа может сделать ткани мозга чувствительными к окислительному повреждению [2–5], а накопление железа, возможно, связано с патологией ряда нейродегенеративных заболеваний [3, 4, 6–10]. Многое о роли железа в развитии нейродегенеративных патологий еще предстоит выяснить. Но уже известно, что локальное накопление железа служит биомаркером для диагностики и определения стадии заболеваний [11, 12], а также потенциальной мишенью для терапевтического действия хелатирующих агентов [13]. Биогенные соединения железа используются для получения изображений тканей, а магнитные наночастицы железа применяются в ряде биомедицинских исследований [14–16].

18.2. Железо в головном мозге человека

18.2.1. Общие сведения

Железо — один из важнейших элементов в организме человека и выполняет в нем множество функций, рассмотрение которых не является предметом обсуждения данной главы. В отличие от других органов железо в головном мозге имеет специфический характер распределения — как на анатомическом, так и на клеточном уровне [18]; его обычно классифицируют как «гемовое» или «негемовое» железо. Происхождение такого деления связано с работами Залески [19], который показал, что железо в составе гемоглобина, «гемовое железо», не реагирует с ферроцианидом калия, а железо, окрашенное по методу Перлса (см. разд. 18.5.2), находится

в другой форме — это «негемовое железо». Ранние наблюдения и выводы Залески о том, что большая часть железа головного мозга присутствует в форме Fe^{3+} и связана с белком, были сделаны задолго до идентификации ферритина как основного железосодержащего белка в головном мозге [18].

Железо в форме гема входит в состав гемоглобина, играющего ключевую роль в переносе кислорода от легких к тканям, а также в состав некоторых ферментов, например пероксидазы. Негемовое железо существует в самых разных формах, включая частицы размером несколько нанометров. Железо выполняет многочисленные функции при нормальном метаболизме — от синтеза нейромедиаторов до миелинизации — и участвует в аэробном метаболизме клетки; с его помощью образуется аденозинтрифосфат (АТФ) [20]. Особенность железа состоит в том, что *in vivo* оно существует как в ферроформе (Fe^{2+}), так и ферриформе (Fe^{3+}), и это свойство используется для захвата, транспорта и хранения данного элемента. Избыток иона Fe^{2+} может оказывать токсическое действие, приводя к гибели нейронов в результате апоптоза [21]. В частности, реакция ферро-иона с пероксидом водорода (H_2O_2) в соответствии с реакцией Фентона или с пероксинитратами катализирует окислительное повреждение клеток. В головном мозге человека до 40-летнего возраста происходит накопление негемового железа, затем его содержание продолжает возрастать лишь в отдельных участках [10, 22–24].

Определенная часть железа в организме входит в состав низкомолекулярных комплексов и металлосодержащих белков, трансферрина, лактоферрина и меланотрансферрина, но значительная доля негемового железа накапливается в запасных белках: ферритине и, возможно, в гемосидерине [1]. Много железа содержат гранулы нейромеланина [25]. В тканях головного мозга было обнаружено соединение железа со смешанной валентностью в форме наночастиц магнетита [26, 27]. В этом органе железо также связано с миелином и, возможно, играет важную роль в образовании миелиновой оболочки — изоляционного слоя вокруг аксонов [28]. Новые доказательства наличия данной функции были получены при изучении гомогенатов мозга, в ходе которого выявлено сравнительно высокое содержание мРНК Н-ферритина в миелине [29].

18.2.2. Запасное железо

В этом разделе мы обсудим четыре формы секвестрированного железа: ферритин, являющийся основной формой запасания железа в организме; гемосидерин, который изучен значительно слабее; магнетит, представляющий собой оксид железа со смешанной валентностью, его присутствие может свидетельствовать о нарушении метаболизма железа; и нейромеланин как пример сложной молекулярной структуры, богатой железом. Считается, что ферритин и гемосидерин содержат железо в виде парамагнитных антиферромагнитных включений, а магнетит — ферримангнетик. Отметим, что запасы железа в головном мозге на порядки превышают количества, необходимые для реализации известных физиологических процессов [10]. Значит, некоторые аспекты его метаболизма пока остаются неизвестными.

18.2.2.1. Ферритин

Считается, что большая часть негемового железа в мозге, впрочем, как и в остальных отделах организма, присутствует в форме запасного белка, ферритина, имеющего сферическую белковую оболочку диаметром 12 нм с внутренней полостью диаметром 8 нм. Ион Fe^{2+} способен проходить через один из шести каналов в белковой оболочке, в результате железо в форме ферри-ионного ядра накапливается внутри полости. Биосинтез ферритина регулируется на уровне трансляции при участии железо-регуляторного белка 1 (IRP-1 или белка-репрессора ферритина) и IRP-2 [30–33]; IRP-1, в основном содержится в астроцитах [34]. Обычно диаметр железного ядра ферритина — несколько нанометров, так как внутренний диаметр белковой оболочки не превышает 7–8 нм. Точная структура ядра неизвестна; на основании данных рентгеноструктурного анализа, электронной дифракции и электронной микроскопии с высоким разрешением принято считать, что ядро состоит из гидратированного оксида железа(III) ($5\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) [35–37]. Более детальная информация о структуре ядра получена с помощью методов электронной нанодифракции и спектроскопии характеристических потерь энергии электронов. Установлено, что в основном ядро действительно имеет структуру ферригидрита, однако в нем содержатся вкрапления других кристаллических структур, напоминающих магнетит или маггемит, гематит и вюстит [38–40]. Ферритин хранит избыток железа и, по-видимому, играет двойную роль: предотвращает токсическое действие железа и служит доступным источником данного элемента для метаболических нужд [1].

Белковая оболочка, апоферритин, состоит из 24 субъединиц двух гомологичных полипептидов: легкой (L) и тяжелой (H) цепей ферритина. Несмотря на названия, молекулярные массы L- и H-цепей различаются незначительно — примерно 19 и 21 кДа соответственно. За синтез двух типов цепей отвечают разные гены, а соотношение L : H в апоферритине меняется в зависимости от локализации в мозге и возраста. Доминирующая форма в головном мозге — H-цепь ферритина, ее концентрация увеличивается с возрастом во всех отделах мозга, а содержание L-цепи возрастает только в черной субстанции и бледном шаре [23, 24]. В старости соотношение H- и L- цепей ферритина находится в диапазоне от 1,5 : 1 до 3 : 1 в зависимости от локализации [12]. Каждая субъединица выполняет свою функцию. Цепи H-ферритина содержат ферроксидазный центр, что позволяет им быстро захватывать и использовать железо. Эта форма белка преимущественно локализована в отделах, подверженных стрессу, а железное ядро, формирующееся внутри богатых H-цепями белковых оболочек, обычно имеет меньший размер и менее выраженную кристаллическую структуру по сравнению с оболочками с более высоким содержанием L-цепей. Таким образом, H-цепи ферритина преобладают в тканях с большей потребностью в железе. Напротив, L-цепи служат для долгосрочного хранения железа [1, 41, 42].

Ядро ферритина обладает структурой, напоминающей структуру ферригидрита. В экспериментах *in vitro* ядро с ферро-компонентом можно получить либо

в результате неполного окисления Fe^{2+} , который, как правило, полностью превращается в Fe^{3+} , либо путем восстановления существующего ядра, состоящего из ферри-формы [43, 44]. Апоферритин, пустая белковая оболочка, образующаяся в результате удаления ферригидритного ядра, служил матрицей для синтеза наночастиц магнетита в качестве биомиметической модели [16]. Появляются многочисленные доказательства того, что ферритиновое ядро *in vivo* может содержать ферро-компонент, особенно при нейродегенеративных нарушениях [40, 45]. Известно, что ключевым элементом патологии при болезни Альцгеймера является пептид β -амилоид, участвующий в восстановлении железа(III) в физиологических условиях [46].

Ультраструктура ферритинового ядра в норме и при патологии была подробно изучена с помощью методов электронной микроскопии и дифракции [37, 38, 40]. Ферритин в значительной степени определяет свойства ядра, поскольку, если ядра осаждаются без ферритина, возникают гидратированные оксиды железа, обладающие структурой лепидокрокита или гетита [47]. Структура ферригидрита, образующегося *in vivo*, характеризуется наличием связанной воды и множественных пустот в кристаллической решетке и, кроме того, делает ядро менее прочным, чем распространенные формы оксида железа — магнетит, лепидокрокит, гематит и гетит [42, 48]. Наночастицы имеют большое значение отношения площади поверхности к объему, и по оценкам около 40% всех атомов железа в ядре находятся на поверхности [49].

Ранее считалось, что минерализация ядер ферритина происходит по двум метаболическим путям, однако, как было показано Жао с соавторами, *in vitro* реализуется как минимум еще один путь. В работе [50] изучалась минерализация ядер из оксида железа в гомополимерном и гетерополимерном ферритине, состоящем из рекомбинантных Н- и L-цепей. Особое внимание уделялось химии окисления и гидролиза железа в ходе поступления этого элемента внутрь белка. Первый путь минерализации связан с ферроксидазной реакцией, обусловленной Н-субъединицей. Он происходит при любом уровне содержания железа, но минерализация, реализуемая таким образом, ослабевает при большой нагрузке по железу. Второй путь, протекающий на минеральной поверхности, начинает преобладать при нагрузке порядка 800 Fe^{2+} /белок; именно он является основным механизмом образования минерального ядра в L-цепях ферритина и в тех формах Н-цепей, где нарушено образование ядра и (или) отсутствует ферроксидазная активность. Третий путь, включающий реакцию $\text{Fe}^{2+} + \text{H}_2\text{O}_2$, наиболее отчетливо проявлялся при промежуточной нагрузке по железу, от 100 до 500 Fe^{2+} /белок, причем эта реакция отнимает некоторое количество H_2O_2 от ферроксидазной реакции [50].

18.2.2.2. Гемосидерин

Гемосидерин — железозапасающий белок и/или продукт распада ферритина. Этот малоизученный нерастворимый в воде и богатый железом белково-минеральный комплекс обнаруживается, главным образом, в участках геморагии

и избыточного содержания железа; при гемохроматозе он часто встречается в составе лизосом и сидеросом. Природу гемосидерина не легко охарактеризовать [51], кроме того, ткани содержат гемосидерин разной структуры. Вероятно, он образуется в результате нескольких процессов, включая лизосомальную деградацию оболочки ферритина [1], и по другому пути, приводящему к образованию плохо окрашивающихся отложений. Честин показал, что ядро гемосидерина меньше ядра ферритина в исследованных им образцах тканей [42], и у здоровых людей структура ядра гемосидерина похожа на строение ферригидрита. В экспериментах *in vitro* с ферритином и гемосидерином, выделенным из селезенки, было обнаружено, что превращение ферритина в гемосидерин ослабляет способность железа к иницированию реакций с участием кислородных радикалов. Это вызвало предположение о наличии защитной функции гемосидерина при избыточной нагрузке по железу [52].

Большая часть информации о ферритине и гемосидерине получена в ходе изучения печени и селезенки человека. Особенно много гемосидерина содержится в печени при наличии болезней, связанных с нарушением обмена железа: первичном гемохроматозе и бета-талассемии. Потому многие предположения о гемосидерине головного мозга есть не что иное, как предположения, основанные на особенностях этого соединения в других органах. Данное утверждение в определенной степени справедливо и для ферритина, хотя ряд работ был посвящен изучению свойств ферритина, выделенного непосредственно из головного мозга [39, 40, 53]. Патологические отложения гемосидерина сравнительно инертны и стабильны, что подтверждается результатами исследований при интрацеребральной геморрагии и поверхностном сидерозе, когда слабое хроническое кровотечение приводит к избыточному отложению ферритина и гемосидерина [54]. Пока неизвестно, насколько инертен и стабилен гемосидерин, образующийся по другим механизмам. Полагают, что присутствие гемосидерина всегда связано с избытком железа, и из его ядра железо высвобождается легче, чем из ядра ферритина [55].

Как указано в разд. 18.5, для подробной характеристики и определения различных форм железа в головном мозге требуется применение нескольких аналитических методов, например Мёссбауэровской спектроскопии, электронной микроскопии и дифракции высокого разрешения, рентгеновской спектроскопии, СКВИД-микроскопии (СКВИД — сверхпроводящий квантовый интерференционный датчик), магнетометрии и ядерно-магнитного резонанса, ЯМР [53, 56–59]. Обычно при описании форм запасенного железа в головном мозге ограничиваются лишь рассмотрением ферритина и гемосидерина, однако применение ряда аналитических методов позволило доказать наличие и других форм железа, включая железо, связанное с липофусцином [60] и содержащееся в нейромеланине (см. разд. 18.2.2.4). Возможность локализовать и структурно и химически охарактеризовать железо *in situ* в неокрашенных тканях с субклеточным разрешением [58, 61] в сочетании с применением методов окраски белка позволяет лучше понять функции различных форм железа в тканях головного мозга.

18.2.2.3. Магнетит

Магнетит — ферримагнитная форма оксида железа, присутствующая во многих живых организмах — от магнетотактических бактерий до рыб и голубей. Основываясь на анализе изображений тканей головного мозга, полагают, что в тканях человека нет ферромагнитных материалов. Это противоречит результатам исследований, в ходе которых из головного мозга был выделен магнетит, в том числе магнитно упорядоченные частицы достаточно большого размера [26, 27]. Кристаллическая структура магнетита также была обнаружена в ферритине, экстрагированном из головного мозга, и в других исследованиях [39, 40], кроме того, с помощью рентгеновской спектроскопии показано наличие магнетита в интактной ткани головного мозга после аутопсии [45]. Кристаллическая решетка магнетита построена из перемежающихся ионов Fe^{2+} и Fe^{3+} . Его происхождение в головном мозге неизвестно, однако магнетит найден в богатых железом областях, например в гипоталамусе [27], а также в тканях головного мозга при болезни Альцгеймера [45], что может указывать на связь магнетита с нарушениями метаболизма железа. Предполагается, что осаждение магнетита внутри оболочки ферритина из-за невозможности полного окисления Fe^{2+} в процессе его захвата ферритином [1] может предшествовать образованию частиц магнетита в мозге [8]. В 2002 г. опубликованы предварительные данные, показавшие увеличение концентрации биогенного магнетита в гипоталамусе мужчин старше 40 лет [62].

18.2.2.4. Нейромеланин

Нейромеланин — сложная многослойная молекула, отвечающая за синтез пигмента, который в большой концентрации присутствует в допаминергических нейронах черной субстанции и в норадренергических нейронах голубого пятна [63, 64]. Нейромеланин наряду с липофусцином обычно находится в органеллах, называемых «нейромеланиновые гранулы» [63]. Он связывает многие токсичные вещества и металлы, модулируя их действие [63]. Железо — постоянный компонент нейромеланина; его молекула захватывает железо в форме Fe^{2+} и связывает с фенольными группами в виде Fe^{3+} . Железные центры представляют собой кластеры оксигидроксида железа, напоминающие структуру ядра ферритина [24]. При болезни Паркинсона содержание железа в черной субстанции повышается на 30–35%. Увеличение концентрации железа в гранулах нейромеланина свидетельствует, что с ним дополнительно связывается большое количество железа [57, 65]. Однако абсолютная концентрация нейромеланина в черной субстанции, которая в норме увеличивается с возрастом, при болезни Паркинсона уменьшается [66]. Захват металлов и лекарственных средств с выраженной восстановительной активностью свидетельствует, что нейромеланин обладает защитной функцией, предохраняя нейроны от повреждения [63]. Возможно, он также способствует высвобождению нейротоксинов из микроглии [10, 63].

18.2.3. Региональное распределение соединений железа

Региональная анатомическая локализация соединений железа изучалась разными способами. Первоначально для визуализации значительных региональных изменений содержания железа(III) в головном мозге использовали гистохимическое окрашивание по методу Перлса (см. разд. 18.5.2). Первые цветные изображения дифференциального распределения железа в головном мозге были получены Шпатцем; гистохимическое окрашивание железа в белом веществе оказалось пренебрежимо мало, слабое окрашивание отмечалось в области коры, а интенсивное наблюдалось в участках экстрапирамидальной системы [67]. Позднее Дрэйер использовал окрашивание по методу Перлса для подтверждения значительного содержания железа в височной доле, а также более высокой концентрации железа в белом веществе лобной доли по сравнению с затылочной [68]. Биохимический анализ головного мозга при аутопсии выявил наличие железа, которое не удавалось обнаружить окрашиванием, и обеспечил его количественное определение в некоторых отделах мозга. Так, удалось показать, что наивысшая концентрация железа в мозге, около 200 мкг/г, наблюдается в бледном шаре, красном ядре, черной субстанции и скорлупе чечевицеобразного ядра. В работе [12] приведен обзор содержания железа, ферритина и трансферрина в различных отделах мозга. Наиболее удивительным отличием результатов биохимического анализа и гистохимического окрашивания является то, что путем биохимического анализа в белом веществе мозга была определена приблизительно такая же концентрация железа, что и в сером веществе. В некоторых участках мозга, например в моторной коре, железа содержалось больше, чем в прилежащих областях серого вещества [69, 70]. В здоровом мозге части экстрапирамидальной системы, связанные с моторными функциями, характеризуются максимальной концентрацией железа, однако столь высокие концентрации появляются там не с рождения, а постепенно накапливаются при взрослении. Смысл высоких концентраций железа непонятен, поскольку известные процессы, сопровождающиеся расходом железа, используют лишь 5–10% от его общего количества [10]. Распределение ферритина соответствует распределению железа, при этом концентрация последнего в базальных ганглиях в два-три раза выше, чем в коре головного мозга. Содержание ферритина в сером веществе коры и прилежащем белом веществе примерно одинаково [12, 69].

На клеточном уровне окрашивание по методу Перлса сначала позволило определить наличие железа в микроглии, олигодендроцитах, астроцитах, нервных клетках и иногда в аксонах и миелиновых оболочках [67]. Олигодендроциты головного мозга окрашиваются сильнее остальных клеток, хотя в области белого вещества окраска имеет фрагментарный характер; причина этого неизвестна [18]. Экспрессия ферритина наблюдается в олигодендроцитах, нейронах и микроглии, следовательно, данные клетки способны накапливать железо [10]. Различие в содержании изоформ ферритина обнаруживается как на клеточном, так и на региональном уровне. Нейроны обогащены N-цепями ферритина, что

приводит к активному захвату железа и наличию пероксидазной активности, тогда как макрофаги и микроглия содержат в основном L-цепи ферритина, где запасается железо [70]. В олигодендроцитах находится смесь H- и L-цепей, причем их больше, чем в нейронах, хотя окрашивание H-цепей в олигодендроцитах белого вещества фрагментарно [71, 72]. В астроцитах ферритин практически отсутствует. Изучение негемового железа в головном мозге методом световой микроскопии [73] показало, что внутриклеточные отложения железа находятся в форме гемосидерина в составе сидеросом [10], поскольку ферритин в цитозоле создает лишь слабый голубой фон. Такая неравномерность распределения отложений железа в тканях головного мозга [73] имеет большое значение для определения концентраций железа методом МРТ и получения T2-взвешенных изображений. Методом электронной микроскопии было детально проанализировано неравномерное распределение ферритина и гемосидерина в перегруженных железом тканях печени; аналогичные исследования тканей головного мозга начали проводиться лишь недавно [55].

18.2.4. Транспорт железа

Основным переносчиком железа из крови к тканям головного мозга является трансферрин, действующий через свои рецепторы в капиллярах мозга. Трансферрин состоит из одной аминокислотной и двух углеводных последовательностей. Каждая из них может связывать по иону Fe^{3+} . Лишь незначительная доля всего железа головного мозга взаимодействует с трансферрином, и концентрация железа в нем примерно в 10–50 раз ниже таковой в ферритине в расчете на единицу массы белка [12]. Региональное распределение трансферрина и ферритина также различно. Обычно в белом веществе окрашивание позволяет выявить равномерное распределение трансферрина и неравномерное распределение железа и ферритина, а в сером веществе — равномерное распределение ферритина и железа и неравномерное — трансферрина. Уровень трансферрина в белом веществе примерно в три раза выше, чем в сером веществе [23]. Трансферрин может накапливаться в астроцитах с возрастом [23, 71]. Зекка с соавторами разработали детальный механизм действия трансферрина [10], хотя Бурдо и Коннер [74] доказали, что транспорт железа может происходить и без участия этого белка. Вообще-то, механизмы поддержания гомеостаза железа в головном мозге изучены недостаточно. Было идентифицировано несколько белков-переносчиков железа, способных проникать сквозь клеточные мембраны и органеллы; к ним относятся переносчик двухвалентных металлов-1 (DMT1), белок макрофагов (NRAMP2) и ферропортин (MTP1) [75, 76]. Применение иммуногистохимических методов показало наличие DMT1 в нейронах, клетках глии и клетках стенок сосудов [77]; ферропортин присутствует главным образом в нейронах [78], в эндотелиальных клетках гематоэнцефалического барьера и синаптических пузырьках [76].

18.3. Роль соединений железа в нейродегенеративных нарушениях

18.3.1. Общие сведения

Нейродегенеративные заболевания сопровождаются поражением части нейронов, находящихся, например, в участках с повышенным содержанием железа, и особенно в обогащенных железом областях, связанных с моторной функцией, а именно в допаминергических нейронах черной субстанции при болезни Паркинсона [103]. Другим примером служат нейроны гиппокампа при болезни Альцгеймера. Причина столь избирательной чувствительности клеточных популяций до конца не установлена, однако высокий уровень содержания железа, возможно, способствует избыточному образованию активных соединений кислорода и вызываемому ими окислительному повреждению [2, 10].

Характер регионального распределения железа при разных заболеваниях различен даже при близких генетических нарушениях, скажем, ацерулоплазмиемии и пантотенаткиназа-ассоциированной нейродегенерации. Но и здесь выявляются общие закономерности в распределении железа на клеточном уровне. На избыток железа ткани реагируют, превращая свободное железо в ферритин: сначала происходит его захват клетками микроглии, а потом астроцитами, далее следует локальное расширение аксонов, т. е. образование сфероидов. Предполагают, что затем железо накапливается в нейронах из-за повышения их проницаемости [18]. Кристаллическая структура и валентность негемового железа также играют важную роль в объяснении происхождения и действия соединений железа.

Еще далеко до полного понимания причин и механизмов накопления железа при нейродегенеративных заболеваниях; неизвестно, является ли присутствие в головном мозге магнетита, гемосидерина и вюстита биологической нормой или патологией. Обычно с возрастом содержание ферритина в головном мозге увеличивается [23, 79], однако при болезнях Альцгеймера и Паркинсона этого не происходит [23, 80]. Невозможность синтеза дополнительного ферритина при выраженном локальном накоплении железа, наблюдающемся при этих заболеваниях, может приводить к избыточной загрузке существующих центров связывания, появлению альтернативных форм железа или к окислительному стрессу.

При заболеваниях с избыточным накоплением железа, например гемохроматозе, в лизосомах и сидеросомах обнаруживают гемосидерин, который часто рассматривают как одну из форм запасаания железа в головном мозге, хотя прямых доказательств отложений гемосидерина в тканях мозга пока очень мало. Недавно в одной из работ даже само присутствие гемосидерина в тканях мозга было поставлено под сомнение [81]. Однако в различных исследованиях уже получены экспериментальные доказательства наличия гемосидерина в головном мозге, выявлены богатые гемосидерином лизосомы и сидеросомы в хвостатом ядре при прогрессирующем надъядерном параличе, гемосидерин также обнаружен в тканях гиппокампа при болезни Альцгеймера [40, 55]. Сочетание

структурно и химически чувствительных методов [45, 55, 88] может помочь в понимании функций столь сложного соединения.

Экстракция магнетита из гиппокампа [27], а также его присутствие в тканях при болезни Альцгеймера [45] может указывать на нарушение гомеостаза железа и невозможность полного окисления восстанавливающей формы железа в областях, подверженных окислительному стрессу и атрофии нейронов [8]. Механизмы, в соответствии с которыми избыток железа вызывает дегенерацию нервов, как правило, включают нарушение функций белков, например агрегацию амилоидных пептидов [103] и мутации генов ферритина [82]. Изоформы ферритина влияют на чувствительность определенных клеточных популяций, так как от относительного содержания его Н- и L-цепей зависит локальная реакция на избыток железа. Недавно была установлена защитная функция Н-ферритина; выяснилось, что Н-цепь значительно ослабляет образование радикалов •ОН в соответствии с реакцией Фентона. За это отвечает ферроксидазный сайт на Н-цепи ферритина [83]. Многие данные об избыточном содержании железа при нейродегенеративных нарушениях получены на основе исследований не головного мозга, а других тканей, а также из экспериментов на животных. Специфичность изоформ ферритина и биохимия чувствительных отделов мозга свидетельствуют о том, что прямая экстраполяция имеющихся данных на ткани головного мозга не всегда оправдана.

В последнее время исследователи заняты изучением белковых переносчиков железа, например белков IRP2 и DMT1, и влиянием их выключения или генетического дефекта на животных моделях. Выключение IRP2 приводит к появлению симптомов нейродегенеративного расстройства и признаков накопления железа в тканях головного мозга [11, 33].

Довольно сложно определить различие между редкими формами отложения железа в головном мозге, например нейроферритинопатией и другими нарушениями, связанными с накоплением железа, скажем, болезнью Альцгеймера, для которой постепенно вырисовываются генетические факторы риска. Хотя накопление железа в головном мозге — лишь один элемент в широком спектре патологий, понимание причин концентрирования данного элемента может помочь в создании методов диагностики, определении стадии, а также лечении заболеваний.

18.3.2. Болезнь Альцгеймера

При болезни Альцгеймера (БА) происходит накопление железа в головном мозге, но если в норме при старении одновременно увеличивается содержание и железа, и ферритина, в случае БА данные процессы не идут параллельно [69]. Это может означать как возрастание загруженности ферритина железом, так и то, что избыток железа запасается необычным способом, приводя к окислительному повреждению, наблюдаемому при БА. У сенильных бляшек ярко выражена иммунореактивность по отношению к ферритину, а у ферритинсодержащих клеток обнаруживают бляшки на периферии центрального ядра.

Получены доказательства присутствия железосодержащих клеток в центральном ядре; считается, что это клетки микроглии [12]. Богатые железом клетки микроглии окружают и сенильные бляшки [69, 84]. Хотя железо и содержащая ферритин микроглия связаны с деструктивным процессом, а в микроглии могут откладываться и железо, и ферритин, это не подразумевает общего накопления железа в головном мозге. Ранние исследования показали, что общее содержание железа при БА не меняется [22].

Кроме сенильных бляшек выраженная иммунореактивность по отношению к ферритину наблюдается во многих кровеносных сосудах, особенно много ферритина выявлено в сером веществе гиппокампа. В его тканях наблюдается внутриклеточное накопление ферритина и гемосидерина [55], а так как именно эта область наиболее подвержена нейродегенерации и атрофии, можно предположить, что концентрирование наночастиц оксида железа связано с патогенезом БА. Отметим определенное сходство между ядрами ферритина, выделенными из головного мозга при БА, и ядрами гемосидерина, выделенными из мозга больных гемохроматозом; в обоих случаях состав ядер отличался от нормальной напоминающей ферригидрит структуры и содержал богатый Fe^{2+} оксид железа, структурно похожий на вюстит [40]. В экспериментах *in vivo* было зафиксировано укорочение релаксационного времени T2 при МРТ 3 Тл для гиппокампа по сравнению с контрольными образцами, что указывает на увеличение концентрации железа в ткани гиппокампа при БА [85]. Проведение МРТ у пациентов с БА, а также анализ тканей при аутопсии и в экспериментах на животных моделях часто обнаруживают небольшие участки гипointенсивного сигнала, многие из которых, вероятно, вызваны микрокровоотечениями, сопровождающими церебральную амилоидную ангиопатию, и накоплением гемосидерина [86]. С возрастом уровень миелина также снижается, что, возможно, связано с изменением содержания железа [87].

В экспериментах *in vitro* было показано влияние железа на процессинг предшественника бета-амилоида (APP) через железочувствительный элемент [88] и на агрегацию амилоидных пептидов в сенильных бляшках [89–91]. Кроме того, Fe^{3+} может восстанавливаться до Fe^{2+} при агрегации β -амилоида в физиологических условиях [46]. Этот факт указывает на механизм образования токсичных ионов Fe^{2+} при pH 7,4 и подтверждает ключевую роль амилоидных пептидов в образовании сенильных бляшек. Роль последних до сих пор остается предметом дискуссии, и хотя считается, что начальный процесс олигомеризации оказывает токсическое действие, а способность бляшек удерживать металлы [69], может свидетельствовать о защитной функции амилоида.

При БА оксиды Fe^{2+} содержатся не только в ферритиновых ядрах [40]. Установлено, что железо в форме Fe^{2+} связано с рибосомами пирамидальных клеток гиппокампа [5] и с нейрофибрилярными узлами [3, 92]. При анализе верхней височной извины СКВИД-методом выявлено повышенное содержание магнетита у женщин с БА [93]. С помощью рентгеновской спектроскопии удалось показать наличие локализованных отложений магнетита и ферригидрита во взятых при аутопсии тканях верхней височной извины [45].

18.3.3. Болезнь Хантингтона

Болезнь Хантингтона (БХ) вызывается генетической мутацией белка хантингтина. Данная патология возникает в среднем или преклонном возрасте. Есть несколько доказательств того, что в патогенезе БХ участвует железо. Первые патологоанатомические работы, посвященные изучению отложений железа в тканях головного мозга, выявили повышенный уровень железа в стриатуме [94, 95]. Также известно, что специфическое поражение нейронов стриатума происходит уже на ранних стадиях заболевания [96]. Нарушение экспрессии переносчиков железа характерно как для БХ, так и для болезни Альцгеймера, болезни Паркинсона и амиотрофного латерального склероза [97]. Генетические исследования показали, что хантингтин — железо-чувствительный белок, участвующий в регуляции гомеостаза железа [98]. МРТ пациентов с БХ выявляла нарушения в стриатуме [99], а в более поздних работах возможности МРТ позволили обнаружить избыток железа в базальных ганглиях пациентов с БХ в совокупности с методом увеличения скорости релаксации в зависимости от силы поля [100].

18.3.4. Болезнь Паркинсона

Накопление железа связывают с гибелью клеток как при болезни Паркинсона (БП), так и при других нарушениях, связанных с повреждением телец Леви [101]. Часто патологоанатомический анализ головного мозга людей с БП выявляет более высокий уровень железа, чем у здоровых людей того же возраста. Впрочем, эти исследования обычно касаются специфических богатых железом и чувствительных к повреждению областей, например черной субстанции. Для определения общего содержания железа в черной субстанции предлагалось несколько подходов, и далеко не все результаты показали значительное различие между мозгом больных и здоровых индивидуумов, хотя, возможно, отсутствие различий наблюдалось при относительно легкой форме заболевания. Кроме того, определенную роль может играть подготовка ткани и чувствительность конкретного метода [10, 64]. Еще одной зоной, где происходит накопление железа, является латеральный бледный шар, что может быть связано с чувствительностью допаминергических нейронов [95]. По-видимому, уровень железа растет параллельно с развитием патологического процесса, при этом в нейронах обнаруживается много железосодержащего нейромеланина, а в глиальных клетках — Fe^{3+} преимущественно в форме ферритина. Нейромеланин образует прочные хелатные комплексы с железом, поэтому при БП уровень железа в цитоплазме нейронов низкий [65]. Следует отметить, что в большинстве цитируемых исследований анализировались ткани, фиксированные формалином, а такой метод обработки обычно приводит к потере и перераспределению железа. Недавние исследования нефиксированных замороженных срезов, проведенные с помощью электронной микроскопии, показали удвоение концентрации железа как в отдельных нейронах, так и в нейропилях компактной зоны черной субстанции [102].

Отложения железа(III) обнаружены в олигодендроцитах, астроцитах вблизи нейронов, микроглии, пигментированных нейронах [64] и в периферическом отделе телец Леви в компактной зоне черной субстанции пациентов с БП. Анализ паллидума и скорлупы мозга подтвердил эти наблюдения. Как и в поврежденных областях мозга при болезни Альцгеймера, при БП также наблюдается возрастание нагруженных ферритином клеток микроглии в черной субстанции, а появление реактивной микроглии происходит параллельно возникновению выроджденных и нагруженных нейромеланином допаминергических нейронов [10]. Полагают, что активация микроглии комплексом нейромеланина с железом, особенно нейромеланином, выделяющимся из мертвых и умирающих нейронов, — причина появления различных нейротоксических веществ [10]. При БП также происходит агрегация белка, в частности, основного компонента телец Леви — альфа-синуклеина. Это — патологический признак БП и родственных ей нарушений. Экстраполяция результатов исследований *in vitro* позволяет предположить, что железо может вызывать токсические проявления *in vivo* посредством влияния на образование фибрилл и агрегацию альфа-синуклеина [91, 103].

Повреждение нейронов при БП происходит до появления клинических симптомов, и ранние исследования не выявили общего накопления железа на этой стадии патологического процесса. Предполагается, что нарушение метаболизма железа может возникать в начальной стадии заболевания путем меж- и внутриклеточной транслокации [10]. МРТ-анализ содержания железа у пациентов с БП *in vivo* показал наличие корреляции между уровнем железа в базальных ганглиях и неврологическими симптомами [105]. В настоящее время механизм накопления железа в черной субстанции неизвестен. Хотя в поврежденных нейронах черной субстанции у пациентов с БП не обнаружен ферритин [106], показано, что содержание железа в ферритине у таких больных увеличено [107], а экспрессия некоторых белков-переносчиков железа изменена. Следует отметить, что результаты исследований по изучению связи усиленной экспрессии ферритина в черной субстанции с повышением уровня железа противоречивы [10]. Возможно, в патогенезе заболевания определенную роль играют мутации генов, ответственных за гомеостаз железа, а также повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера [10].

18.3.5. Нейродегенерация с накоплением железа в мозге

Нейродегенерация с накоплением железа в мозге, прежнее название — синдром Халлервордена—Шпатца, — редкая патология, вызванная избытком железа в некоторых отделах мозга, включая бледный шар и ретикулярную часть черной субстанции. В этих местах появляются первые признаки атрофии нейронов, причем железо участвует в развитии заболевания. Региональный характер накопления железа аналогичен болезни Паркинсона, а профиль его окрашивания в клетках совпадает с таковым при многих типах нейродегенеративных расстройств, связанных с накоплением железа. Наиболее сильное окрашивание

наблюдается в гипертрофированной микроглии, макрофагах, сфероидах и нейронах. У большинства больных установлен дефект гена пантотенаткиназы-2, PANK2; рецессивный ген получил название PKAN [108]. Предполагается, что в какой-то мере накопление железа в базальных ганглиях связано с нарушением модификации цистеина [109]. Избыток железа в бледном шаре обычно создает типичную картину, наблюдаемую при МРТ-диагностике: область гипоинтенсивного сигнала с гиперинтенсивным ядром. Ее называют «глаз тигра» и считают основным диагностическим признаком [108].

18.3.6. Ацерулоплазминемиа

Ацерулоплазминемиа — заболевание с аутосомно-рецессивным типом наследования, когда возникают мутации гена церулоплазмينا, приводящие к отсутствию функционального церулоплазмينا в плазме. Учитывая важнейшую роль экспрессии церулоплазмينا в астроцитах для метаболизма железа и поддержания нейронов [110], системное накопление железа, сопровождающееся неврологическими симптомами, — характерный признак данной патологии. Избыток железа наблюдается в нейронах, астроцитах, клетках микроглии и олигодендроцитах. Накопление железа в некоторых отделах головного мозга противоречит прежней гипотезе о защите гематоэнцефалического барьера взрослого человека от ацерулоплазминеми [111, 112]. Хотя в базальных ганглиях и наблюдается избыток железа, характер его накопления сильно отличается от такового при нейродегенерации [113, 114], поскольку в бледном шаре отложения железа не происходит. Сильное окрашивание железа наблюдается в хвостатом ядре, скорлупе, красном ядре, черной субстанции и зубчатом ядре. На клеточном уровне протекают те же процессы, что и при других нарушениях, а именно накопление железа в клетках микроглии, астроцитах, сфероидах и нейронах. Как и в случае PKAN, снижение сигнала МРТ — первый диагностический признак заболевания [11].

18.3.7. Нейроферритинопатия

Нейроферритинопатия — форма нейродегенеративной патологии, передающаяся по доминантному механизму и характеризующаяся сравнительно поздним началом. Это пример заболевания, при котором нарушение метаболизма железа идентифицируется как основа патологии. Нейроферритинопатия вызвана мутацией гена, кодирующего L-цепь ферритина [82, 115], что приводит к нарушению образования ядра ферритина и запасания железа, особенно в базальных ганглиях. Интенсивное отложение железа происходит в хвостатом ядре, скорлупе, черной субстанции и бледном шаре, причем в двух последних отделах образуются аномальные агрегаты ферритина [82]. В области хвостатого ядра наблюдается картина, похожая на «глаз тигра» (см. разд. 18.3.5) [18]. Течение заболевания сопровождается низкой сывороточной концентрацией ферритина [115]. На клеточном уровне аномальное накопление ферритина происходит

в нейронах стриатума и коры, а также в клетках глии, что усиливает нейродегенерацию [116].

18.3.8. Другие нейродегенеративные нарушения

К другим неврологическим процессам с нарушениями распределения железа в головном мозге относятся СПИД-ассоциированная деменция, амиотрофный латеральный склероз, или заболевание моторных нервов, наследственная атаксия Фридрейха, рассеянный склероз, прогрессирующий надъядерный паралич, ишемический инсульт и синдром Дауна [12, 117].

СПИД-ассоциированная деменция поражает примерно одну пятую часть ВИЧ-инфицированных; при этом МРТ выявляет у таких больных повышенное содержание железа в базальных ганглиях, особенно в бледном шаре [118]. Кроме того, микроглия белого вещества также перегружена железом [119]. Роль повышенного содержания железа в сочетании с различными типами анемии у ВИЧ-инфицированных обсуждается в работе Бутенски с соавторами [120].

При атаксии Фридрейха нарушение метаболизма железа связано с дефектом белка фратаксина [121]. Главная особенность заболевания — избыток железа в митохондриях. Фратаксин, который считается ответственным за накопление железа в этих органеллах, экспорт железа из митохондрий и биосинтез железосерных кластеров, практически отсутствует у пациентов с атаксией Фридрейха [122]. Избыточное содержание железа наблюдается в центральной нервной системе и в сердце, что сопровождается активным повреждением нейронов зубчатого ядра [123]. Однако связь между основными участками нейропатологии и накоплением железа понятна не до конца, а роль фратаксина в гомеостазе и его способность связывать железо до сих пор остаются предметом дискуссии [81].

Рассеянный (множественный) склероз характеризуется воспалением и демиелинизацией аксонов нейронов. При разрушении миелиновой оболочки происходит повреждение аксонов с последующим образованием бляшек. Металлы-восстановители, включая железо, играют активную роль в патогенезе. На периферии старых бляшек обнаруживаются глобулярные образования негемового железа, причем характер отложения железа аналогичен болезни Альцгеймера [70].

Еще одно состояние, связанное с нарушением распределения железа в головном мозге, называют «синдром беспокойных ног»; он часто сопровождается дефицитом железа [124], но также может возникать в сочетании с болезнью Паркинсона.

18.3.9. Гемохроматоз

Гемохроматоз — патология, вызванная избыточным содержанием в организме железа, поступающего с пищей. При этом заболевании в тканях обнаруживают гемосидерин с железом в форме ферригидрита, гетита и богатого Fe^{2+} вюстита, причем структура железного ядра зависит от стадии заболевания [40, 42]. При различных видах гемохроматоза происходят мутации гена гемохроматоза HFE, гена рецептора трансферрина-2 (TfR2), гена гемоювелина (HJV) или гепсидина [125].

Хотя гемохроматоз в первую очередь поражает печень, железо накапливается и в других органах: сердце, поджелудочной железе и головном мозге. Изменение концентрации железа в головном мозге доказано методом МРТ, включая исследование базальных ганглиев [126, 127]; снижение концентрации железа в головном мозге наблюдалось в сочетании с «синдромом беспокойных ног» [124].

Есть данные, указывающие на роль гена HFE как фактора риска развития болезни Альцгеймера и его влияние на возраст, когда начинают проявляться первые признаки БА [128]. У пациентов с БА белок HFE экспрессируется клетками, связанными с сенильными бляшками и астроцитами, он также обнаруживается в кровеносных сосудах головного мозга и в хориоидном сплетении [10, 128]. Мутация HFE при болезни Альцгеймера — еще одно доказательство, что нарушение метаболизма железа в головном мозге вносит вклад в развитие заболевания, является важным фактором риска, и, возможно, связано с ростом окислительного стресса при нейродегенеративных процессах [129, 130]. Болезнь Паркинсона походит на гемохроматоз в том смысле, что обе патологии характеризуются накоплением железа в головном мозге [126] и HFE-связанными генетическими мутациями [81].

18.4. Магнитные свойства соединений железа в головном мозге

Биоминералы железа обладают магнитными свойствами. Хотя ткани человека в основном состоят из диамагнетиков, не скомпенсированный спин атома железа сообщает железосодержащим материалам парамагнитные свойства. Спаривание спинов зависит от кристаллической структуры и приводит к появлению магнитных свойств. Степень кристалличности также оказывает большое влияние на данные свойства [42]. В нормальных ядрах ферритина и гемосидерина, имеющих структуру ферригидрита, при комнатной температуре и при температуре тела наблюдается антиферромагнитный порядок. Структура гетита, иногда встречающаяся в ядрах гемосидерина, тоже обладает антиферромагнитными свойствами. Однако компенсация спинов происходит не полностью, в результате возникает слабый ферромагнетизм [131]. Напротив, магнетит имеет ферримагнитную упорядоченность благодаря подрешетке железа, где спаривание спинов опосредовано атомами кислорода. Данное соединение характеризуется сравнительно высоким значением намагниченности насыщения (около $90 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{кг}$ по сравнению с $<1 \text{ A} \cdot \text{m}^2/\text{кг}$ у гозтита) при комнатной температуре. Магнитные свойства позволяют различать биологические соединения железа в тканях (см. раздел 18.5.3) и делать выводы о роли магнитно-упорядоченных материалов в головном мозге [26]. Присутствие частиц магнетита может иметь большое значение для проведения радиочастотного сигнала [132] и влиять на специфические биохимические процессы в разных отделах мозга благодаря сильным локальным градиентам магнитного поля [8, 133]. Степень отложения

железа в головном мозге также играет роль в формировании магнитных свойств. Большинство таких отложений, включая ядра ферритина, обладают суперпарамагнетизмом ввиду их малого объема, что предотвращает стабилизацию магнитных доменов. Кроме того, большое значение отношения площади поверхности к объему для этих фрагментов означает, что частицы антиферромагнитных оксидов в типичных ядрах ферритина из-за нескомпенсированных спинов имеют определенный магнитный момент, которым нельзя пренебречь [42, 134]. ЯМР-анализ магнитной восприимчивости воссозданных ядер ферритина показал, что антиферромагнитные кластеры сформированы всего восемью ионами Fe^{3+} на каждую молекулу ферритина, а предельное значение 3,8 магнетонов Бора на атом, измеренное для холоферритина, достигается в присутствии лишь 24-х ионов Fe^{3+} на молекулу ферритина [44].

18.5. Экспериментальные методы

В этом разделе кратко рассмотрены некоторые стандартные и новые технологические подходы определения соединений железа в тканях и экстрактах. Детали клинического определения избытка железа, а также методы определения и характеристики наносоединений железа в патологоанатомической практике обсуждаются в других работах [58,135].

18.5.1. Целостность образца

При изучении соединений железа очень важно не допускать изменения валентности и кристаллической структуры образца в ходе подготовки тканей или выделения частиц. Это совсем непростая задача, но иногда ею пренебрегают [61]. Кроме того, методы с высоким разрешением обычно подразумевают использование интенсивных пучков электронов или рентгеновских лучей. Необходимо учитывать способность таких высокоэнергетических частиц к модифицированию анализируемой структуры и подбору соответствующих условий эксперимента или, по возможности, минимализации воздействия лучей [136].

18.5.2. Микроскопия и спектроскопия

Перлс разработал метод окрашивания оксида железа в срезах тканей с помощью смеси ферроцианида калия (1%) и соляной кислоты (1%). Эта ярко-синяя краска, называемая «берлинская лазурь», до сих пор используется как основной метод окрашивания железа [18, 137]. Хотя метод Перлса позволяет определить распределение значительной части негемового железа [73], он чувствителен только к железу в одном состоянии окисления, и не все формы тканевого железа поддаются окраске по Перлсу. Это подтверждается результатами биохимического анализа белого и серого вещества мозга (см. разд. 18.2.3). Недавно были предприняты попытки создания метода окрашивания, чувствительного к степени окисления железа [3, 92]. Для предотвращения потерь железа

из-за хорошей растворимости ферритина в водных средах [18] было предложено проводить фиксацию тканей альдегидом, впрочем, сама процедура фиксации может значительно изменить содержание и распределение железа в образце [138, 139].

Для определения концентрации металлов на уровне клеток и субклеточных компартментов используются микрозонды [140]. В последнее время анализы с помощью микрозондов стали проводить на нефиксированных замороженных срезах тканей [102]. Кроме того, условия микроскопического и спектроскопического анализа высокого разрешения изменились с внедрением зондовой масс-спектрометрии вторичных ионов для изучения биологических объектов [55], а также с появлением возможности исследования полностью гидратированных образцов методом сканирующей электронной микроскопии [141]. Мёссбауэровскую спектроскопию применяли для изучения структурных и магнитных свойств наносоединений железа в тканях, в частности для исследования гемосидерина [142], анализа богатых железом участков с целью определения доли железа в ферритине [56], а также для сравнительного анализа магнитных особенностей природных и синтетических форм данного соединения [36, 143].

Для исследования структуры ферритиновых ядер и их биоминерализации использовался метод рентгеновской абсорбционной спектроскопии [43, 107]. Варианты этого метода теперь можно применять и для анализа тканей. Например, сочетанием синхротронной рентгеновской флуоресценции с абсорбционной спектроскопией удалось с высокой чувствительностью, меньше 1 ppm, локализовать и охарактеризовать наносоединения железа во взятой при аутопсии ткани [45, 58, 61]. Этот подход позволяет получать информацию о химическом состоянии и структуре соединений железа на субклеточном уровне и помогает изучать их пространственное распределение, включая соединения со структурами типа ферригидрита, магнетита или вюститита [45].

18.5.3. Магнитные свойства

Магнитные свойства соединений железа в головном мозге человека представляют интерес с разных точек зрения. Во-первых, нарушения их метаболизма, по-видимому, изменяют форму присутствующих соединений [39, 40], так что определение их формы позволяет изучать, а по возможности, и лечить заболевания, связанные с нарушением метаболизма железа. В качестве примеров можно привести использование СКВИД-метода для определения различий в концентрации магнетита при болезни Альцгеймера и в норме [93], а также для первого обнаружения магнетита в головном мозге человека [26]. Во-вторых, методы изучения магнитных свойств позволяют количественно определять различия в содержании железа и его магнитные свойства внутри тканевых образцов и экстрактов, не подвергая их разрушению. Например, Дюбиел с соавторами использовали методы СКВИД и трансмиссионной электронной микроскопии для доказательства того, что константа одноосевой анизотропии в бледном шаре головного мозга на порядок выше, чем в печени [56]. Наконец,

различные магнитные свойства присутствующих в организме соединений железа позволяют различать их между собой. Так СКВИД-метод можно использовать для количественного анализа различных магнитных «фракций» в тканях или экстрактах [59], а отличия в магнитных свойствах тканей влияют на проведение МРТ-исследования *in vivo*, о чем будет сказано в следующем разделе.

18.5.4. Клинические методы

Потенциал магнитно-резонансной томографии для визуализации соединений железа в головном мозге чрезвычайно велик, хотя интерпретация получаемых результатов далеко не простая задача. Важно знать, каким образом находящееся в ткани железо влияет на сигнал от окружающих тканей. Высокая концентрация железа, например в базальных ганглиях, приводит к появлению областей с гипоинтенсивным сигналом в T2-взвешенном изображении. Железо также влияет на величину сигнала и фазу T2*-взвешенного изображения в режиме градиентного эха, а также на сигнал в диффузионно-взвешенном изображении, полученном в режиме спин-эха. Хотя ферритин вызывает снижение интенсивности сигнала в T2-взвешенном изображении, в T1-взвешенном изображении его присутствие может создавать зоны гиперинтенсивного сигнала из-за влияния на время релаксации T1 [12].

При изучении соединений железа в головном мозге методом МРТ важно знать магнитный момент, определяемый молекулярным окружением. Исследования парамагнитного железа *in vitro* показали, что оно увеличивает время поперечной релаксации протонов R_2 , где $R_2 = 1/T_2$. Для нормального ферритина R_2 линейно зависит от напряженности поля [12], что связано с антиферромагнитными суперпарамагнитными свойствами ядра со структурой типа ферригидрита. Для описания поведения R_2 в растворах ферритина предложена специальная модель PEDM [144]. Детальный обзор исследований взаимосвязи между структурой железа в головном мозге и параметрами магнитной релаксации проведен в работе [12].

Хотя в головном мозге встречаются различные формы железа, считается, что только ферритин и гемосидерин присутствуют в количествах, влияющих на результаты МРТ-исследования [145]. По оценкам, свыше 80% негемового железа представлено ферритином [146]. Вклад трансферрина, свободных гидратированных ионов железа, а также связанного железа в отличной от ферритина форме ничтожно мал. В принципе, железо — не единственный парамагнитный ион, способный влиять на параметры релаксации; определенное воздействие могут оказывать ионы меди и марганца. Однако эти металлы присутствуют в тканях в очень малых количествах и не влияют на результаты МРТ [145]. Недавно проведено сравнение картины распределения ферритина и гемосидерина, полученной методом ЯМР у пациентов с кавернозной гемангиомой как продолжение предыдущей работы по получению изображений гемосидерина [147]. В T2*-взвешенном изображении, представленном в режиме градиен-

тного эха, более контрастно выглядел гемосидерин, а ферритин давал более четкое T2-взвешенное изображение в режиме спин-эха [148].

18.6. Применение в клинической практике

18.6.1. Связывание железа

Хелатная терапия — привлекательная терапевтическая стратегия для лечения нейродегенеративных нарушений, связанных с локальным накоплением железа, однако ее применение ограничено некоторыми проблемами. При системных нарушениях с избыточным накоплением железа, например при β -талассемии и вызванной переливаниями крови вторичной перегрузке железом, успешно применяются хелатирующие агенты для нормализации концентрации железа в сердце и печени, однако они не влияют на концентрацию железа в головном мозге [149]. Важным фактором является и форма связываемого железа. Обычно первой мишенью хелатирующих агентов, например дефероксамина, служат небольшие лабильные пулы железа, находящиеся в большинстве клеток, а большая часть запасенного железа остается недоступной даже при значительно повышенном уровне железа. Еще одна проблема — отсутствие специфичности многих препаратов, что иногда приводит к дефициту важных для организма элементов, например цинка.

Проведение специфического связывания избыточного железа в головном мозге — совсем нетривиальная задача. В настоящее время ведутся работы по синтезу хелатирующих агентов, способных проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [13, 150]. Недавно предложено использовать для связывания железа наночастицы — соответствующий метод был показан *in vitro* на пораженных тканях при болезни Альцгеймера [151]. Наночастицы проникают сквозь ГЭБ по нескольким механизмам. Известно, что покрытие наночастиц полисорбатом способствует их транспорту [152]. Предполагают, что полисорбат позволяет наночастицам имитировать липопротеины низкой плотности, облегчая их захват и последующий эндоцитоз эндотелиальными клетками, выстилающими капилляры головного мозга [152]. Таким образом, наночастицы могут служить в качестве носителей для доставки лекарств в головной мозг, а возможность транспорта и извлечения хелатирующих агентов предоставляет возможность для нормализации уровня железа и других металлов при нейродегенеративных расстройствах. Лиу с соавторами проверили действие наносистемы в эксперименте с заключенной в парафин тканью головного мозга, извлеченной при аутопсии у больных БА [151]. В настоящее время изучается возможность связывания меди с помощью наночастиц D-пенициллина [153].

Механизмы действия хелатирующих агентов еще изучаются, но данные экспериментов на животных и результаты клинических испытаний указывают на их положительное действие. Например, клиническое состояние улучшалось у пациентов с болезнью Альцгеймера, принимавших дефероксамин, этилендиаминтетрауксусную кислоту и иодохлоргидроксихин (клиохинол) [151]. Клио-

хинол также применяли для снятия симптомов болезни Паркинсона у трансгенных мышей [154]. По-видимому, есть несколько механизмов, в соответствии с которыми клиохинол или эквивалентный хелатирующий агент тормозит образование сенильных бляшек при БА [90, 155]. Кроме того, сообщалось, что прием дефероксамина ослабляет неврологические симптомы ацерулоплазмии [156].

18.6.2. Диагностика

Постоянное усовершенствование МРТ-диагностики создало базис для изучения распределения железа в головном мозге *in vivo* [11, 12, 14, 108]. Недавно были предприняты попытки исследования накопления железа при нейродегенеративных заболеваниях на количественном уровне. Имеются веские доказательства связи между характером отложения железа в головном мозге и ослаблением сигнала T2-взвешенного изображения [12, 14], однако обратная зависимость не всегда справедлива, поскольку укорочение времени T2 может быть вызвано рядом причин. Корреляция между концентрацией железа и укорочением T2 увеличивается в сильных полях, поэтому появление в клинической практике сканнеров мощностью 3 Тл привело к развитию новых вариантов МРТ-анализа. Например, в условиях сильного поля удастся идентифицировать различия в укорочении времени T2 для гиппокампа у пациентов с БА и в контрольной группе [85]. В методе увеличения скорости релаксации в зависимости от силы поля (FDRI) используются две напряженности поля для количественного определения ферритина в головном мозге [100, 156]. В частности, была обнаружена строгая корреляция ($r > 0,99$) между результатами FDRI и уровнем железа в головном мозге, определенном при патологоанатомическом анализе [14]. В настоящее время метод МРТ используется в диагностике для определения атрофии в гиппокампе, а также для выявления состояний, способствующих возникновению опухолей или инсульта [11]. Цель проводимых научных исследований состоит в разработке методов извлечения специфической информации, которая могла бы служить биомаркером заболевания. Теоретически биомаркеры должны точно диагностировать болезнь и определять ее стадию, а также оценивать эффективность проводимого лечения. Был выбран целый ряд биомаркеров для диагностики БА и БП [11], а использование их в сочетании с новыми методами, предложенными Бартзокисом и Тышлером [100] может послужить основой для создания мощного клинического метода анализа.

18.6.3. Синтез наночастиц

Ферритин представляет интерес не только из-за его биологической функции, но и потому, что этот белок может применяться для получения наночастиц. Ферритин и подобные ему белки, например белок вируса крапчатости фасоли, используются как нанореакторы для синтеза неорганических частиц квантового

размера [157]. Апоферритин получают путем растворения железного ядра в восстановительных условиях; даже при кратковременном воздействии высокой температуры (до 65 °С) и в широком диапазоне значений pH (4–9) это соединение остается интактным [157]. Затем можно провести осаждение ядер, включая ядра со структурой типа ферригидрита и магнетита [16, 44]. Биомедицинское применение магнитных наночастиц включает направленную доставку лекарственных препаратов, лечение гипертермией, а также использование наночастиц в качестве контрастных агентов для МРТ [15]. Влияние различных соединений железа на контрастность изображения при МРТ до сих пор изучается [148], причем эти исследования касаются как роли биогенных, так и синтетических соединений железа в головном мозге. Например, МРТ может использоваться для подтверждения того, что концентрация магнитных частиц, введенных в головной мозг для термической обработки раковых клеток, достигает необходимого значения в требуемом участке мозга и что эти частицы не накапливаются в здоровых тканях [158].

18.6.4. Наночастицы железа в качестве контрастных агентов

Возможность использования парамагнитных наночастиц оксида железа в качестве контрастных агентов для МРТ достаточно активно изучается, причем для эффективности, стабильности, метаболизма и клиренса этих частиц важную роль играют размер, покрытие поверхности, заряд и другие параметры [159]. При проведении МРТ у пациентов с нейродегенеративными нарушениями магнитные частицы могут захватываться выросшей популяцией макрофагов в разрушающихся тканях, тем самым изменяя отношение T/T* в богатых макрофагами областях. Кроме того, можно исследовать возможность введения в ткани нагруженных наночастицами клеток-предшественников или стволовых клеток [160, 161]. Последнее применение имеет особое значение при нейродегенеративных состояниях, например болезнях Паркинсона или Хантингтона, когда стволовые клетки или клетки-предшественники могут заменять пострадавшие клетки [159]. После введения таких клеток необходимо следить за ними *in vivo*, чтобы оценить долю клеток, достигших намеченного участка, и время, за которое это произошло. Включение наночастиц оксида железа позволяет наблюдать за клеточными популяциями методом МРТ, хотя при этом необходимо учитывать влияние дополнительного железа в черной субстанции при болезни Паркинсона, где избыток железа уже связан с гибелью допаминергических нейронов [102].

18.7. Заключение

Сам факт увеличения концентрации железа при нейродегенеративных расстройствах не может однозначно указывать на роль железа в этиологии данных заболеваний. Однако если накопление железа связано с окислительным повреждением тканей, с этим можно бороться, используя в качестве лекарственных

препаратов хелатирующие агенты. Кроме того, многие данные, подтверждающие генетическую основу нарушений метаболизма железа, подтверждают гипотезу о ведущей роли железа в развитии многих обсуждавшихся выше заболеваний. Более глубокое изучение действия различных наносоединений железа будет способствовать лучшему пониманию патогенеза заболеваний, а также созданию методов их диагностики и лечения.

Литература

1. Harrison P.M., Arosio P. The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. *Biochim. Biophys. Acta* 1996; 1275: 161–203.
2. Markesbery W.R. Oxidative stress hypothesis in Alzheimer's disease. *Free Radic. Biol. Med.* 1997; 23: 134–147.
3. Smith M.A., Harris P.L.R., Sayre L.M., Perry G. Iron accumulation in Alzheimer disease is a source of redox-generated free radicals. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1997; 94: 9866–9868.
4. Ke Y., Qian Z. Iron misregulation in the brain: a primary cause of neurodegenerative disorders. *Lancet Neurol.* 2003; 2: 246–253.
5. Honda K., et al. Ribosomal RNA in Alzheimer disease is oxidized by bound redoxactive iron. *J. Biol. Chem.* 2005; 280: 20978–20986.
6. Goodman L. Alzheimer's disease — a clinicopathologic analysis of 23 cases with a theory on pathogenesis. *J. Nerv. Ment. Dis.* 1953; 118: 97–130.
7. Gorell J.M., et al. Increased iron-related MRI contrast in the substantia nigra in Parkinson's disease. *Neurology* 1995; 45: 1138–1143.
8. Dobson J. Nanoscale biogenic iron oxides and neurodegenerative disease. *FEBS Lett.* 2001; 496: 1–5.
9. Dobson J. Magnetic iron compounds in neurological disorders. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1012: 183–192.
10. Zecca L., Youdim M.B., Riederer P., Connor J.R., Crichton R.R. Iron, brain ageing and neurodegenerative disorders. *Nat. Rev. Neurosci.* 2004; 5: 863–873.
11. Schenck J.F., Zimmerman E.A. High-field magnetic resonance imaging of brain iron: birth of a biomarker? *NMR Biomed.* 2004; 17: 433–445.
12. Haacke E.M., et al. Imaging iron stores in the brain using magnetic resonance imaging. *Magn. Reson. Imaging* 2005; 23: 1–25.
13. Youdim M.B.H., Fridkin M., Zheng H. Novel Afunctional drugs targeting monoamine oxidase inhibition and iron chelation as an approach to neuroprotection in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases. *J. Neural. Transm.* 2004; 1435–1463 (Online).
14. Bartzokis G., et al. Brain ferritin iron may influence age- and gender-related risks of neurodegeneration. *Neurobiol. Aging* 2007; 28: 414–423.
15. Pankhurst Q.A., Connolly J., Jones S.J., Dobson J. Applications of magnetic nanoparticles in biomedicine. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 2003; 36: R167–R181.
16. Douglas T., et al. Synthesis and structure of an iron(III) sulfide—ferritin bioinorganic nanocomposite. *Science* 1995; 269: 54–57.
17. Lieu P., Heiskala M., Peterson P.A., Yang Y. The roles of iron in health and disease. *Mol. Aspects Med.* 2001; 22: 1–87.
18. Koeppen A.H. A brief history of brain iron research. *J. Neurol. Sci.* 2003; 207: 95–97.

19. Zaleski S.S. Das Eisen der Organe beim Morbus maculosus Werlhofii (The iron of the organs in Werlhofs morbus maculosus). *Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.* 1886; 23: 77–90.
20. Connor J.R. Iron acquisition and expression of iron regulatory proteins in the developing brain: manipulation by ethanol exposure, iron deprivation, and cellular dysfunction. *Dev. Neurosci.* 1994; 16: 233–247.
21. Gelman B.B. Iron in CNS disease. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1995; 54: 477–486.
22. Hallgren B., Sourander P. The non-haemin iron in the cerebral cortex in Alzheimer's disease. *J. Neurochem.* 1958; 3: 41–51.
23. Connor J.R. Snyder B.S., Arosio P., Loeffler D.A., LeWitt P. A quantitative analysis of iso-ferritins in selected regions of aged, parkinsonian, and Alzheimer's diseased brains. *J. Neurochem.* 1995; 65: 717–724.
24. Zecca L., et al. Iron, neuromelanin and ferritin in substantia nigra of normal subjects at different ages. Consequences for iron storage and neurodegenerative disorders. *J. Neurochem.* 2001; 76: 1766–1773.
25. Zecca L., et al. Interaction of neuromelanin and iron in substantia nigra and other areas of human brain. *Neuroscience* 1996; 73: 407–415.
26. Kirschvink J.L., Kobayashi-Kirschvink A., Woodford B.J. Magnetite biomineralization in the human brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1992; 89: 7683–7687.
27. Schultheiss-Grassi P.P., Wessiken R., Dobson J. TEM observation of biogenic magnetite extracted from the human hippocampus. *Biochim. Biophys. Acta* 1999; 1426: 212–216.
28. Connor J.R., Pavlick G., Karli D., Menzies S.L., Palmer C. A histochemical study of iron-positive cells in the developing rat brain. *J. Comp. Neurol.* 1995; 355: 111–123.
29. Gould R.M., Freund C.M., Palmer F., Feinstein D.L. Messenger RNAs located in myelin sheath assembly sites. *J. Neurochem.* 2000; 75: 1834–1844.
30. Patino M.M., Walden W.E. Cloning of a functional cDNA for the rabbit ferritin mRNA repressor protein. *J. Biol. Chem.* 1992; 267: 19011–19016.
31. Guo B., Yu Y., Leibold E.A. Iron regulates cytoplasmic levels of a novel iron-responsive element binding protein without aconitase activity. *J. Biol. Chem.* 1994; 269: 24252–24260.
32. Guo B., Brown F.M., Phillips J.D., Yu Y., Leibold E.A. Characterization and expression of iron regulatory protein 2 (IRP2). *J. Biol. Chem.* 1995; 270: 16529–16535.
33. Rouault T.A. The role of iron regulatory proteins in mammalian iron homeostasis and disease. *Nat. Chem. Biol.* 2006; 2: 406–414.
34. Koeppe A.H., Dickson A.C., Chu R.C., Thach R.E. The pathogenesis of superficial siderosis of the central nervous system. *Ann. Neurol.* 1993; 34: 646–653.
35. Harrison P.M., Fischbach F.A., Hoy T.G., Haggis G.H. Ferric oxyhydroxide core of ferritin. *Nature* 1967; 216: 1188–1190.
36. St Pierre T.G., Webb J., Mann S. Ferritin and hemosiderin: structural and magnetic studies of the iron core. In: Mann S., Webb J., Williams R.J.P., editors. *Bio-mineralization: Chemical and Biochemical Perspectives*. Germany: Weinheim, VCH; 1989; 295–344.
37. Massover W., Cowley J. Ultrastructure of ferritin macromolecules — lattice structure of core crystallites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1973; 70: 3847–3851.
38. Cowley J.M., Janney D.E., Gerkin R.C., Buseck P.R. The structure of ferritin cores determined by electron nanodiffraction. *J. Struct. Biol.* 2000; 13: 210–216.
39. Quintana C., et al. Preliminary high resolution TEM and electron energy loss spectroscopy studies of ferritin cores extracted from brain in patients with neurodegenerative PSP and Alzheimer diseases. *Cell. Mol. Biol.* 2000; 46: 807–820.

40. Quintana C., Cowley J.M., Marhic C. Electron diffraction and high-resolution electron microscopy studies of the structure and composition of physiological and pathological ferritin. *J. Struct. Biol.* 2004; 147: 166–178.
41. Levi S., et al. Evidence that H- and L-chains have co-operative roles in the iron-uptake mechanism of human ferritin. *J. Biochem.* 1992; 65: 710–716.
42. Chasteen N.D., Harrison P.M. Mineralization in ferritin: an efficient means of iron storage. *J. Struct. Biol.* 1999; 126: 182–194.
43. Rohrer J.S., et al. Stabilization of iron in a ferrous form by ferritin. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 13385–13387.
44. Hilty S., Webb B., Frankel R.B., Watt G.D. Iron core formation in horse spleen ferritin: magnetic susceptibility, pH, and compositional studies. *J. Inorg. Biochem.* 1994; 56: 173–185.
45. Collingwood J.F., et al. In situ characterization and mapping of iron compounds in Alzheimer's tissue. *J. Alzheimer's Dis.* 2005; 7: 267–272.
46. Khan A., Dobson J., Exley C. The redox cycling of Fe(II) by A(342). *Free Rad. Biol. Med.* 2005; 40: 557.
47. Macara I.G., Hov T.G., Harrison P.M. The formation of ferritin from apoferritin. Kinetics and mechanism of iron uptake. *Biochem. J.* 1972; 126: 151–162.
48. Powell A.K. Ferritin. Its mineralization. In: Sigel A., Sigel H., editors. *Iron Transport and Storage in Micro-Organisms, Plants, and Animals*. N-Y: Marcel Dekker; 1998; 515–561.
49. Frankel R.B., Papaefthymiou G.C., Watt G.D. Variation of superparamagnetic properties with iron loading in mammalian ferritin. *Hyperfine Interactions* 1991; 66: 71–82.
50. Zhao G., et al. Multiple pathways for mineral core formation in mammalian apoferritin: the role of hydrogen peroxide. *Biochemistry* 2003; 42: 3142–3150.
51. Prutkin L., Munro H.N. Hemosiderin: nature, formation, and significance. *Int. Rev. Exp. Pathol.* 1980; 22: 193–225.
52. O'Connell M., et al. Formation of hydroxyl radicals in the presence of ferritin and haemosiderin: is haemosiderin formation a biological protective mechanism? *Biochem. J.* 1986; 234: 727–731.
53. Gossuin Y., et al. Looking for biogenic magnetite in brain ferritin using NMR relaxometry. *NMR Biomed.* 2005; 18: 469–472.
54. Koeppen A.H., Dentinger M.P. Brain hemosiderin and superficial siderosis of the central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1988; 47: 249–270.
55. Quintana C., et al. Study of the localization of iron, ferritin and hemosiderin in Alzheimer's disease hippocampus by analytical microscopy at the subcellular level. *J. Struct. Biol.* 2006; 153: 42–54.
56. Dubiel S.M., Zablotna-Rypien B., Mackey J.B. Magnetic properties of human liver and brain ferritin. *Eur. Biophys. J.* 1999; 28: 263–267.
57. Jellinger K., et al. Iron—melanin complex in substantia nigra of parkinsonian brains: an X-ray microanalysis. *J. Neurochem.* 1992; 59: 1168–1171.
58. Collingwood J.F., Dobson J. Mapping and characterization of iron compounds in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2006; 10: 215–222.
59. Hautot D., Pankhurst Q.A., Dobson J. Superconducting quantum interference device measurements of dilute magnetic materials in biological samples. *Rev. Sci. Instrum.* 2005; 76: 045101.
60. Castelnau P.A., et al. Abnormal iron deposition associated with lipid peroxidation in transgenic mice expressing interleukin-6 in the brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1998; 57: 268–282.

61. Mikhaylova A., et al. Detection, identification and mapping of iron anomalies in brain tissue using X-ray absorption spectroscopy. *J. R. Soc. Interface* 2005; 2: 33–37.
62. Dobson J. Investigation of age-related variations in biogenic magnetite levels in the human hippocampus. *Exp. Brain. Res.* 2002; 144: 122–126.
63. Zecca L., Zucca F.A., Wilms H., Sulzer D. Neuromelanin of the substantia nigra: a neuronal black hole with protective and toxic characteristics. *Trends Neurosci.* 2003; 26: 578–580.
64. Gotz M., Double K., Gerlach M., Youdim M.B.H., Reiderer P. The relevance of iron in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1012: 193–208.
65. Good P.F., Olanow C.W., Perl D.P. Neuromelanin-containing neurons of the substantia nigra accumulate iron and aluminum in Parkinson's disease: a LAMMA study. *Brain Res.* 1992; 593: 343–346.
66. Zecca L., et al. The absolute concentration of nigral neuromelanin, assayed by a new sensitive method, increases throughout the life and is dramatically decreased in Parkinson's disease. *FEBS Lett.* 2002; 510: 216–220.
67. Spatz H. Uber den Eisennachweis in Gehirn, besonders in Zentren des extrapyramidal-motorischen Systems (On the visualization of iron in the brain, especially in the centers of the extrapyramidal motor system). *Z. Ges. Neurol. Psychiatr.* 1922; 77: 261–390.
68. Drayer B., et al. MRI of brain iron. *AJR Am. J. Roentgenol.* 1986; 147: 103–110.
69. Connor J.R., Snyder B.S., Beard J.L., Fine R.E., Mufson E.J. Regional distribution of iron and iron-regulatory proteins in the brain in aging and disease. *J. Neurosci. Res.* 1992; 31: 327–335.
70. Connor J.R., Menzies S.L., Burdo J.R., Boyer P.J. Iron and iron management proteins in neurobiology. *Pediatr. Neurol.* 2001; 25: 118–129.
71. Connor J.R., Boeshore K.L., Benkovic S.A. Isoforms of ferritin have a specific cellular distribution in the brain. *J. Neurosci. Res.* 1994; 37: 461–465.
72. Connor J.R., Menzies S.L. Cellular management of iron in the brain. *J. Neurol. Sci.* 1995; 134(Suppl): 33–44.
73. Morris C.M., Candy J.M., Oakley A.E., Bloxham C.A., Edwardson J.A. Histochemical distribution of non-haem iron in the human brain. *Acta Anat. Suppl. (Basel)* 1992; 144: 235–257.
74. Burdo J.R., Conner J.R. Brain iron uptake and homeostatic mechanisms: an overview. *Biometals* 2003; 16: 63–75.
75. Kaplan J., Kushner J.P. Mining the genome for iron. *Nature* 2000; 403: 711–713.
76. Wu L.J., et al. Expression of the iron transporter ferroportin in synaptic vesicles and the blood-brain barrier. *Brain Res.* 2004; 1001: 108–117.
77. Moos T., Trinder D., Morgan E.H. Cellular distribution of ferric iron, ferritin, transferrin and divalent metal transporter 1 (DMT1) in substantia nigra and basal ganglia of normal and beta 2-microglobulin deficient mouse brain. *Cell. Mol. Biol.* 2000; 46: 549–561.
78. Burdo J.R., et al. Distribution of divalent metal transporter 1 and metal transport protein 1 in the normal and Belgrade rat. *J. Neurosci. Res.* 2001; 66: 1198–1207.
79. Focht S.J., et al. Regional distribution of iron, transferrin, ferritin and oxidatively modified proteins in young and aged Fischer 344 rat brains. *Neuroscience* 1997; 79: 255–261.
80. Connor J.R., editor *Metals and Oxidative Damage in Neurological Disorders*. N-Y: Plenum Press; 1997.
81. Crichton R.R., Ward R.J., *Metal-Based Neurodegeneration: From Molecular Mechanisms To Therapeutic Strategies*. Chichester; Hoboken, NJ: John Wiley Sons, Inc; 2006.

82. Curtis A.R.J., et al. Mutations in the gene encoding ferritin light polypeptide causes dominant adult-onset basal ganglia disease. *Nat. Genet.* 2001; 28: 350–354.
83. Zhao G., Arosio P., Chasteen N.D. Iron(II) and hydrogen peroxide detoxification by human H-chain ferritin. An EPR spin-trapping study. *Biochemistry* 2006; 45: 3429–3436.
84. Morris C.M., Kerwin J.M., Edwardson J.A. Non-haem iron histochemistry of the normal and Alzheimer's disease hippocampus. *Neurodegeneration* 1994; 3: 267–275.
85. Zimmerman E.A., Li Z., O'Keefe T., Schenck J.F. High field strength (3 T) magnetic resonance imaging in Alzheimer's disease. *Ann. Neurol.* 2003; 54(suppl 7): S68.
86. Nakata-Kudo Y., et al. Microbleeds in Alzheimer disease are more related to cerebral amyloid angiopathy than cerebrovascular disease. *Dement. Geriatr. Cogn. Disord.* 2006; 22: 8–14.
87. Bartzokis G. Age-related myelin breakdown: a developmental model of cognitive decline and Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2004; 25: 5–18.
88. Rogers J.T., et al. An iron-responsive element type II in the 5'-untranslated region of the Alzheimer's amyloid precursor protein transcript. *J. Biol. Chem.* 2002; 277: 45518–45528.
89. Mantyh P.W., et al. Aluminum, iron and zinc ions promote aggregation of physiological concentrations of beta-amyloid peptide. *J. Neurochem.* 1993; 61: 1171–1174.
90. House E., et al. Aluminium, iron, zinc and copper influence the in vitro formation of amyloid fibrils of A642 in a manner which may have consequences for metal chelation therapy in Alzheimer's disease. *J. Alzheimer's Dis.* 2004; 6: 291–301.
91. Khan A., Ashcroft A.E., Higenell V., Korchazhkina O.V., Exley C. Metals accelerate the formation and direct the structure of amyloid fibrils of NAC. *J. Inorg. Biochem.* 2005; 99: 1920–1927.
92. Sayre L.M., et al. In situ oxidative catalysis by neurofibrillary tangles and senile plaques in Alzheimer's disease: a central role for bound transition metals. *J. Neurochem.* 2000; 74: 270–279.
93. Hautot D., Pankhurst Q.A., Khan N., Dobson J. Preliminary evaluation of nanoscale biogenic magnetite and Alzheimer's disease. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Lett.* 2003; 270: S62–S64.
94. Klintworth G.K. Cerebral iron deposition in Huntington's disease. In: Barbeau A., Brunette J.R., editors. *Proceedings of the Second International Congress of Neurogenetics and Neuroophthalmology of the World Federation of Neurology*; Excerpta Medica Foundation; Amsterdam: 1969. p. 589–596.
95. Dexter D.T., et al. Alterations in the levels of iron, ferritin and other trace metals in Parkinson's disease and other neurodegenerative diseases affecting the basal ganglia. *Brain* 1991; 114: 1953–1975.
96. Bartzokis G., Cummings J., Perlman S., Hance D.B., Mintz J. Increased basal ganglia iron levels in Huntington disease. *Arch. Neurol.* 1999; 56: 569–574.
97. Qian Z.M., Wang Q. Expression of iron transport proteins and excessive iron accumulation in the brain in neurodegenerative disorders. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 1998; 27: 257–267.
98. Hilditch-Maguire P., et al. Huntingtin: an iron-regulated protein essential for normal nuclear and perinuclear organelles. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 2789–2797.
99. Savoiardo M., Strada L., Oliva D., Girotti F., D'Incerti L. Abnormal MRI signal in the rigid form of Huntington's disease. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1991; 54: 888–891.
100. Bartzokis G., Tishler T.A. MRI evaluation of basal ganglia ferritin iron and neurotoxicity in Alzheimer's and Huntington's disease. *Cell. Mol. Biol.* 2000; 46: 821–834.

101. Reiderer P., et al. Transition metals, ferritin, glutathione, and ascorbic acid in parkinsonian brains. *J. Neurochem.* 1989; 52: 515–520.
102. Oakley A.E., et al. Individual dopaminergic neurons show raised iron levels in Parkinson disease, *Neurology* 2007; 68: 1820–1825.
103. Kaur D., Andersen J. Does cellular iron dysregulation play a causative role in Parkinson's disease? *Ageing Res. Rev.* 2004; 3: 327–343.
104. Bartzokis G., Tishler T.A., Shin I.S., Lu P.H., Cummings J.L. Brain ferritin iron as a risk factor for age at onset in neurodegenerative diseases. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1012: 224–236.
105. Costello D.J., Walsh S.L., Harrington H.J., Walsh C.H. Concurrent hereditary haemochromatosis and idiopathic Parkinson's disease: a case report series. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2004; 75: 631–633.
106. Moos T., Morgan E.H. The metabolism of neuronal iron and its pathogenic role in neurological disease: review. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1012: 1012–1014.
107. Griffiths P.D., Dobson B.R., Jones G.R., Clarke D.T. Iron in the basal ganglia in Parkinson's disease — an in vitro study using extended X-ray absorption fine structure and cryo-electron microscopy. *Brain* 1999; 122: 667–673.
108. Hayflick S.J., Hartman M., Coryell J., Gitschier J., Rowley H. Brain MRI in neurodegeneration with brain iron accumulation with and without PANK2 mutations. *AJNR Am. J. Neuroradiol.* 2006; 27: 1230–1233.
109. Zhou B., et al. A novel pantothenate kinase gene (PANK.2) is defective in Hallervorden-Spatz syndrome. *Nat. Genet.* 2001; 4: 345–349.
110. Harris Z.L., Klomp L.W.J., Gitlin J.D. Aceruloplasminemia: an inherited neurodegenerative disease with impairment of iron homeostasis. *Am. J. Clin. Nutr.* 1998; 67(Suppl): 972S–977S.
111. Cammermeyer J. Deposition of iron in paraventricular areas of the human brain in hemochromatosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1947; 6: 111–127.
112. McDougal D.B., Adams R.D. The neuropathological changes in hemochromatosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 1950; 9: 117–118.
113. Morita H., et al. Hereditary ceruloplasmin deficiency with hemosiderosis: a clinicopathological study of a Japanese family. *Ann. Neurol.* 1995; 37: 646–656.
114. Kawanami T., et al. Hereditary caeruloplasmin deficiency: clinicopathological study of a patient. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 1996; 61: 506–509.
115. Crompton D.E., et al. Neuroferritinopathy: a window on the role of iron in neurodegeneration. *Blood Cells Mol. Dis.* 2002; 29: 522–531.
116. Vidal R., et al. Intracellular ferritin accumulation in neural and extraneural tissue characterizes a neurodegenerative disease associated with a mutation in the ferritin light polypeptide gene. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2004; 63: 363–380.
117. Perez M., et al. Ferritin is associated with aberrant tau filaments present in progressive supranuclear palsy. *Am. J. Path.* 1998; 152: 1531–1539.
118. Miszkiel K.A., et al. The measurement of R2, R2* and R2' in HIV-infected patients using the prime sequence as a measure of brain iron deposition. *Magn. Reson. Imaging* 1997; 15: 1113–1119.
119. Gelmann B.B., et al. Siderotic cerebral macrophages in the acquired immunodeficiency syndrome. *Arch. Pathol. Lab. Med.* 1992; 116: 509–516.
120. Butensky E., Kennedy C.M., Lee M.M., Harmatz P., Miaskowski C. Potential mechanisms for altered iron metabolism in human immunodeficiency virus disease. *J. Assoc. Nurses. AIDS Care* 2004; 15: 31–45.

121. Puccio H., Koenig M. Recent advances in the molecular pathogenesis of Friedreich ataxia. *Hum. Mol. Genet.* 2000; 9: 887–892.
122. Campuzano V., et al. Friedreich's ataxia: autosomal recessive disease caused by an intronic GAA triplet repeat expansion. *Science* 1996; 271: 1423–1427.
123. Waldvogel D., van Gelderen P., Hallett M. Increased iron in the dentate nucleus of patients with Friedreich's ataxia. *Ann. Neurol.* 1999; 46: 123–125.
124. Haba-Rubio J., et al. Restless legs syndrome and low brain iron levels in patients with haemochromatosis. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 2005; 76: 1009–1010.
125. Camaschella C. Understanding iron homeostasis through genetic analysis of haemochromatosis and related disorders. *Blood* 2005; 106: 3710–3717.
126. Nielsen J.E., Jensen L.N., Krabbe K. Hereditary hemochromatosis: a case of iron accumulation in the basal ganglia associated with a parkinsonian syndrome. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 1995; 59: 318–321.
127. Berg D, et al. The basal ganglia in haemochromatosis. *Neuroradiology* 2000; 42: 9–13.
128. Connor J.R., et al. Is hemochromatosis a risk factor for Alzheimer's disease? *J. Alzheimer's Dis.* 2001; 3: 471–477.
129. Moalem S., et al. Are hereditary hemochromatosis mutations involved in Alzheimer disease? *Am. J. Med. Genet.* 2000; 93: 58–66.
130. Pulliam J.F., et al. Association of HFE mutations with neurodegeneration and oxidative stress in Alzheimer's disease and correlation with APOE. *Am. J. Med. Genet.* 119B: 2003; 48–53.
131. de Boer C.B., Dekkers M.J. Thermomagnetic behaviour of haematite and goethite as a function of grain size in various non-saturating magnetic fields. *Geophys. J. Int.* 1998; 133: 541–552.
132. Cranfield C.G., et al. Biogenic magnetite in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Proc. R. Soc. Lond. B.* 271: 2004; S436–S439.
133. Till U., Timmel C.R., Brocklehurst B., Hore P.J. The influence of very small magnetic fields on radical recombination reactions in the limit of slow recombination. *Chem. Phys. Lett.* 1998; 298: 7–14.
134. Brooks R.A., Vymaza J., Goldfarb R.B., Bulte J.W.M., Aisen P. Relaxometry and magnetometry of ferritin. *Magn. Reson. Med.* 1998; 15: 227–235.
135. Jensen P.D. Evaluation of iron overload. *Br. J. Haematol.* 2004; 124: 697–711.
136. Pan Y., et al. Electron beam damage studies of synthetic 6-line ferrihydrite and ferritin molecule cores within a human liver biopsy. *Micron* 2006; 37: 403–411.
137. Perls M. Nachweis von Eisenoxyd in gewissen Pigmenten (Demonstration of iron oxide in certain pigments). *Virchows Arch. Pathol. Anat. Physiol. Klin. Med.* 1867; 39: 42–48.
138. Chwiej J., et al. Preparation of tissue samples for X-ray fluorescence microscopy. *Spectrochim. Acta B* 2005; 60: 1531–1537.
139. Dobson J., Grassi P. Magnetic properties of human hippocampal tissue: evaluation of artefact and contamination sources. *Brain Res. Bull.* 1996; 39: 255–259.
140. Watt F. Nuclear microscope analysis in Alzheimer's and Parkinson's disease: a review. *Cell Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* 1996; 42: 17–26.
141. Thiberge S., et al. Scanning electron microscopy of cells and tissues under fully hydrated conditions. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 2004; 101: 3346–3351.
142. Dickson D.P.E., et al. Mossbauer spectroscopy, electron microscopy and electron diffraction studies of the iron cores in various human and animal haemosiderins. *Biochim. Biophys. Acta—Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1988; 957: 81–90.

143. Wade V.J, et al. Structure and composition of ferritin cores from pea seed. *Biochim. Biophys. Acta* 1993; 1161: 91–96.
144. Gossuin Y., Roch A., Bue F.L., Muller R.N., Gillis P. Nuclear magnetic relaxation dispersion of ferritin and ferritin like magnetic particle solutions: a pH-effect study. *Magn. Reson. Med.* 2001; 46: 476–481.
145. Schenck J.F. Magnetic resonance imaging of brain iron. *J. Neurol. Sci.* 2003; 207: 99–102.
146. Dedman D.J., et al. Iron and aluminium in relation to brain ferritin in normal individuals and Alzheimer's-disease and chronic renal-dialysis patients. *Biochem. J.* 1992; 287: 509–514.
147. Vymazal J., Urgosik D., Bulte J.W. Differentiation between haemosiderin and ferritin-bound brain iron using nuclear magnetic resonance and magnetic resonance imaging. *Cell Mol. Biol.* 2000; 46: 835–842.
148. Haque T.L., et al. MR contrast of ferritin and haemosiderin in the brain: comparison among gradient-echo, conventional spin-echo and fast spin-echo sequences. *Eur. J. Radiol.* 2003; 48: 230–236.
149. Porter J.B., et al. Recent insights into interactions of deferoxamine with cellular and plasma iron pools: implications for clinical use. *Ann. NY Acad. Sci.* 2005; 1054: 155–168.
150. Bush A.I. Metal complexing agents as therapies for Alzheimer's disease. *Neurobiol. Aging* 2002; 23: 1031–1038.
151. Liu G., et al. Nanoparticle iron chelators: a new therapeutic approach in Alzheimer disease and other neurologic disorders associated with trace metal imbalance. *Neurosci. Lett.* 2006; 406: 189–193.
152. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 65–81.
153. Cui Z.R., et al. Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2005; 59: 263–272.
154. Kaur D., et al. Genetic or pharmacological iron chelation prevents MPTP-induced neurotoxicity *in vivo*: a novel therapy for Parkinson's disease. *Neuron* 2003; 37: 899–909.
155. Richardson D.R. Novel chelators for central nervous system disorders that involve alterations in the metabolism of iron and other metal ions. *Ann. NY Acad. Sci.* 2004; 1012: 326–341.
156. Bartzokis G., et al. MR evaluation of brain iron in young adults and older normal males. *Magn. Reson. Imaging* 1997; 15: 29–35.
157. Mayes E.L., Mann S., Mineralization in nanostructured biocompartments: biomimetic ferritins for high density data storage. In: Niemeyer C.M., Mirkin C.A., editors. *John Wiley Nanobotechnology: Concepts, Applications and Perspectives.* 2004; 278–287.
158. St. Pierre T.G., et al. Non-invasive measurement and imaging of tissue iron oxide nanoparticle concentrations *in vivo* using proton relaxometry. *J. Phys: Conf. Ser.* 2005; 17: 122–126.
159. Corot C., Robert P., Idee J.M., Port M. Recent advances in iron oxide nanocrystal technology for medical imaging. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2006; 58: 1471–1504.
160. Bulte J.W., Arbab A.S., Douglas T., Frank J.A. Preparation of magnetically labeled cells for cell tracking by magnetic resonance imaging. *Methods Enzymol.* 2004; 386: 275–299.
161. Daldrop-Link H.E., et al. Targeting of hematopoietic progenitor cells with MR contrast agents. *Radiology* 2003; 228: 760–767.

ПРИМЕНЕНИЕ НАНОТЕХНОЛОГИИ В НАУКАХ О ЖИЗНИ: ПОЛЬЗА ИЛИ РИСК?

Юн-Сик Ли и Мьонг-Хаинг Чо

19.1. Введение

Произошедший недавно технологический переход от микросистем к наносистемам может чрезвычайно сильно повлиять на развитие наук о жизни. Стремительное развитие нанотехнологии открывает невиданные доселе возможности: теперь можно получать изображения объектов в нанометровом диапазоне, проникать внутрь живых систем, создавать конструкции для целевой доставки лекарств и генов, добиваться успехов в области регенеративной медицины и т. д. [1]. В настоящее время наноматериалы широко используются — это касается и научных и коммерческих разработок [2, 3]. На рис. 19.1 представлен список применений наночастиц в биологии и медицине.



Рис. 19.1. Повсеместное применение наночастиц в биологии и медицине

Перевод с англ. Т. Мосоловой

В данной главе мы попытались отметить новейшие и активно развивающиеся направления нанотехнологии, имеющие значение для биологии и биомедицины и наиболее серьезные проблемы, влияющие на ее дальнейшее развитие. Здесь же представлен обзор последних достижений в этой области. В заключении этой главы приведена информация о на проблемах, связанных с применением наноматериалов — токсикологических последствиях и побочных эффектах действия наночастиц.

19.2. Доставка лекарств и генов

Доставка генов в терапевтических целях заключается во введении в клетки нуклеиновых кислот, использующихся в качестве препаратов для лечения некоторых заболеваний. В большинстве случаев генетический материал нужно включить в систему направленного транспорта таким образом, чтобы избежать его расщепления ферментами и помочь проникнуть через физиологические барьеры организма и/или клеточные мембраны [4]. В последние годы были разработаны два основных способа доставки генов — вирусный и невирусный. Основными преимуществами вирусных систем доставки являются высокая эффективность инфицирования клеток или тканей и долгосрочная экспрессия генов [5]. Впрочем, вирусные конструкторы не лишены недостатков. Например, активно используемые рекомбинантные аденовирусные векторы, обладающие высоким сродством к эпителию дыхательных путей и высокоэффективные при трансфекции клеток легких [6], токсичны и иммуногенны при повторном введении [7–9]. Кроме того, вирусные векторы сложно производить в больших количествах [10]. Невирусные векторы — более безопасная альтернатива: их можно вводить повторно, не вызывая сильного иммунного ответа организма хозяина. К тому же они отличаются высокой специфичностью, направленным действием и стабильностью при хранении, а их производство в больших масштабах не представляет больших трудностей [11].

Для повышения устойчивости и эффективности гена или лекарства, а также для усиления их захвата клетками, на основе различных биоматериалов было создано немало синтетических векторов [12]. Это катионные полимеры, катионные липиды, липосомы, производные хитозана, неорганические наночастицы и дендримеры [5]. Все перечисленные системы оказались пригодными для трансфекции клеток в культуре. Однако большинство из них нельзя использовать *in vivo*, поскольку они не способны проникать через физиологические барьеры, вступают в нежелательные взаимодействия в сыворотке крови и уничтожаются фагоцитами. Применение нанотехнологических методов позволяет преодолеть эти трудности путем изменения свойств наноносителей.

Большое значение имеет способность наночастиц доставлять гены или лекарства к определенным клеткам или тканям-мишеням. Для эффективного транспорта к целевым органам используют специфическое взаимодействие между лигандом и рецептором. Вторым подходом к решению проблемы направленного действия является использование механизма пассивного накопле-

ния наноконтейнеров в тканях-мишенях за счет неспецифических взаимодействий, обусловленных физико-химическими свойствами наночастиц, что определяет характер распределения последних в организме [13]. Кроме того, на транспорт наночастиц влияют поверхностный заряд [14], стабилизация поверхности полиэтиленгликолем [15] и гидрофобность [16]. Следовательно, при синтезе нанообъектов с целью переноса лекарств или генов необходимо учитывать физико-химические свойства материала. Еще одним важным фактором является размер частиц. Если они слишком крупны (более 200 нм), то они не способны проходить сквозь клеточные мембраны и очень быстро выводятся из организма. С другой стороны, частицы размером менее 100 нм могут оказывать токсическое действие. Установлено, что частицы диаметром 20 нм примерно в 100 раз более токсичны, чем частицы размером 2 мкм [17].

Чаще всего системы транспорта лекарственных препаратов и генов вводят в организм перорально или внутривенно. Однако при таких классических способах доставки в организм количество вводимого препарата превышает необходимую дозу, что нередко приводит к токсичности и низкой специфичности действия лекарства. Для решения данной проблемы в качестве переносчиков обычно используют наночастицы, созданные из биоразлагаемых полимеров [18]. В этой области достигнуты большие успехи, в частности при исследовании моделей различных заболеваний, в том числе онкологических. Например, введение паклитаксела в составе эмульгированных смол позволяет снизить устойчивость к нему в человеческих клетках рака прямой кишки. Более того, при лечении паклитакселом у мышей с привитыми человеческими раковыми клетками прямой кишки отмечалось значительное торможение роста опухоли. Это исследование показывает, что использование наночастиц при доставке традиционного противоопухолевого средства увеличивает эффективность действия препарата за счет преодоления устойчивости к нему [19].

Легкие — орган, доступный для местного введения лекарств и генов. На этом основан ряд исследований, цель которых состоит в разработке терапевтических подходов к лечению различных легочных заболеваний, включая злокачественные опухоли [20]. На модельных животных были опробованы разные подходы к доставке генов в легкие: внутривенные инъекции, вливания через нос или через трахею [21]. Однако данные методы оказались либо слишком травмирующими, либо непригодными для транспортировки гена по дыхательным путям. В последние годы активно развивается аэрозольная технология доставки препаратов для лечения различных заболеваний, в том числе рака. В ходе совершенствования этого метода были созданы невирусные нановекторы, доставляющие ДНК. Во-первых, они выдерживают процесс распыления, а во-вторых, оптимально «работают» в легких. Среди невирусных векторных систем особый интерес представляют векторы на основе производных полиэтиленамина (ПЭИ); недавно было показано возрастание их эффективности при присоединении остатков сахаров [22]. Высокая способность производных ПЭИ к переносу генов, возможно, связана с буферным действием ПЭИ в эндосомах, что приводит к массовому накоплению частиц, вслед за которым происходит

пассивный приток ионов хлора. Модифицированный глюкозой ПЭИ в составе аэрозоля оказался весьма удобен для доставки генов в дыхательные пути мыши с модельным раком легкого [10, 23]. Таким образом, аэрозольная технология не только позволяет успешно транспортировать необходимый ген, но и является неинвазивным способом доставки генов в легкие.

Возможность доступа лекарств в центральную нервную систему (ЦНС) изучается рядом исследователей на протяжении многих лет [24, 25]. Большинство гидрофильных веществ, например некоторые антибиотики, противоопухолевые препараты или новые биотехнологические продукты, не способны проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Поэтому для улучшения транспорта лекарств в ЦНС использовали модификации молекул фармакологических средств, оказывающих осмотическое воздействие на эндотелий капилляров головного мозга, которые образуют главный барьер между кровотоком и мозгом, а также прямое интрацеребральное введение препаратов [26]. Применение биосовместимых частиц, например, липосом, может помочь в преодолении ГЭБ, одновременно сохраняя лекарство от разрушения и ослабляя его токсическое действие. Было показано, что пероральный прием противотуберкулезного препарата, включенного в наночастицы из сополимера молочной и гликолевой кислот, приводит к эффективной доставке его в головной мозг мышей, инфицированных *Mycobacterium tuberculosis* H(37)Rv [27]. Таким образом, система переноса лекарственных препаратов на основе наночастиц в будущем может помочь переходу лекарств через ГЭБ, непроницаемый для свободных препаратов.

19.3. Быстрый анализ биологических объектов

Быстрое и чувствительное определение патогенных микроорганизмов играет важную роль в современной жизни, в частности в целях борьбы с терроризмом. Сейчас разработано несколько способов определения патогенов, однако их практическое применение зачастую ограничено низкой чувствительностью, довольно долгим временем анализа и низкой воспроизводимостью результатов. В последние годы в области биоанализа стали все больше применять конъюгаты наноматериалов с различными биологическими молекулами. Активное использование наноматериалов объясняется острой необходимостью создания чувствительных неизотопных методов анализа. Кроме того, нанотехнологический подход целесообразно применить для определения широкого спектра бактериальных патогенов, которые могут использоваться в качестве биологического оружия [28]. Например, недавно был создан метод иммуноанализа с использованием квантовых точек, который позволяет определять патогенный организм *Listeria monocytogenes*, заражающий пищевые продукты и вызывающий опасную инфекцию [29]. Возбудителя инфекционного заболевания кошек, *Feline calicivirus*, удастся определить по характерному виду рамановского спектра с помощью золотых наночастиц, конъюгированных с моноклональными антителами [30]. Таким образом, развитие нанотехнологии позволяет открыть

новую страницу в использовании биосенсоров для быстрого и сверхчувствительного анализа патогенных микроорганизмов.

Нанобиотехнология, основанная на биомедицинском применении наноматериалов или наноструктур, — одна из наиболее активно развивающихся отраслей нанотехнологий. Уже достигнуты большие успехи в области диагностики и лечения злокачественных опухолей. Были синтезированы наночастицы для направленной доставки лекарств и генов к раковым клеткам, а также для синтеза биомаркеров и для получения изображений новообразований *in vivo* [31]. Следует сказать, что с помощью наночастиц можно проводить селективное обнаружение опухолевых маркеров для мониторинга развития болезни и хода лечения. Такой подход уже активно используется в диагностике опухолевых заболеваний [32, 33]. Например, наночастицы золота с олигонуклеотидами на поверхности применялись для мультиплексного анализа следующих опухолевых маркеров: простатоспецифического антигена, человеческого хорионического гонадотропина (маркер рака яичек), а также α -фетопротейна (маркер рака печени), и обеспечили высокую чувствительность и специфичность анализа [34]. Полупроводниковые квантовые точки используются для обнаружения опухолевых маркеров в крови и гистологических образцах флуоресцентными методами. [35]. Сравнительно недавно были разработаны способы прямого и предварительного нацеливания для активной направленной доставки наночастиц к опухолевым тканям [36]. При прямом нацеливании наночастицы ковалентно связывают с определенным лигандом и одновременно с ним вводят лекарство. При предварительном нацеливании препарат остается свободным и вводится через определенное время, необходимое для накопления антител в опухоли, — либо с применением системы авидин/биотин, либо с помощью антител [37, 38]. Есть острая необходимость создания метода, который позволил бы специфически распознавать ангиогенез в опухолевых тканях. Недавно была продемонстрирована возможность получения изображений образующихся сосудов методом ядерного магнитного резонанса с помощью липидных наночастиц, меченных альфа- ν /бета-3-интегрином [39]. Некоторые научные группы применяли другой диагностический метод, в котором флуоресцентные кремниевые наноболочки, конъюгированные с фолатом, используются для обнаружения злокачественных клеток с высоким уровнем экспрессии данных рецепторов [40]. Наноболочки состоят из диэлектрического кремниевого ядра, покрытого тонким слоем золота. Изменяя соотношение радиусов ядра и оболочки, можно получить наночастицы, способные рассеивать или поглощать свет в широком спектральном диапазоне, включая ближнюю инфракрасную область (излучение с такой длиной волны наилучшим образом проникает в ткани). Лоо с соавторами использовали наноболочки в сочетании с биомаркером рака молочной железы для обнаружения и избирательного уничтожения раковых клеток [41]. Недавно были созданы зонды на основе наночастиц, так называемые SERS Dots, которые позволяют получить информацию с помощью метода поверхностно усиленного рамановского рассеяния (SERS). Например, такие зонды использовали для обнаружения опухолевых маркеров HER2 и CD10 на живых

клетках [42]. Зонды представляют собой кремниевые наносферы с покрытием из серебра с включением органических соединений, имеющих характерный рамановский спектр. Новые наносистемы открывают и другие диагностические и терапевтические возможности для борьбы с раком. Однако в настоящее время еще не создано технологии, позволяющей избирательно воздействовать на опухолевые клетки. Необходимо продолжать работу, в частности нужны дополнительные исследования *in vivo* на животных с различными видами опухолей. Тем не менее перспективность наночастиц для направленного воздействия на раковые клетки была многократно подтверждена экспериментально.

19.4. Тканевая инженерия

Для замены поврежденных человеческих тканей и органов было предложено использовать биосовместимые нановолокна. Поскольку у нановолокон, изготовленных из биосовместимых полимеров, большая удельная площадь поверхности, их использование для создания протезов, косметических компонентов и кремов, заменителей костной ткани и искусственных сосудов представляется вполне перспективным [43].

В настоящее время задача исследователей состоит в подборе условий электроспиннинга для использования массивов нановолокон из разных полимеров в качестве полифункциональных мембран, биомедицинских структурных элементов, защитных покрытий тканей, наполнителей фильтров для разделения частиц размером менее микрометра, композитной арматуры и элементов наноэлектронных приборов [44]. Недавно всеобщее внимание привлек проводящий полимер полианилин. Так, Ли с соавторами показали, что нановолокна из полианилина и желатина представляют собой новый проводящий материал, пригодный для получения биосовместимых каркасов для тканевой инженерии [45]. Кроме того, большой интерес вызывает разработка систем доставки лекарств на основе нановолокон. Например, трехмерные каркасы из нановолокон, обеспечивающие контролируемое высвобождение заключенных в них факторов роста, с успехом применяются для регенерации тканей [46]. Благодаря этим и подобным исследованиям полимерные нановолокна стали использоваться и в других областях биомедицины и биотехнологии.

19.5. Вопросы безопасности

Для оценки возможного отрицательного влияния наночастиц на здоровье, необходимо понимать принципы работы защитного механизма живого организма и учитывать способность наночастиц вызывать иммунный ответ. Эволюционируя как вид, человек многократно подвергался воздействию мелких частиц, так что в его организме возникли определенные системы защиты.

Основные пути проникновения наночастиц в человеческий организм следующие: ингаляция (легкие), контакт (кожа) и проглатывание (кишечник), причем у всех перечисленных органов есть барьеры, препятствующие проникнове-

нию мелких частиц [47]. Но, несмотря на существование таких преград, наноматериалы могут оказывать вредное воздействие на человека, поскольку его иммунная система не настроена на борьбу именно с наночастицами.

Следовательно, необходимо оценивать возможный риск и регулировать использование наноматериалов с целью защиты здоровья человека и окружающей среды. Для адекватной оценки опасности наноматериалов необходимо знать их полную характеристику, поскольку реакционная способность наночастиц зависит от многих факторов. Полное описание наноматериала включает в себя определение его размера и формы, химических свойств, растворимости, площади и свойств поверхности, степени дисперсности и других физико-химических параметров. Данное определение может быть длительным, дорогостоящим и сложным, поэтому необходимо выбирать минимальный набор характеристик, достаточных для оценки безопасности наноматериала. К ним относятся размер частиц, их форма, дисперсность, физико-химические свойства, площадь поверхности и ее химические свойства [48].

Как отмечалось выше, наноматериалами называют такие материалы, размер структурных составляющих которых хотя бы в одном измерении не превышает 100 нм. Следовательно, необходимо разработать подходящие методы оценки размеров наночастиц. Есть множество способов определения распределения наночастиц по размерам: светорассеяние, анализ динамической подвижности, электронная микроскопия и другие. Однако необходимо учитывать, что размер и форма наноматериала, взаимодействующего с биомолекулами в живом организме, может отличаться от тех же параметров для исходных нанообъектов. Взаимодействие между наноматериалом и биологическими системами обычно происходит на поверхности материала, поэтому одним из основных факторов, определяющих токсичность, является площадь поверхности. Причем следует различать внешнюю поверхность и внутреннюю поверхность (с учетом пористости). Для определения этих параметров используют методы газовой адсорбции, титрования и диффузии аэрозолей [49, 50]. Важно учесть, что площадь поверхности и пористость наноматериала в биологической среде могут изменяться в результате связывания биологических молекул или самопроизвольной агрегации. Поверхностный заряд наноструктуры также в значительной степени влияет на ее токсичность, поскольку определяет дисперсность системы и влияет на поведение наноматериала в живом организме.

19.6. Заключение

Стремительное развитие нанотехнологии оказывает значительное влияние на жизнь современного человека. Но применение достижений нанотехнологии не должно оказывать вредного воздействия на здоровье и на окружающую среду. Для предсказания и предотвращения возможной токсичности наноматериалов необходимо иметь их полную характеристику в условиях биологического окружения. Классический тест для определения токсичности материалов может оказаться непригодным для оценки вредного воздействия наноматериалов на здо-

ровье человека и состояние окружающей среды. Поэтому необходимо регламентировать производство и использование наноматериалов в соответствии с соглашениями, совместно разработанными исследовательскими лабораториями, правительственными организациями и промышленными компаниями. На основе этих соглашений изучение новых наноматериалов должно выполняться параллельно с многосторонним анализом их влияния на здоровье человека.

Благодарности

Подготовка части этой главы была проведена при финансовой поддержке Института наносистем Национального исследовательского центра Кореи и Корейской федерации ученых и инженеров.

Литература

1. Roco M.C. Converging science and technology at the nanoscale: opportunities for education and training. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21(10): 1247–1249.
2. La Van D.A., McGuire T., Langer R. Small-scale systems for in-vivo drug delivery. *Nat. Biotechnol.* 2003; 21(10): 184–1191.
3. Nakanishi T., et al. Development of the polymer micelle carrier system for doxorubicin. *J. Control Release* 2001; 74: 295–302.
4. Ruponen M., Honaski P., Ronko S., Tammi M., Urtti A. Extracellular and intracellular barriers in non-viral gene delivery. *J. Control Release* 2003; 93: 213–217.
5. Partridge K.A. and Oreffo R.O.C. Gene delivery in bone tissue engineering: progress and prospects using viral and nonviral strategies. *Tissue Eng.* 2004; 10: 295–307.
6. Bellon G., et al. Aerosol administration of a recombinant adenovirus expressing CFTR to cystic fibrosis patients: a phase I clinical trial. *Hum. Gene Ther.* 1997; 8: 15–25.
7. Crystal R.G., et al. Administration of an adenovirus containing the human CFTR cDNA to the respiratory tract of individuals with cystic fibrosis. *Nat. Genet.* 1994; 8: 42–51.
8. Zabner J., et al. Repeat administration of an adenovirus vector encoding cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the nasal epithelium of patients with cystic fibrosis. *J. Clin. Invest.* 1996; 97: 1504–1511.
9. Harvey B.G., et al. Airway epithelial CFTR mRNA expression in cystic fibrosis patients after repetitive administration of a recombinant adenovirus. *J. Clin. Invest.* 1999; 104: 1245–1255.
10. Kim H.W., et al. Aerosol gene delivery of glucosylated polyethyleneimine/ phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 complex suppressed Akt downstream pathways in the lungs of K-ras null mice. *Cancer Res.* 2004; 64(21): 7971–7976.
11. Mao H.Q., et al. Chitosan-DNA nanoparticles as gene carriers: synthesis, characterization and transfection efficiency. *J. Control Release* 2001; 70: 399–421.
12. Green J., et al. Biodegradable polymeric vectors for gene delivery to human endothelial cells. *Bioconjugate Chem.* 2006; 19(5): 1162–1169.
13. Bergen J.M., von Recum H.A., Goodman T.T., Massey A.P., Pun S.H. Gold nanoparticles as a versatile platform for optimizing physicochemical parameters for targeted drug delivery. *Macromol. Biosci.* 2006; 6(7): 506–516.

14. Furumoto K., et al. Important role of serum proteins associated with on the surface of particles in their hepatic disposition. *J. Control Release* 2002; 83: 89–96.
15. Gbadamosi J.K., Hunter A.C., Moghimi S.M. PEGylation of microspheres generates a heterogenous population of particles with differential surface characteristics and biological performance. *FEBS Lett.* 2002; 532(3): 339–344.
16. Ogawara K., et al. Surface hydrophobicity of particles is not necessarily the most important determinant in their in vivo disposition after intravenous administration in rats. *J. Control Release* 2001; 77(3): 191–198.
17. Emerich D.F., Thanos C.G. The pinpoint promise of nanoparticle-based drug delivery and molecular diagnosis. *Biomol. Eng.* 2006; 23: 171–184.
18. Soppimath K.S., Aminabhavi T.M., Kulkarni A.R., Rudzinski W.E. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices. *J. Control Release* 2001; 70: 1–20.
19. Koziara J.M., Whisman T.R., Tseng M.T., Mumper R.J. In-vivo efficacy of novel paclitaxel nanoparticles in paclitaxel-resistant human colorectal tumors. *J. Control Release* 2006; 112(3): 312–319.
20. Dailey L.A., et al. Modified polyethylenimines as non viral gene delivery systems for aerosol therapy: effects of nebulization on cellular uptake and transfection efficiency. *J. Control Release* 2004; 100: 425–436.
21. Gautam A., Densmore C.L., Golunski E., Xu B., Waldrep J.C. Transgene expression in mouse airway epithelium by aerosol gene therapy with PEI-DNA complexes. *Mol. Ther.* 2001; 3: 551–556.
22. Merlin J.L., et al. Improvement of nonviral p53 gene transfer in human carcinoma cells using glucosylated polyethylenimine derivatives. *Cancer Gene Ther.* 2001; 8: 203–210.
23. Jin H., et al. Aerosol delivery of urocanic acid-modified chitosan/programmed cell death 4 complex regulated apoptosis, cell cycle, and angiogenesis in lungs of K-ras null mice. *Mol. Cancer Ther.* 2006; 5(4): 1041–1049.
24. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2001; 47: 65–81.
25. Lockman P.R., Mumper R.J., Khan M.A., Allen D.D. Nanoparticle technology for drug delivery across the blood—brain barrier. *Drug Del. Ind. Pharm.* 2002; 28: 1–13.
26. Tiwari S.B. and Amiji M.M. A review of nanocarrier-based CNS delivery systems. *Curr. Drug Deliv.* 2006; 3(2): 219–232.
27. Pandey R. and Khuller G.K. Oral nanoparticle-based antituberculosis drug delivery to the brain in an experimental model. *J. Antimicrob. Chemother.* 2006; 57(6): 1146–1152.
28. Zhao X., et al. A rapid bioassay for single bacterial cell quantitation using bioconjugated nanoparticles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2004; 101(42): 15027–15032.
29. Tully E., Hearty S., Leonard P., O’Kennedy R. The development of rapid fluorescence-based immunoassays, using quantum dot-labelled antibodies for the detection of *Listeria monocytogenes* cell surface proteins. *Int. J. Biol. Macromol.* 2006; 39(1–3): 127–143.
30. Driskell J.D., et al. Low-level detection of viral pathogens by a surface-enhanced Raman scattering based immunoassay. *Anal. Chem.* 2005; 77(19): 6147–6154.
31. Yezhelyev M.V., et al. Emerging use of nanoparticles in diagnosis and treatment of breast cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7(8): 657–667.
32. Gao X., Cui Y., Levenson R.M., Chung L.W., Nie S. In vivo cancer targeting and imaging with semiconductor quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 2004; 22(8): 969–976.
33. Fortina P., Kricka L.J., Surrey S., Grodzinski P. Nanobiotechnology: the promise and reality of new approaches to molecular recognition. *Trends Biotechnol.* 2005; 23(4): 168–173.

34. Stoeva S.I., Lee J.S., Smith J.E., Rosen S.T., Mirkin C.A. Multiplexed detection of protein cancer markers with biobarcode nanoparticle probes. *J. Am. Chem. Soc.* 2006; 128: 8378–8379.
35. Smith A.M., Dave S., Nie S., True L., Gao X. Multicolor quantum dots for molecular diagnostics of cancer. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006; 6(2): 231–244.
36. Nobs L., Buchegger F., Gurny R., Allemann E. Biodegradable nanoparticles for direct or two-step tumor immunotargeting. *Bioconjug. Chem.* 2006; 17(1): 139–145.
37. Goodwin D.A. and Meares C.F. Advances in pretargeting biotechnology. *Biotechnol. Adv.* 2001; 19: 435–450.
38. Sharkey R.M., et al. A universal pretargeting systems for cancer detection and therapy using bispecific antibody. *Cancer Res.* 2003; 63: 354–363.
39. Mulder W.J., et al. MR molecular imaging and fluorescence microscopy for identification of activated tumor endothelium using a bimodal lipidic nanoparticle. *FASEB J.* 2005; 19(14): 2008–2010.
40. Santra S., et al. Folate conjugated fluorescent silica nanoparticles for labeling neoplastic cells. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2005; 5(6): 899–904.
41. Loo C., Lowery A., Halas N., West J., Drezek R. Immunotargeted nanoshells for integrated cancer imaging and therapy. *Nano Lett.* 2005; 5(4): 709–711.
42. Kim J.H., et al. Nanoparticle probes with surface enhanced Raman spectroscopic tags for cellular cancer targeting. *Anal. Chem.* 2006; 78: 6967–6973.
43. Venugopal J. and Ramakrishna S. Application of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2005; 125(3): 147–158.
44. Jayaraman K., Kotaki M., Zhang Y., Mo X., Ramakrishna S. Recent advances in polymer nanofibers. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2004; 4(1–2): 52–65.
45. Li M., Guo Y., Wei Y., MacDiarmid A.G., Lelkes P.I. Electrospinning polyaniline-contained gelatin nanofibers for tissue engineering applications. *Biomaterials* 2006; 27(13): 2705–2715.
46. Wei G., Jin Q., Giannobile W.V., Ma P.X. Nano-fibrous scaffold for controlled delivery of recombinant PDGF-BB. *J. Control Release* 2006; 112(1): 103–110.
47. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J. Nanotoxicology: an emerging discipline from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.* 2005; 113: 823–839.
48. Powers K.W., et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials. Part VI: characterization of nanoscale particles for toxicological evaluation. *Toxicol. Sci.* 2006; 90(2): 296–303.
49. Allen T. Particle size measurement. Volume 2, Surface Area and Pore Size Determination 5th ed. ChapmanHall; 2004.
50. Burtscher H. Physical characterization of particulate emissions from diesel engines: a review. *J. Aerosol Sci.* 2005; 36: 896–932.

ПРЕДМЕТНЫЙ УКАЗАТЕЛЬ

- Агглютинин зародыша пшеницы 106
Аденоассоциированные вирусы 178, 343
Аденовирусные векторы 177, 357, 493
Аденозинтрифосфат 463
транс-, *цис*-Азобензол 59, 60
Активируемые интегрином EGF-рецепторы 251
Альцгеймера болезнь 10, 134, 154, 175, 465, 467, 470, 471, 473, 474, 476, 479–481
 β -Амилоид 465, 472
Амилоидный пептид 471, 472
Амиотрофный латеральный склероз 473
Амплификация 208, 354, 452
Ангиогенез 107, 245, 248, 261, 303, 346, 349, 357, 401, 496
Ассоциированная с кишечником лимфоидная ткань 347
Атомно-силовая микроскопия (АСМ) 15, 35, 56, 61, 127, 332, 394
Ацерулоплазминемия 470, 475, 482
- Базальная мембрана** 262, 301, 385
Белковые чипы 415, 446
Белок вируса крапчатости фасоли 482
Биосенсор 442–447, 451
Биосовместимые нановолокна 47, 118, 133, 134, 149–155, 275, 276, 278, 281–283, 386–390, 398–405, 497
Биосопряженные наночастицы наногелей 125, 144, 174–176
- Векторы на основе липидов** 355, 356
Вирус иммунодефицита человека (ВИЧ) 77, 83, 359, 452, 453, 476
Вирусные векторы 97, 135, 176–177, 359, 493
Вирусоподобные частицы 176, 177, 180–182
- Внеклеточный матрикс (ВКМ) 46, 47, 150, 222–224, 226, 228, 229, 232, 233, 235, 238, 239, 241–253, 261, 263, 264, 248–253, 261, 263, 264, 278, 300–303, 310, 319, 327–331, 335, 364, 384, 386, 390
Высокоскоростное перемешивание 161, 162
- Гауссов профиль 215
Гауссова функция 215
Гауссово ядро 215
Гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) 98, 105, 121, 144, 147, 164, 469, 474, 475, 481, 495
Гемосидерин 463, 465, 466, 469, 470, 472, 476, 479–481
Гемохроматоз 466, 470, 472, 476, 477
Генная терапия 345
Гетеродимерные трансмембранные молекулы 250
Гетеротипические клеточные взаимодействия 367, 368
Гетеротипический контакт между клетками 365–366
Гидрогель 63–66, 68, 69, 71, 75–77, 81, 82, 83, 85–87, 129, 173, 305, 349, 369–371, 390, 402
Гликопротеины 81, 83, 105, 224, 235–239, 244
Гомогенизация под высоким давлением 161, 184
- Дендримеры 109, 155–159, 493
Дендримеры, содержащие метотрексат, 109, 157
Дзета-потенциал 66, 145, 146, 346, 430
днРНК-зависимая протеинкиназа 359
Додецилсульфат натрия 167
Доксил 118, 422–426, 432

- Домены связывания 182, 235, 238, 246–247
- Доставка лекарств с помощью ультразвука 97, 103
- Желатин**, ковалентное присоединение 400
- Избыточное содержание железа 466, 468, 469, 470, 471, 473–476, 478, 480, 481, 483
- Инкапсулирование лекарств 122, 129, 145, 146, 160, 424–428
- Интегрин альфа5-бета1 246, 248, 251, 329
- Интегрин-цитоскелетные связи 331
- Инфекционные заболевания 208, 430
- Ионно-лучевая литография 35
– с использованием масок 34
- Ионной имплантации процесс 33, 40, 43, 44
- Кантилевер** 415, 444–446
- Кардиомиоциты 167, 286, 403, 404, 423, 426
- Квантовые точки 107, 111, 209, 417
- Кератинсульфат 236
- Кератоциты 266, 272
- Клетки HUVEC 314
- Клетки гладких мышц 225, 264, 276, 282, 284–286, 304, 389, 396
- Клетки почек собаки (MDSK) 396
- Клетки почек хомячка (BHK) 396
- Контактирующие с кровью устройства 38, 45
- Конъюгаты аптамерных наночастиц 78, 104, 106, 443, 455
- Лазерная абляция** 24, 166
- Лиганд-рецепторное связывание 331, 332, 401
- Лизосомы с высоким содержанием гемосидерина 466, 470
- Липидные наночастицы 159, 161
- Липосомы 74, 159, 160, 162, 421–429, 432
- Литографические методы
– глубокая рентгеновская литография 17
– LIGA-процесс 17
– коллоидная литография 265, 269
– литография с применением пучков электронов 15, 265
– «мягкая» литография 15
– на основе капиллярных сил 393, 394
– нанопечати 14, 47
– наносферная литография 15
- Люминесцентный иммуноанализ туннелирования атомов кислорода 209
- Лютеинизирующий гормон (LHRH) 107
- Люцифераза 153, 354–356
- Магнитно-резонансная томография (МРТ)** 96, 105, 109, 111, 112, 413, 415, 419, 420, 449, 450, 469, 472, 474, 475, 480, 482, 483
- Макрофаги 317
- Масс-спектрометрия вторичных ионов 36, 479
- Матриксная металлопротеиназа 86, 245, 252
- Матрицы для культивирования клеток разных фенотипов 150, 225, 236, 239, 240, 248, 249, 251, 281, 300, 304, 305, 310, 372, 382, 384, 386, 388, 390, 391, 393, 395, 398–406
- Межклеточное взаимодействие 364, 369, 373
- Межполимерные гидрофобные взаимодействия 65, 71, 72, 74, 76, 100, 128, 159, 172, 424
- Метод динамического светорассеяния 69, 71
- Метод инверсии фаз 130
- Метод малоуглового рассеяния нейтронов 70
- Метод погружного пера 14–16, 371
- Метод разделения фаз 65, 148, 151, 274, 278, 279, 384, 387, 389, 401
- Метод ядерного магнитного резонанса 496
- Методы молекулярной самосборки 27, 28, 253, 278, 326, 336, 337, 384, 387, 390, 391, 398
- Методы трансфекции 342–345, 347–349, 354, 355, 357, 360, 493
- Меченый родамином декстран 106
- Микро- и наноконтантная печать 392, 393
- Микроциповый анализ 414

- Микрочиповый сенсор 14, 95, 135, 414
Микроэлектромеханические системы (МЭМС) 10, 29
Микроэмульсионный метод 173
Минерализация, опосредованная остеобластами 369
Многомерная модель клеточного взаимодействия 372
Множественная лекарственная устойчивость 427
Моноклональные антитела 104
МРТ-визуализация 96, 480
- Накопление железа в мозге** 468, 474
Нанобиотехнология 168, 414, 496
Нановолокна с хитозаном 133, 389
Нановолоконные структуры 11, 133, 148, 152, 262, 275, 280, 303, 388
Наногель, реагирующий на глюкозу 175, 450
Наномоторы на основе молекул ДНК 54, 56, 59, 61
Наноструктурированные конструкции 384, 387, 389, 390, 396, 399, 400, 402, 404, 406
Нанотехнологические системы доставки генетического материала 64, 75, 78, 103, 105, 110, 118, 121, 126, 127, 134, 135, 147, 152, 153, 163, 169, 171, 176–179, 344, 346, 347, 355, 357, 359, 492–495
Нанотехнологические системы доставки лекарств 23, 75–78, 97–104, 106, 108–113, 118, 120, 121, 125, 130, 132, 134, 143, 145, 148, 150, 152, 154, 156, 158–160, 164–168, 171, 172, 174–176, 182, 185, 186, 416, 483, 492, 494–496
Нанотехнологический подход к лечению рака 416
Нанотехнологии 51, 93, 412, 414–416, 433
Нанотехнология на чипах 95, 129, 415
Наночастицы гидрогеля 71, 75, 76, 79–81, 87, 129, 390, 402
Наноэлектромеханические системы (НЭМС) 10, 29
Направленная доставка генов 493
Направленное выключение гена 351, 353, 354, 357, 359, 360
- Невральные клетки-предшественники 403
Нейродегенерация опосредованная пантотенаткиназой 470, 475
Нейромеланин 463, 466, 467, 473, 474
Нейротропный фактор глиальных клеток (GDNF) 179
Нейроферритинопатия 475
Неколлагеновые домены 246, 247,
Нервные клетки *Xenopus* 266, 272
Нестероидные противовоспалительные средства 157
Нижняя критическая температура растворения 66, 67, 69, 70, 101, 102, 175, 475
Нуклеиновые кислоты 117, 169, 442, 443
- Обнаружение единичных молекул** 210, 211–215
Однослойные нанотрубки 24, 110, 164, 169, 285
Однопочечная ДНК 56
Оптическая литография 11, 14, 32
Опухолевые маркеры 81, 82, 413, 417, 454, 496
Осаждение тонких пленок 18–20, 25
Остеобласты и фибробласты, взаимодействие 365
Остеобласты и фибробласты, модель 368–370
Отношение сигнал/шум 210
- Паркинсона болезнь** 10, 154, 175, 470, 473, 474, 476, 482, 483
Пептид, связывающийся с артериальной стенкой 107
Передача сигналов интегринами 250
Передняя крестообразная связка 365
Перенос генов вирусами 179, 180
Пероксидаза хрена 105
Пигментные эпителиальные клетки радужной оболочки глаза человека 393
Поверхности полистирола нанотопографические 264, 277, 282, 288, 290
Поверхности с наноканавками 46, 309–315, 318, 319
Поверхность сегментированного полиуретана 39
Позитронно-эмиссионная томография 413

- Полиалкилцианоакрилат 122, 123, 343
Полигликолевая кислота 129, 145, 382, 384, 388
Поликапролактан 109, 125, 145, 152, 153, 275, 282, 283, 382, 384, 389
Поликатионный комплекс ДНК 126, 127, 148, 346, 347, 356
Полимеразная цепная реакция (ПЦР) 208, 347, 443, 452, 454
Полимолочная кислота 121, 128, 145, 150, 151, 153, 343, 382, 388, 404
Полистирол для культивирования клеток 290
Полиэтиленгликоль 32, 78, 85, 105, 121, 128, 129, 147, 151, 152, 159, 170, 175, 356–358, 393, 394, 422, 426, 494
Поршневой гомогенизатор 184
Простатоспецифический антиген 106, 429, 455, 496
Протеин-минеральный комплекс с высоким содержанием железа 465
Протеогликаны 226, 228, 234–237, 239, 250, 261, 271, 385
Противораковая лекарственная терапия 217, 413, 414, 416, 418, 419, 422, 424–427, 429–433
Проходящие через мембрану пептиды 104, 105, 107, 121, 144, 147, 355
- Радикальная полимеризация под действием нитроксидов 72
Рассеянный склероз 476
Реакции кислородных радикалов 171, 466
Реакция латексной агглютинации 209
Реакция обмена цепей ДНК 54, 55, 58
Регенерация нервной ткани 40, 154, 397, 401, 403, 404, 406
Рекомбинантный вектор вируса герпеса 180
Ретикулоэндотелиальная система 76, 120, 128, 147, 162, 421–423
Рецептор-опосредованная сигнализация 220, 250, 330
Рецептор-опосредованный эндоцитоз 104, 345
РНК-индуцированный комплекс сайлсинга (RISC) 350, 359
РНК-интерференция 349
РНК-связывающие белки 359
РНК-трансфекция 349, 354, 355, 360
- Саркома Капоши 425, 432, 465
Сверхкритический диоксид углерода 123
Сверхпроводящий квантовый интерференционный датчик (СКВИД) 466
Сверхчувствительные тесты 415, 417, 456, 496
Свободнорадикальная полимеризация 75, 81
Серологические тесты 208, 216
«Синдром беспокойных ног» 476, 477
Синдром приобретенного иммунодефицита (СПИД) 425, 453, 476
СКВИД-микроскопия 466, 472, 479, 480
Система мононуклеарных фагоцитов 143, 146, 160
Системы доставки генетического материала 64, 75, 97, 103, 105, 110, 118, 121, 126, 127, 134, 135, 147, 152, 156, 159, 163, 169, 171, 176–179, 344, 346, 347, 357, 359, 492–495
Системы доставки лекарств 10, 232, 64, 74, 75, 78, 95–104, 106–111, 117–121, 123–125, 128, 130, 132, 134, 135, 142–148, 150, 152, 154, 156–160, 162–168, 171, 174, 176, 182, 185, 186, 388, 421, 427, 429, 433, 483, 495
Системы многофункциональных структур 218
Скрытые (замаскированные) сайты связывания 246, 247, 252, 331
Совместное культивирование остеобластов и фибробластов 366–370, 372
Сопряженный с полиэтиленгликолем трансферрин 105, 128
СПИД-ассоциированная деменция 476
Средства доставки на основе нановолокон 118, 133, 134, 144, 148, 150–155, 185
Структуры самособирающихся пептидных нановолокон 390, 398, 401–403
Сфингомиелиновые липосомы с винкристином 427
Сэндвич-анализ 209, 213, 214, 216
- Твердые липидные наночастицы 160, 161, 163

- Термически индуцированное разделение фаз 389
- Технологии доставки генов 64, 75, 78, 103, 105, 110, 118, 121, 126, 127, 134, 135, 147, 156, 159, 163, 171, 176–179, 344, 346, 347, 492, 493, 495
- Технология получения нанокристаллов 182–185, 417
- Технология регенерации ткани сердечной мышцы 403–405
- Тканеподобная организация клеток 232, 249, 304, 365, 373, 374
- Трансмембранные гликопротеины 222, 250
- Трансфекция ДНК 180, 360
- Трансферрин 75, 77, 104, 105, 147, 180, 463, 468, 469, 480
- Трансфицированные генами эндотелиальные клетки-предшественники 349
- Углеродные нанотрубки (УНТ) 23–25, 27, 110, 164–171, 286
- Ф**актор роста β -трансформирующий (β -ТРФ) 154
- Фактор роста кровеносных сосудов (EGF или FGF) 346, 401
- Фактор роста нервов (ФРН) 154
- Фактор роста сосудистого эндотелия (ФРСЭ) 154, 401
- Фактор роста TGF-бета 243–245
- Фактор роста фибробластов 349, 401
- Факторы роста 23, 152, 154, 237, 238, 252, 282, 303, 346, 348, 383
- Фибробласты человека 269, 275, 280, 282, 288, 386, 389
- Фотодинамическая терапия 103
- Фотолитография 11, 14, 15, 33, 46, 265, 273, 274, 371, 392
- Фотохимическая интернализация 103
- Фуллерены 144, 164–166, 171, 172, 285
- Хантингтона болезнь 473
- Хелатная терапия 481
- Химиотерапия рака 147, 414
- Химическое парофазное осаждение 20, 26
- Хорионический гонадотропин человека 496
- Центральная нервная система (ЦНС) 121, 128, 176, 179, 305, 403, 495,
- Ч**увствительный к температуре микрогель со структурой «ядро–оболочка» 68
- Щ**елочная фосфатаза, активность 44, 248, 278, 370, 371, 398
- Эмульгирование воды в масле и масла в воде 122, 125, 145
- Эмульсионная полимеризация без детергентов 123, 124, 145
- Эндотелиальные клетки
- коронарной артерии человека 275, 401
 - кровеносных сосудов мозга человека 147, 164, 176, 469, 495
 - роговицы глаза человека 396
 - капилляров мозга быка 176, 393
- Эпителиальные клетки роговицы глаза человека 312–314, 396
- Я**дерно-магнитный резонанс (ЯМР) 85, 466, 478, 480

ОГЛАВЛЕНИЕ

Авторский коллектив	5
Часть I. ПОЛУЧЕНИЕ НАНОСТРУКТУР	9
Глава 1. Методы создания наноструктур	10
<i>Джозеф В. Фриман, Ли Д. Райт, Като Т. Лоренсин и Субхабрата Бхаттачариа</i>	
1.1. Введение	10
1.2. Фотолитография	11
1.2.1. Очистка подложки	11
1.2.2. Нанесение фоторезиста	12
1.2.3. Первая сушка фоторезиста	12
1.2.4. Экспонирование	13
1.2.4.1. Контактная печать	13
1.2.4.2. Контактная печать с зазором между маской и подложкой	13
1.2.4.3. Проекционная печать	13
1.2.5. Проявление	13
1.2.6. Повторное высушивание фоторезиста	14
1.2.7. Ограничения фотолитографии	14
1.3. Специальные литографические методики	14
1.3.1. Литография с применением пучков электронов	15
1.3.2. Наносферная литография	15
1.3.3. «Мягкая» литография	15
1.3.4. Метод погружного пера	15
1.3.5. Процесс LIGA	17
1.3.5.1. Глубокая рентгеновская литография	17
1.3.5.2. Электроосаждение	17
1.3.5.3. Литье	18
1.4. Осаждение тонких пленок	18
1.5. Электроспиннинг	21
1.6. Наносферы	23
1.7. Углеродные нанотрубки	23
1.7.1. Электрический дуговой разряд	24
1.7.2. Лазерная абляция	24
1.7.3. Химическое осаждение из паровой фазы	25
1.7.4. Фотоиндуцированное лазером химическое осаждение из паровой фазы	26
1.7.5. Пиролитическое, индуцированное лазером химическое осаждение из паровой фазы	26

1.7.6. Рост нанотрубок на определенном участке подложки	27
1.8. Наноструктуры с самосборкой	27
1.9. Заключение	29
Литература.	29
Глава 2. Микро- и нанобработка. Получение материалов для биомедицинских целей	32
<i>Вэй Хэ, Кеннет Е. Гонсалвес, Крейг Р. Хальберштадт</i>	
2.1. Введение	32
2.2. Процессы ионной имплантации	33
2.3. Микро- и нанобработка «мягких» полимерных биоматериалов.	33
2.3.1. Применение полимеров в ортопедии	34
2.3.2. Устройства, контактирующие с кровью.	38
2.3.3. Другие применения	40
2.4. Микро- и наноизготовление металлических биоматериалов	42
2.4.1. Применение металлов в ортопедии	42
2.4.2. Стоматологические имплантаты.	44
2.4.3. Устройства, контактирующие с кровью.	45
2.4.4. Другие применения	45
2.5. Новые биосовместимые фоторезисты	46
2.6. Трехмерная литография	46
2.7. Заключение	47
Литература.	48
Глава 3. Новые наноструктуры в качестве молекулярных наномоторов	53
<i>Янь Чэнь, Цзяньвэй Джефф Ли, Цзехуэй Чарльз Цао и Вейхун Тань</i>	
3.1. Введение	53
3.2. Мульти-ДНК наномоторы	54
3.3. Наномоторы на основе одной цепи ДНК	56
3.4. Заключение	61
Литература.	62
Глава 4. Биоконъюгаты мягких наноматериалов	63
<i>Ниту Сингх, Уильям Блэкборн и Эндрю Лайон</i>	
4.1. Введение	63
4.1.1. Определение гидрогелей	63
4.1.2. Классификация гидрогелей	64
4.1.3. Сигнал-чувствительные полимеры	64
4.1.4. Микрогели и наногели	66
4.2. Материалы со структурой типа «ядро–оболочка». Мицеллы из блок-сополимеров	68
4.3. Биоконъюгированные гидрогели в нанотехнологии	74
4.3.1. Доставка лекарств и генов	74
4.3.2. Аналитическое применение	79
4.3.3. Биоматериалы.	83
4.4. Заключение	87
Литература.	88

Глава 5. Применение нанотехнологии для доставки лекарств в организме	95
<i>Сяоцзюнь Юй, Чандра М. Валмикинатан, Аманда Роджерс и Цзюньтин Ван</i>	
5.1. Введение	95
5.2. Преимущества систем доставки лекарств на основе наночастиц	96
5.2.1. Направленная доставка	97
5.2.2. Контролируемая доставка	97
5.2.3. Увеличение скорости циркуляции и объема распределения	97
5.2.4. Растворимость лекарств	98
5.2.5. Внутриклеточные системы доставки лекарств	98
5.2.6. Прохождение через биологические мембраны	98
5.2.7. Увеличение площади поверхности	99
5.3. Активация и направленная доставка лекарственных препаратов	99
5.3.1. Активация и доставка под действием физико-химических сигналов	99
5.3.1.1. pH-чувствительные переносчики.	99
5.3.1.2. Термочувствительные переносчики	101
5.3.1.3. Фотохимический способ регуляции	103
5.3.1.4. Доставка лекарственных препаратов под действием магнитного поля.	103
5.3.1.5. Доставка лекарственных препаратов с помощью ультразвука	103
5.3.2. Направленная доставка лекарств	104
5.3.2.1. Моноклональные антитела	104
5.3.2.2. Фолат в качестве лиганда	104
5.3.2.3. Трансферрин в качестве лиганда	105
5.3.2.4. Аптамеры.	106
5.3.2.5. Лектины	106
5.3.2.6. Модифицированные и искусственные пептидные лиганды	107
5.3.2.7. Другие лиганды	107
5.4. Полифункциональные системы на основе наночастиц	108
5.4.1. Поливалентные носители	108
5.4.1.1. Дендримеры	109
5.4.1.2. Полимерные нанопереносчики	109
5.4.1.3. Углеродные нанотрубки	110
5.4.2. Свойства исходного материала	110
5.4.2.1. Электрические свойства	111
5.4.2.2. Оптические свойства.	111
5.4.2.3. Магнитные свойства	111
5.4.2.4. Тепловые свойства	111
5.4.2.5. Структурные свойства	112
5.4.2.6. Полимерные мицеллы в качестве нанореакторов	112

5.5. Заключение	112
Литература	113

Глава 6. Полимерные наночастицы и нанопористые мембраны для контролируемой доставки лекарств и генов 117

Цзиньъюэо Гуань, Хунъянь Хе, Бо Юй и Л. Джеймс Ли

6.1. Введение	117
6.2. Наночастицы для доставки лекарств и генов	118
6.2.1. Роль размера наночастиц в системах доставки лекарств и генов	118
6.2.1.1. Защита лекарства (гена)	119
6.2.1.2. Доставка малорастворимых соединений	119
6.2.1.3. Продолжительное высвобождение	119
6.2.1.4. Длительное время циркуляции	120
6.2.1.5. Направленная доставка	120
6.2.1.6. Усиление захвата клетками	120
6.2.1.7. Преодоление защитных барьеров организма	121
6.2.2. Наночастицы из нерастворимых в воде полимеров	121
6.2.2.1. Образование наночастиц путем преципитации полимера	122
6.2.2.2. Образование наночастиц путем полимеризации мономеров	123
6.2.3. Наночастицы из водорастворимых полимеров	124
6.2.3.1. Образование наночастиц из перекрестно-сшитых полимеров	124
6.2.3.2. Образование наночастиц в результате самопроизвольной сборки блок-сополимеров	128
6.2.3.3. Образование наночастиц путем полимеризации мономеров	129
6.3. Нанопористые мембраны для доставки лекарств	129
6.3.1. Общий обзор устройств на основе нанопористых структур для длительного высвобождения лекарств	129
6.3.2. Полимерные нанопористые мембраны для доставки лекарственных препаратов	130
6.4. Электроспиннинг как метод получения полимерных нановолокон для доставки лекарственных препаратов.	133
6.5. Заключение	134
Литература	135

Глава 7. Разработка наносистем для доставки лекарств в организме 142

Никхил Дубе, Джойдип Дутта и Дхирендра С. Катти

7.1. Введение	142
7.2. Наносистемы для доставки лекарств	144
7.3. Полимерные наночастицы	144
7.3.1. Структура и свойства	145
7.3.2. Применение наночастиц для создания систем доставки лекарств	146

7.4.	Нановолокна	148
7.4.1.	Синтез	148
7.4.2.	Применение нановолокон	149
7.5.	Дендримеры	155
7.5.1.	Свойства дендримеров	156
7.5.2.	Применение дендримеров для доставки лекарств	156
7.6.	Липосомы и липидные наночастицы	159
7.6.1.	Синтез липосом и липидных наночастиц	160
7.6.1.1.	Гомогенизация под высоким давлением	161
7.6.1.2.	Метод микроэмульсии	161
7.6.1.3.	Высокоскоростное перемешивание и ультразвуковая обработка	161
7.6.2.	Применение липосом для доставки лекарственных препаратов	162
7.6.3.	Применение липидных наночастиц для доставки лекарственных препаратов	163
7.7.	Нанотрубки и фуллерены	164
7.7.1.	Синтез	165
7.7.1.1.	Химическое парофазное осаждение	165
7.7.1.2.	Электрическая дуга	165
7.7.1.3.	Лазерная абляция	166
7.7.2.	Очистка углеродных нанотрубок	166
7.7.3.	Токсичность углеродных нанотрубок	166
7.7.4.	Функциональная модификация углеродных нанотрубок	167
7.7.5.	Биомедицинское применение углеродных нанотрубок	168
7.7.5.1.	Доставка лекарств с помощью углеродных нанотрубок	168
7.7.5.2.	Доставка нуклеиновых кислот с помощью углеродных нанотрубок	169
7.7.5.3.	Доставка белков с помощью углеродных нанотрубок	170
7.7.5.4.	Доставка вакцин и пептидов с помощью углеродных нанотрубок	170
7.7.6.	Биомедицинское применение фуллеренов	171
7.8.	Наногели	173
7.8.1.	Синтез наногелей	173
7.8.1.1.	Эмульсионная полимеризация	173
7.8.1.2.	Образование перекрестных сшивок между ранее сформированными фрагментами	174
7.8.2.	Наногели для доставки лекарственных препаратов	174
7.9.	Вирусные векторы и вирусоподобные частицы	176
7.9.1.	Рекомбинантные вирусные векторы	177
7.9.1.1.	Векторы на основе аденовирусов	177
7.9.1.2.	Векторы на основе ретровирусов	178
7.9.1.3.	Векторы на основе аденоассоциированных вирусов	178

7.9.2.	Применение векторов на основе рекомбинантных вирусов	179
7.9.3.	Вирусоподобные частицы.	180
7.9.4.	Применение вирусоподобных частиц	181
7.9.4.1.	Вирусоподобные частицы с капсидом папилломавируса	181
7.9.4.2.	Вирусоподобные частицы с капсидом полиомавируса	182
7.10.	Нанокристаллы.	182
7.10.1.	Способы получения нанокристаллов лекарственных препаратов	183
7.10.2.	Изготовление таблеток из наносuspензий малорастворимых препаратов	185
7.11.	Заключение.	185
	Литература	186

Глава 8. Биоконъюгированные наночастицы для высокочувствительного определения молекулярных биомаркеров и инфицирующих агентов 208

Амит Агравал, Май Дуньмэй Ван и Шумин Не

8.1.	Введение	208
8.2.	Новые свойства наночастиц.	209
8.3.	Определение единичных молекул	211
8.3.1.	Инструментальная основа и принципы метода	211
8.3.2.	Маркировка наночастиц цветом	213
8.3.3.	Получение изображения отдельных молекул	215
8.4.	Применение биоконъюгантов частиц	216
8.4.1.	Определение частиц респираторно-синцитиального вируса	216
8.4.2.	Определение единичных молекул с помощью создания двухцветных изображений	216
8.5.	Заключение.	217
	Литература	218

Часть II. ПОВЕРХНОСТИ РАЗДЕЛА МЕЖДУ БИО- И НАНОСТРУКТУРАМИ 221

Глава 9. Взаимодействие внеклеточного матрикса с клетками на макро- и наноровнях 222

Стив Мвенифумбо, Молли М. Стивенс

9.1.	Введение	222
9.2.	Микроокружение клетки	223
9.2.1.	Разнообразие структуры и состава ВКМ	223
9.2.1.1.	Разнообразие макромолекулярного состава ВКМ	223
9.2.1.2.	Эволюционное разнообразие компонентов ВКМ	224

9.2.1.3. Разнообразие, связанное с тканевой специфичностью	224
9.2.2. Наномасштабные структуры ВКМ	226
9.2.2.1. Коллагены и эластины	226
9.2.2.2. Гликозамингликаны	234
9.2.2.3. Протеогликаны.	234
9.2.2.4. Гликопротеины	235
9.2.3. Объединение элементов и самосборка иерархической структуры	239
9.3. Разномасштабная карта взаимодействий в системе клетка–ВКМ	241
9.3.1. Сигнальные градиенты	242
9.3.2. Растворимые вещества-факторы	243
9.3.3. Факторы роста	243
9.3.4. Компоненты ВКМ	245
9.3.4.1. Связывающие домены	246
9.3.4.2. Замаскированные сайты	246
9.3.4.3. Химия приповерхностного слоя ВКМ	247
9.3.4.4. Топография.	248
9.3.5. Механические напряжения в окружении матрикса	249
9.3.6. Поверхностные рецепторы клетки	250
9.3.6.1. Интегрины	250
9.3.6.2. Адгезия клеток и адгезионные комплексы	250
9.3.6.3. Передача сигналов интегринами	250
9.3.7. Управляемая активность клеток. Реструктурирование ВКМ	251
9.4. Заключение	253
Благодарности	254
Литература	254
Глава 10. Взаимодействие клеток с наноструктурными поверхностями	261
<i>Сангамеш Г. Кумбар, Мишель Д. Кофрон, Лакими С. Наир и Като Т. Лоренсин</i>	
10.1. Введение	261
10.2. Поведение клеток на различных нанотопографических поверхностях	264
10.2.1. Поверхности, полученные методом электронно-лучевой литографии	265
10.2.2. Поверхности, полученные методом фотолитографии.	273
10.2.3. Поверхности с нановолокнами.	274
10.2.4. Поверхности, полученные методом нанопечати	276
10.2.5. Поверхности, полученные самосборкой	277
10.2.6. Поверхности, полученные методом разделения фаз	278
10.2.7. Поверхности, полученные методом коллоидной литографии	280

10.2.8. Поверхности с хаотическим расположением нановолокон, полученные электроформованием	281
10.2.9. Поверхности, полученные химическим травлением	283
10.2.10. Поверхности углеродных нанотрубок и нановолокон	285
10.2.11. Поверхности, полученные методом расщипывания полимеров	287
10.3. Заключение	291
Литература	291

Глава 11. Поведение клеток на базальных мембранах, «имитируемых» синтетическими матрицами с топографическими особенностями 300

Джошуа З. Гасиоровски, Джон Ф. Фоли, Пол Рассел,

Сара Джс. Лиленсик, Пол Ф. Нили, Кристофер Дж. Мэрфи

11.1. Введение	300
11.2. Базальные мембраны	300
11.2.1. Роль базальных мембран при заболеваниях	301
11.2.2. Биохимические свойства	302
11.2.3. Физические особенности	304
11.2.3.1. Податливость	304
11.2.3.2. Топография поверхности	305
11.3. История создания и изучение синтетических биомиметических матриц	307
11.3.1. Искусственная поверхность Matrigel и случайно упорядоченные подложки	308
11.3.2. Создание наноканавок на поверхности	310
11.4. Поведение клеток на искусственно созданных поверхностях с наноканавками	312
11.4.1. Влияние наномасштабной топографии поверхности на пролиферацию клеток	312
11.4.2. Силы адгезии для клеток на поверхностях с наноканавками	314
11.4.3. Скорость миграции клеток на поверхностях с наноканавками	315
11.4.4. Решающее воздействие наноканавок на структуру и ориентацию фокальных адгезий	315
11.5. Передача сигналов и экспрессия в клетках на топографических поверхностях	316
11.5.1. Влияние вызываемых топографией поверхности морфологических изменений на экспрессию генов	317
11.5.2. Стимуляция макрофагов наномасштабной топографией поверхности	317
11.5.3. Экспрессия остеобластов на поверхностях с нанотопографическими особенностями	318
11.5.4. Изменение поведения клеток на поверхностях с наноканавками при добавлении растворимых компонентов	319

11.6. Заключение.	320
Литература	321

Глава 12. Фокальные адгезии и самосборка наномасштабных механохимических машин для управления работой клеток 326

Танмей Леле, Дональд Е. Ингбер

12.1. Введение	326
12.2. Биохимия твердого состояния при фокальной адгезии	328
12.3. Фокальные адгезии в качестве машины механотрансдукции	329
12.4. Влияние механических воздействий на процессы связывания в фокальных адгезиях	331
12.5. Фокальные адгезии в роли многофункционального биоматериала	335
12.6. Заключение.	336
Литература	337

Глава 13. Регуляция поведения клеток с помощью трансфекции. . . . 342

Джасприт К. Вазир и Винод Лабхасетвар

13.1. Введение	342
13.2. Методы трансфекции	342
13.3. Физические и биологические барьеры	344
13.4. Трансфекция клеток молекулами ДНК.	345
13.4.1. Генная терапия	345
13.4.2. Тканевая инженерия	348
13.4.3. Функциональная геномика.	349
13.5. Трансфекция клеток молекулами РНК	349
13.5.1. Инструмент анализа функций генов.	350
13.5.2. Терапевтический подход	351
13.5.3. Доставка миРНК внутрь клеток	354
13.5.3.1. <i>In vitro</i>	354
13.5.3.2. <i>In vivo</i>	355
13.5.4. Проблемы	359
13.5.4.1. Специфичность	359
13.5.4.2. Резистентность	359
13.5.4.3. Стабильность	360
13.6. Заключение.	360
Благодарности	361
Литература	361

Глава 14. Многоуровневые модели кокультур в восстановлении зон контакта кости и мягких тканей 364

Хелен Г. Лу и И-Нин Е. Ван

14.1. Введение	364
14.2. Межклеточные взаимодействия в зоне контакта мягких тканей и костей	365

14.3. Модели кокультур	366
14.3.1. Системы кокультур, способствующие межклеточным контактам	367
14.3.1.1. Смешанные кокультуры	367
14.3.1.2. Временные разделители	367
14.3.2. Системы кокультур без межклеточных контактов	367
14.3.2.1. Соединение разделенных культур	367
14.3.2.2. Системы с пористыми мембранами	368
14.3.2.3. Замена культуральной среды	368
14.4. Использование моделей кокультур для восстановления скелетной соединительной ткани.	369
14.4.1. Кокультуры остеобластов и фибробластов	369
14.4.2. Кокультуры остеобластов и хондроцитов.	370
14.4.3. Модели тройных культур остеобластов, хондроцитов и фибробластов	370
14.5. Изменения в кокультуре на макроскопическом и микроскопическом уровнях.	371
14.6. Двумерные и трехмерные модели кокультур	372
14.7. Механизм клеточных взаимодействий в кокультуре	373
14.8. Заключение.	374
Благодарности	374
Литература	375

Часть III. КЛИНИЧЕСКИЕ ПРИМЕНЕНИЯ НАНОСТРУКТУР. 381

Глава 15. Наноструктуры в тканевой инженерии и регенеративной медицине 382

Сиам П. Нукаварату, Сангамеи Г. Кумбар, Лакими С. Наир и Като Т. Лоренсин

15.1. Введение	382
15.1.1. Тканевая инженерия и регенеративная медицина	382
15.1.2. Матрицы для тканевой инженерии	383
15.1.3. Наноструктура внеклеточного матрикса	384
15.2. Матрицы на основе нановолокон	386
15.2.1. Электроспиннинг	387
15.2.2. Разделение фаз	389
15.2.3. Самосборка молекул	390
15.3. Матрицы со структурированной поверхностью	391
15.3.1. Микро- и наноконтактная печать	392
15.3.2. Литография на основе капиллярных сил	393
15.3.3. Нанесение рисунка биомолекул	394
15.4. Значение наноструктурированных матриц для регенеративной медицины	395
15.5. Функции наноструктурированных матриц в тканевой инженерии	397
15.5.1. Регенерация костной и хрящевой тканей	397
15.5.2. Регенерация сосудистой ткани.	399
15.5.3. Регенерация нервной ткани	401

15.5.4. Регенерация ткани сердечной мышцы	403
15.6. Заключение	405
Литература	406

Глава 16. Наноструктуры в диагностике и лечении рака 412

Кумераш С. Соптимат и Гуру В. Бетагери

16.1. Введение	412
16.1.1. Ранняя диагностика рака	412
16.1.2. Химиотерапия рака	414
16.1.3. Нанотехнологический подход к лечению рака	416
16.2. Применение нанотехнологии для ранней диагностики рака	417
16.2.1. Квантовые точки	417
16.2.2. Наноконтейнеры	418
16.2.3. Наночастицы золота	418
16.2.4. Парамагнитные наночастицы	419
16.3. Применение нанотехнологических методов в лечении рака	421
16.3.1. Липосомы	421
16.3.1.1. Длительно циркулирующие липосомы	422
16.3.1.2. Размер липосом и их транспорт к новообразованиям.	423
16.3.1.3. Доксил	423
16.3.1.4. Липосомы Stealth с цисплатином	426
16.3.1.5. Винкристин в сфингомиелиновых липосомах	427
16.3.1.6. Медленное высвобождение лекарства из липосом	427
16.3.1.7. Липосомальные вакцины	428
16.3.1.8. Липосомы в качестве переносчиков нерастворимых в воде противоопухолевых препаратов	429
16.4. Полимерные наночастицы	429
16.4.1. Альбуминовые наночастицы	430
16.4.2. Мицеллярные наночастицы	431
16.5. Заключение	433
Литература	433

Глава 17. Клиническое применение биологических микро- и наносенсоров. 441

*Дэвид В. Г. Моррисон, Мехмет Р. Докмеси, Уткан Демирси
и Али Хадемхоссейни*

17.1. Введение	441
17.2. Типы биосенсоров	442
17.2.1. Классификация по механизму передачи биологического сигнала	442
17.2.2. Классификация по способу преобразования сигнала.	443
17.3. Методы диагностики <i>in vitro</i>	444
17.3.1. Кантилеверные анализаторы	444
17.3.2. Клеточные и белковые чипы	446
17.3.3. Наночастицы	447

17.4. Диагностика <i>in vivo</i>	448
17.4.1. Квантовые точки	449
17.4.2. Контрастные агенты для МРТ	450
17.5. Существующие и потенциальные клинические применения микро- и наносенсоров.	450
17.5.1. Определение глюкозы <i>in vivo</i>	450
17.5.2. Бактериальные инфекции мочевыводящих путей	451
17.5.3. Обнаружение вируса иммунодефицита человека.	452
17.5.4. Выявление опухолевых клеток	454
17.6. Заключение.	455
Благодарности	456
Литература	456

Глава 18. Соединения железа в наноконцентрациях, связанные с нейродегенеративными нарушениями 462

Джоанна Ф. Коллингвуд и Джон Добсон

18.1. Введение	462
18.2. Железо в головном мозге человека	462
18.2.1. Общие сведения.	462
18.2.2. Запасное железо.	463
18.2.2.1. Ферритин	464
18.2.2.2. Гемосидерин	465
18.2.2.3. Магнетит	467
18.2.2.4. Нейромеланин	467
18.2.3. Региональное распределение соединений железа	468
18.2.4. Транспорт железа	469
18.3. Роль соединений железа в нейродегенеративных нарушениях	470
18.3.1. Общие сведения.	470
18.3.2. Болезнь Альцгеймера	471
18.3.3. Болезнь Хантингтона	473
18.3.4. Болезнь Паркинсона	473
18.3.5. Нейродегенерация с накоплением железа в мозге	474
18.3.6. Ацерулоплазминемия.	475
18.3.7. Нейроферритинопатия	475
18.3.8. Другие нейродегенеративные нарушения.	476
18.3.9. Гемохроматоз	476
18.4. Магнитные свойства соединений железа в головном мозге	477
18.5. Экспериментальные методы	478
18.5.1. Целостность образца	478
18.5.2. Микроскопия и спектроскопия	478
18.5.3. Магнитные свойства	479
18.5.4. Клинические методы	480
18.6. Применение в клинической практике	481
18.6.1. Связывание железа	481
18.6.2. Диагностика.	482

18.6.3. Синтез наночастиц	482
18.6.4. Наночастицы железа в качестве контрастных агентов	483
18.7. Заключение.	483
Литература	484
Глава 19. Применение нанотехнологии в науках о жизни: польза или риск?	492
<i>Юун-Сик Ли и Мьонг-Ханг Чо</i>	
19.1. Введение	492
19.2. Доставка лекарств и генов	493
19.3. Быстрый анализ биологических объектов	495
19.4. Тканевая инженерия	497
19.5. Вопросы безопасности	497
19.6. Заключение.	498
Благодарности	499
Литература	499
Предметный указатель	502

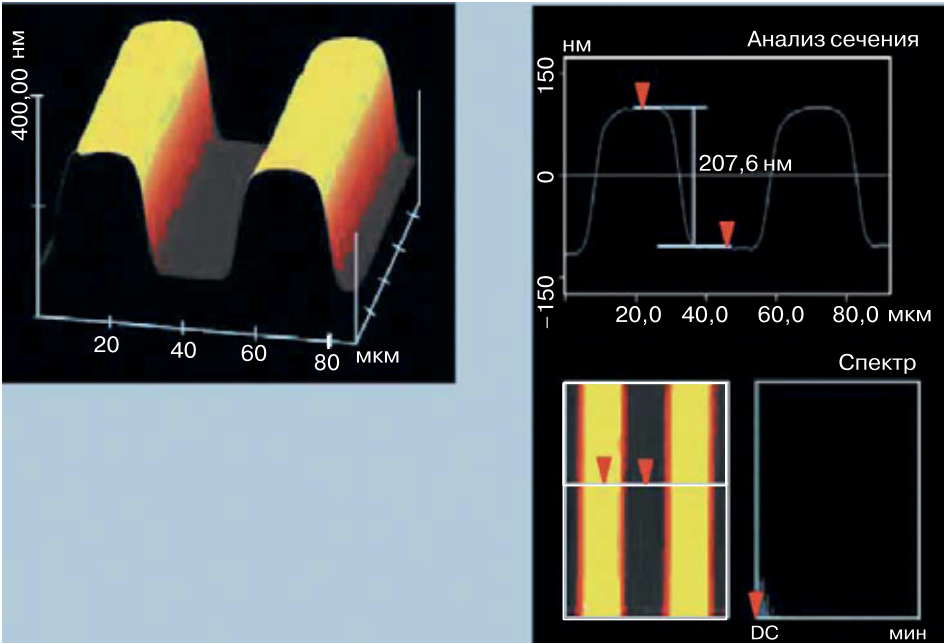


Рис. 2.5. Полученные с помощью атомно-силового микроскопа микрофотографии поверхности. Рисунок нанесен сополимером полиметилметакрилата и поли-3-*трет*-бутоксикарбонил-N-винил-2-пирролидона

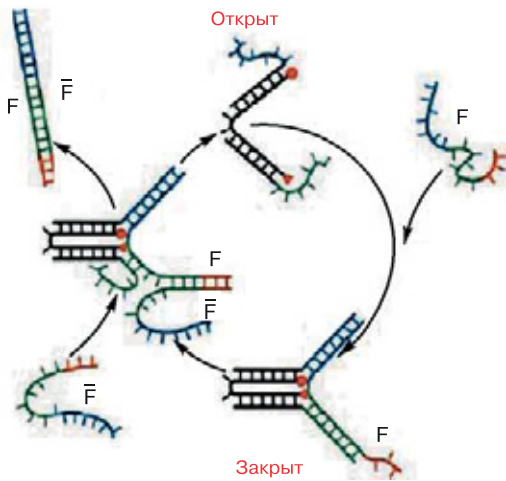


Рис. 3.2. Функционирование молекулярного «пинцета»: закрытие и раскрытие. Закрывающаяся цепь F гибридуется с концами цепей В и С (показаны голубым и зеленым цветом) чтобы стянуть «пинцет» в закрытое состояние. Гибридизация с выступающей частью (красная) позволяет F-цепи удалить F из пинцета с формированием двухцепочечного излишка FF и вызывает раскрытие пинцета. Цветом выделены комплементарные отрезки В, С, F и F, гибридуемые при закрытии и открытии пинцета

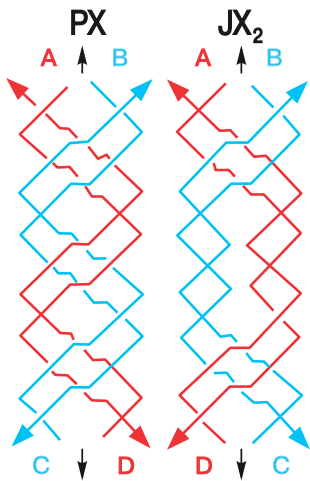


Рис. 3.3. Схематическое изображение фрагментов PX и JX₂. Постулируется, что фрагмент PX вовлечен в генетическую рекомбинацию и состоит из двух спиралей, сформированных четырьмя цепями с центральной диадной осью (на схеме показана черными вертикальными стрелками). Две цепи выделены красным цветом и две — голубым, при этом окончания стрелок показывают 3'-концы цепей. Основания спарены по Уотсону–Крику. Любое возможное пересечение происходит между двумя спиральями. В фрагменте JX₂ потеряны два пересечения. Буквы А, В, С и D совместно с цветовой маркировкой показывают, что нижняя часть фрагмента JX₂ (С и D) развернута на 180° относительно фрагмента PX

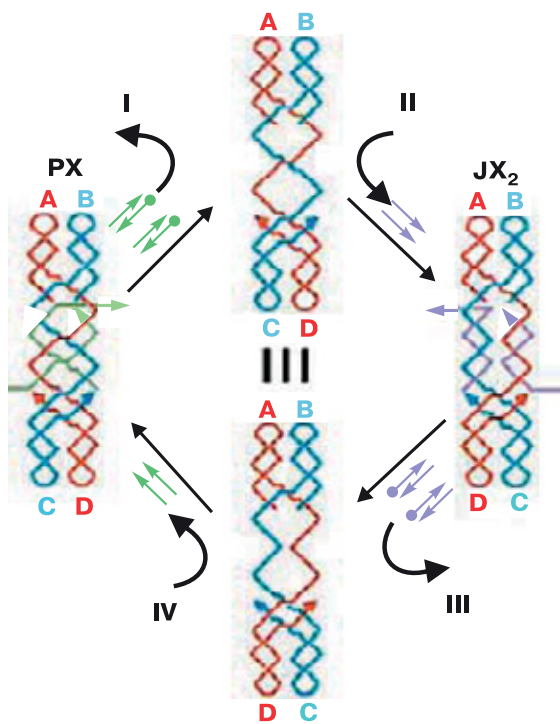


Рис. 3.4. Принципы работы наномотора PX–JX₂. В процессе I зеленый набор цепей удаляется из молекулы PX за счет добавления биотинилированных зеленых «топливных» цепей (биотин указан черными кружочками). В процессе II неструктурированный промежуточный продукт превращается во фрагмент JX₂ за счет добавления бледно-пурпурного набора цепей. Молекула JX₂ конвертируется в неструктурированный промежуточный продукт за счет добавления биолитинилированных бледно-пурпурных «топливных» цепей в процессе III. Промежуточные продукты идентичны. Цикл завершается после добавления зеленого набора цепей в процессе IV с восстановлением PX

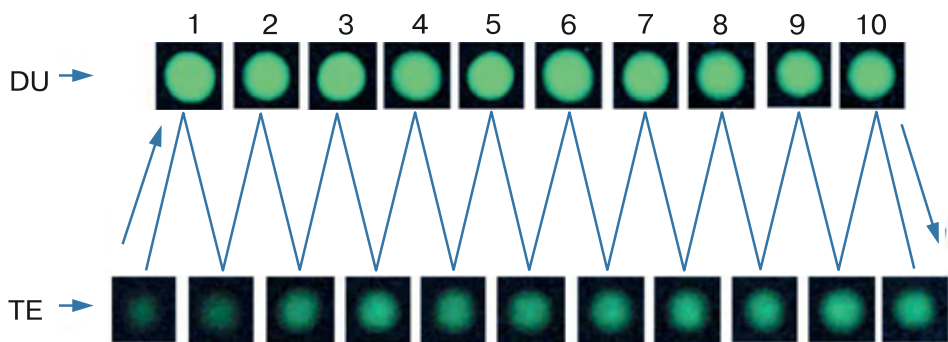


Рис. 3.8. Циклический процесс функционирования ДНК мотора, зафиксированный с помощью цифровой камеры. В данном случае записаны десять рабочих циклов

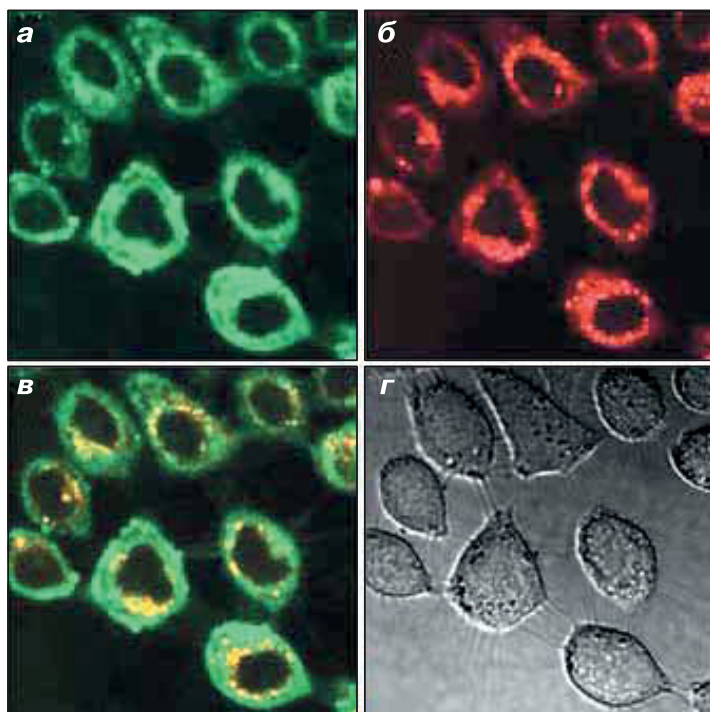


Рис. 4.7. Полученное с помощью конфокального микроскопа изображение клеток HeLa, инкубированных с мечеными фолатом полимерными наночастицами: *а* — зеленая флуоресценция частиц; *б* — краситель Лизотрекер красный; *в* — наложение двух каналов; *г* — изображение в режиме пропускания. Эксперимент проводился в сотрудничестве с Яном Шмиелевски в Университете Purdue (США)

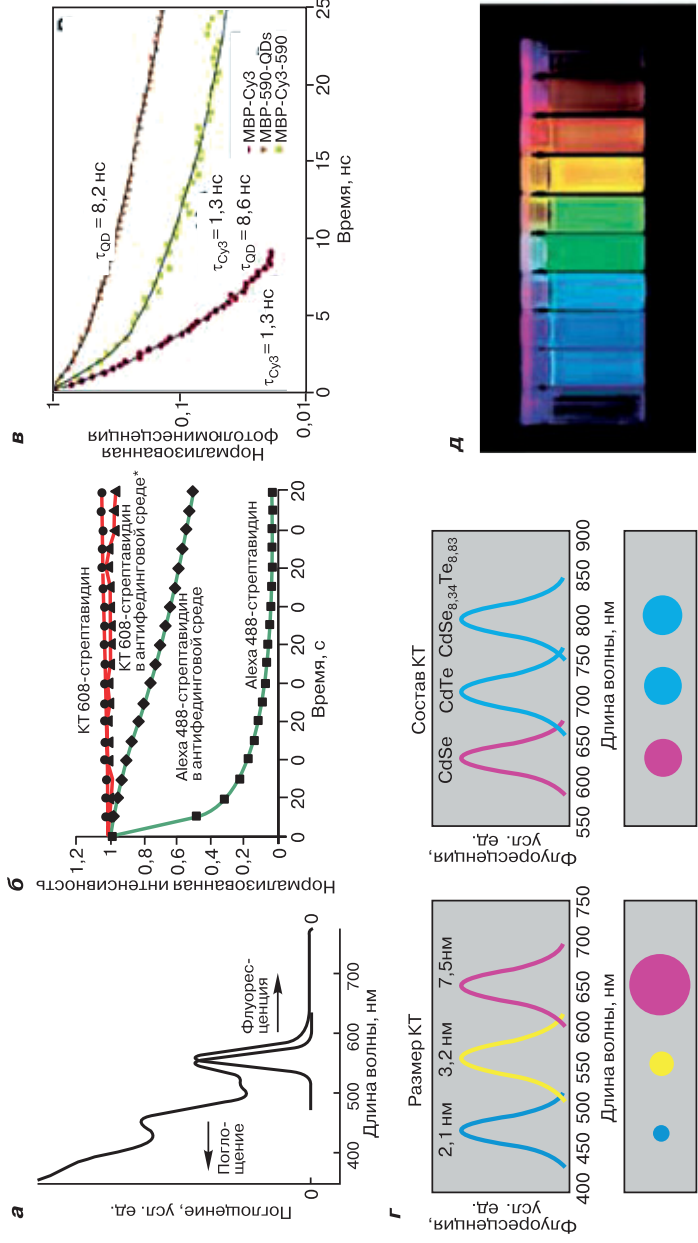


Рис. 8.1. Новые оптические свойства квантовых точек (КТ): *а* — широкий спектр поглощения и узкий и симметричный спектр излучения (воспроизводится в соответствии с работой Muthay et al. (1993) с разрешения Американского химического общества); *б* — сравнение фотостабильности КТ и красителя Алекса-488 (воспроизводится в соответствии с [18] с разрешения Nature publishing group); *в* — длительность флуоресценции связанных с белками КТ по сравнению с флуоресценцией красителей Cu₃ (воспроизводится в соответствии с [19] с разрешения Американского химического общества); *г* — регулировка длины волны излучения КТ путем изменения их размера или состава (воспроизводится в соответствии с [20]); *д* — излучение ярких КТ охватывает весь спектр видимого света (воспроизводится из [7])

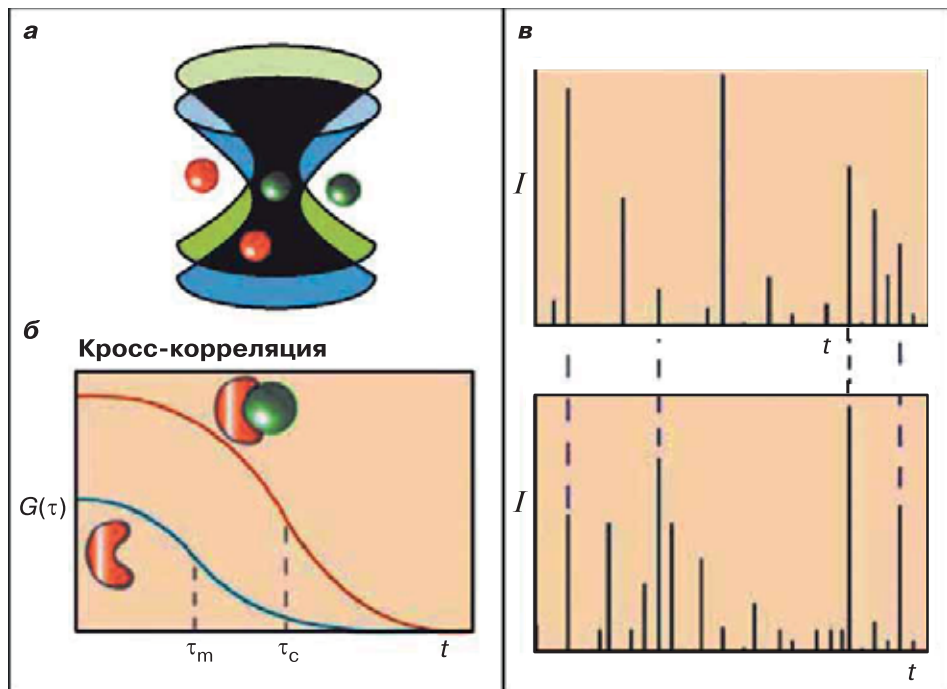


Рис. 8.3. Определение единичных молекул методом двухцветной флуоресцентной корреляционной спектроскопии: *а* — невозможность достижения парфокальности и перекрытия анализируемых объемов при использовании двухцветных лазеров за счет сферических и хроматических aberrаций объектива микроскопа применяется для возбуждения двух красителей; *б* — сигналы от двух флуорофоров разного цвета анализируют методом перекрестной корреляции или (*в*) по совпадению времени достижения двух детекторов ЛФД

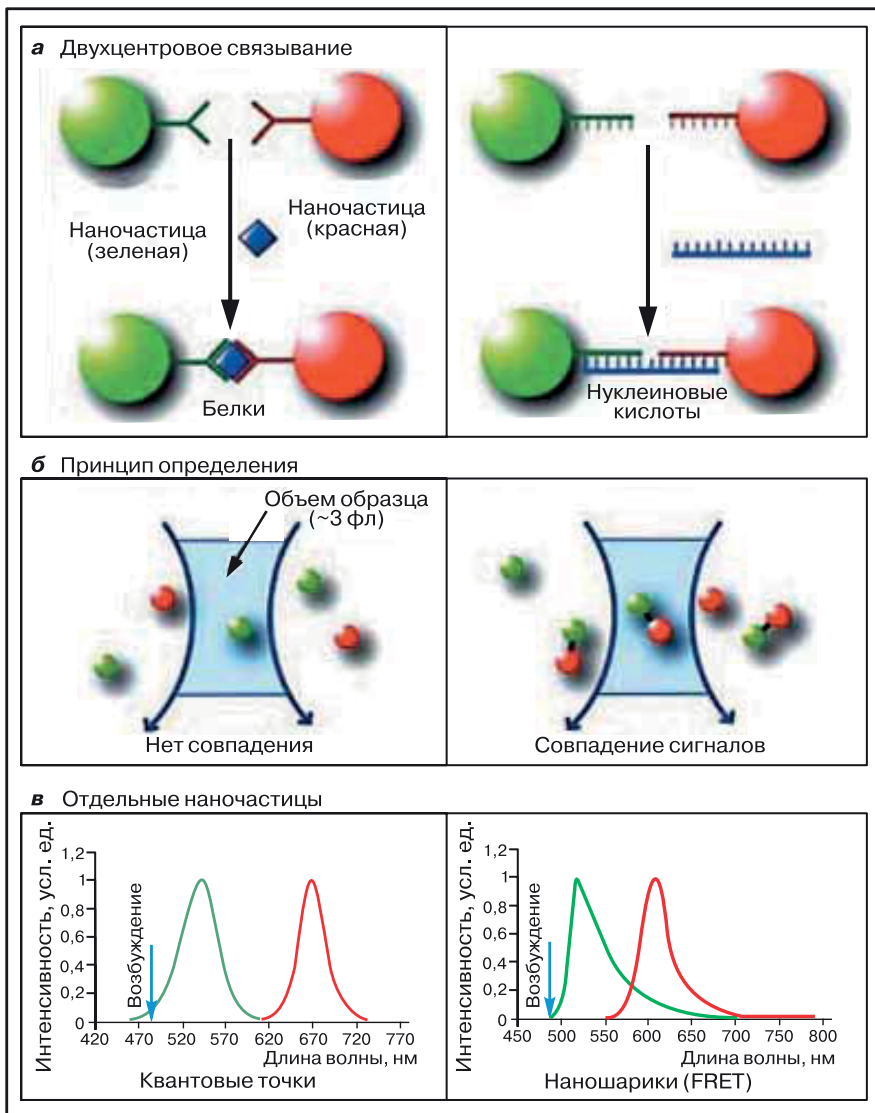


Рис. 8.4. Определение единичных молекул с помощью меченых разными цветами наночастиц с образованием структуры «сэндвича»: *а* — одновременное связывание по двум центрам для определения белков и нуклеиновых кислот; *б* — свободные меченые наночастицы и образующие «сэндвич» пары проходят через сфокусированный лазерный пучок; *в* — спектр флуоресценции меченых цветом квантовых точек (КТ) и наночастиц с резонансным переносом энергии. На левой панели отражено красное и зеленое свечение КТ, одновременно возбуждаемых светом от одного и того же источника при длине волны 420 нм. На правой панели изображено зеленое и красное свечение наночастиц, возбуждаемых при той же длине волны, во время резонансного переноса энергии. Стрелки указывают относительное положение длины волны возбуждающего света (488 нм), используемого при определении единичных молекул

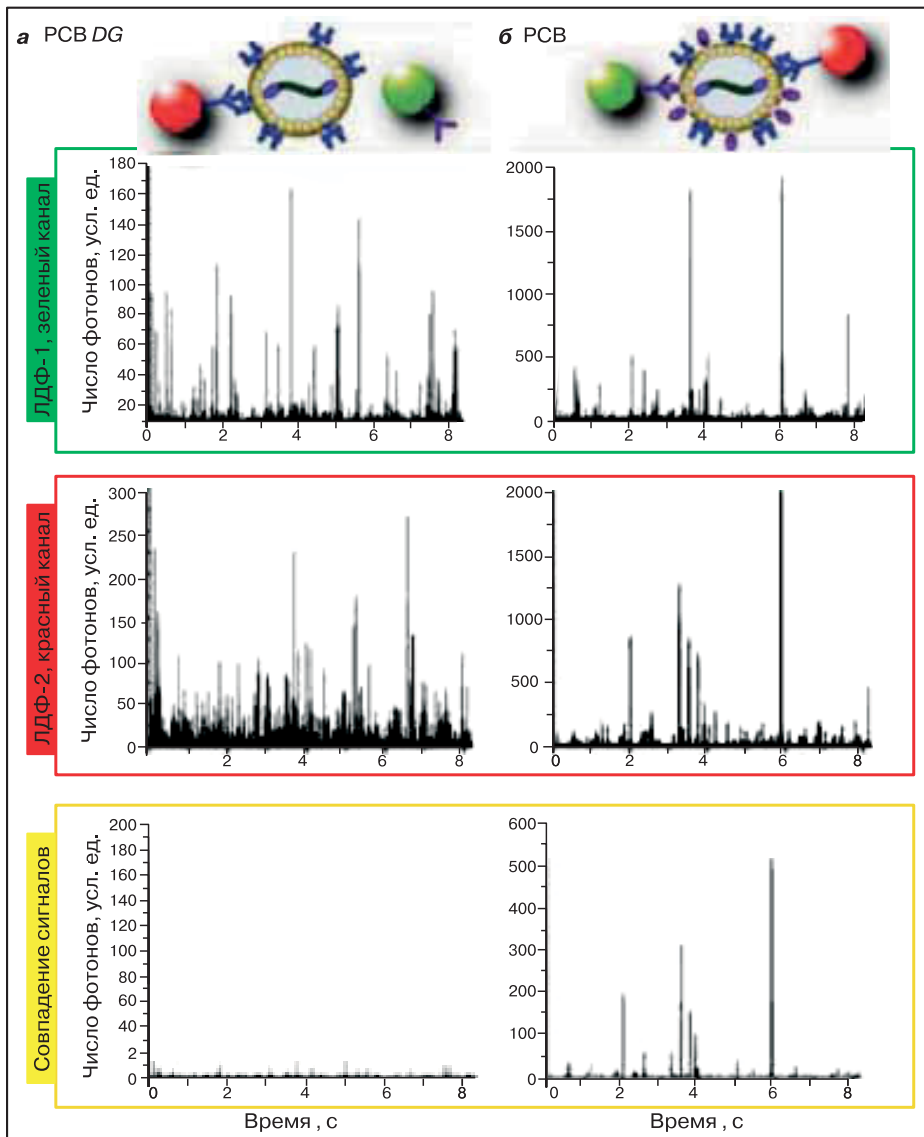


Рис. 8.6. Подсчет вирусных частиц в растворе. Наночастицы диаметром 40 нм, конъюгированные с моноклональными антителами против F и G-белков РСВ, светились красным и зеленым светом соответственно. В качестве контрольного образца использовали вирус, не экспрессирующий белка G (PCB Δ G); в этом случае наблюдалась зеленая флуоресценция, и совпадения сигналов не происходило (а), в то же время для полноценного РСВ регистрировали совпадение сигналов (б)

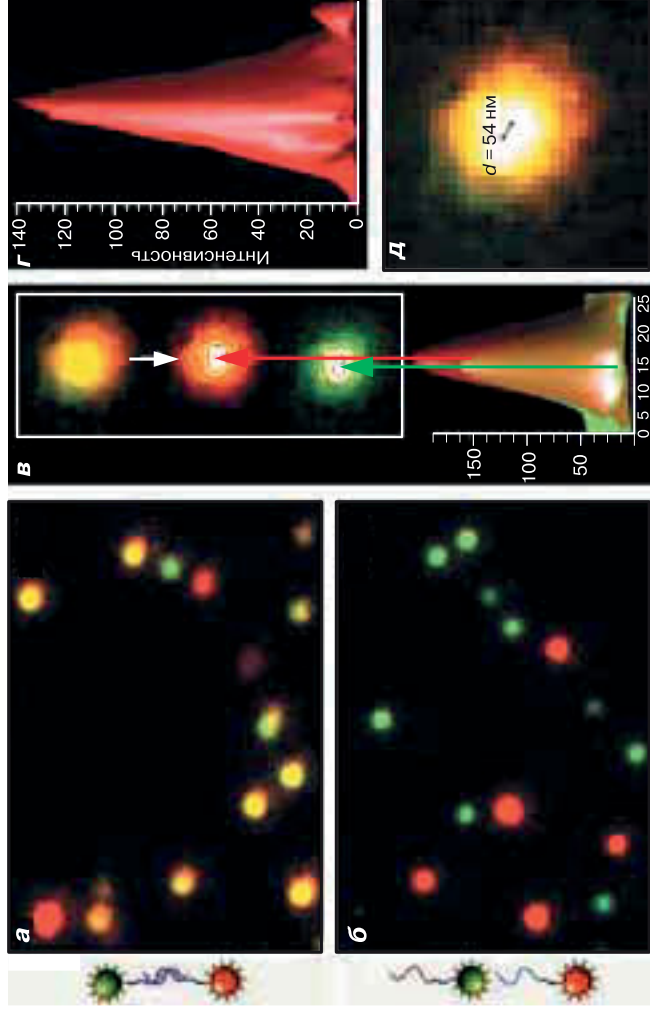


Рис. 8.7. Получение двухцветных изображений и определение локализации наночастиц с точностью до нескольких нанометров (*a* и *б*); изменение окраски наночастиц происходит только в присутствии комплементарных последовательностей — изображение реальной пары, образованной красным и зеленым шариком, разделенной на составляющие компоненты (*в* и *д*); для определения центра которой использовали гауссово ядро (> 60). Высокое значение отношения сигнала/фон (> 60) обуславливает высокую точность измерений

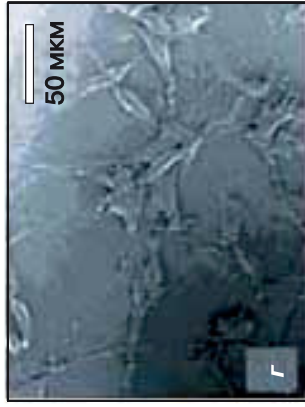
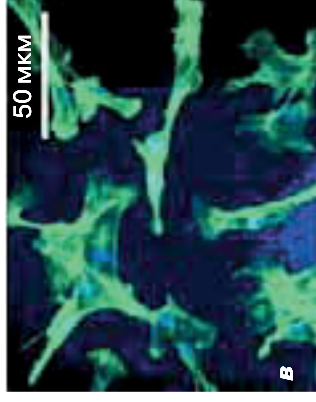
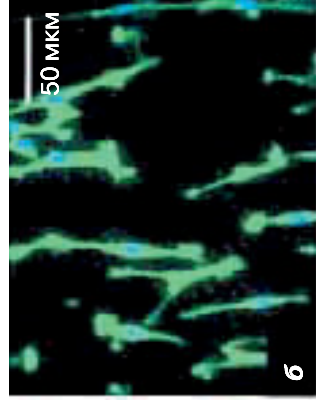
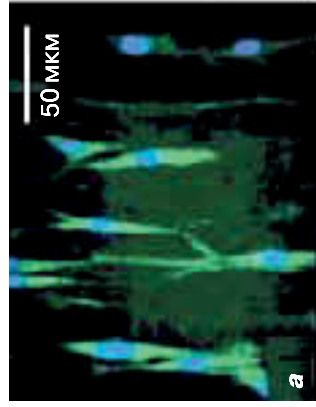


Рис. 10.4. Конфокальные микрофотографии окрашенных F-актином клеток гладких мышц, выращенных на различных подложках: *a* — ПММА с наноимпринтингом поверхности; *б* — ПДМС с наноимпринтингом; *в* — гладкая поверхность ПММА. На фотографиях (*в*) и (*д*) показаны СЭМ-изображения клеточ культур, выращенных на поверхностях ПММА с наноимпринтингом и без соответственно. При сравнении заметно удлинение структуры клеток на поверхности с импринтингом. Перепечатывается с разрешения из [78]

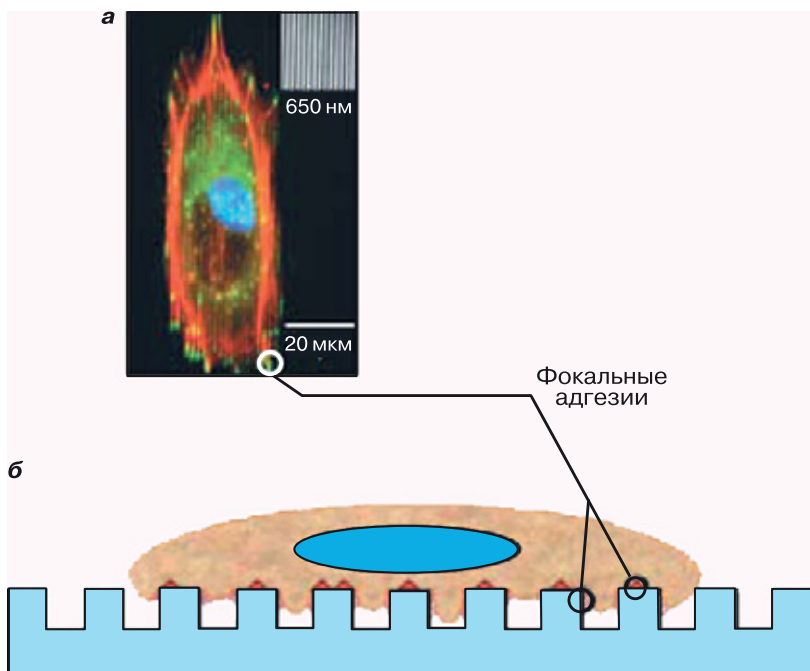


Рис. 11.6. Фиксирующие клетки фокальных адгезий на поверхностях с наноканавками: *a* — клетки и их актиновые волокна (красный цвет) выстраиваются параллельно канавкам, фокальные адгезии антител против винкулина (зеленый цвет) также выстраиваются вдоль канавок. На (*б*) схематично показан разрез клетки, растущей на поверхности с наноканавками. Клетка формирует фокальные адгезии (красный цвет) на вершине гребней и постепенно «опускается» вдоль стенок канавок. Стоит отметить, что клетки, располагающиеся на самых малых по размеру наномасштабных особенностях, обычно лежат поперек направления гребней и не заполняют канавки своими элементами

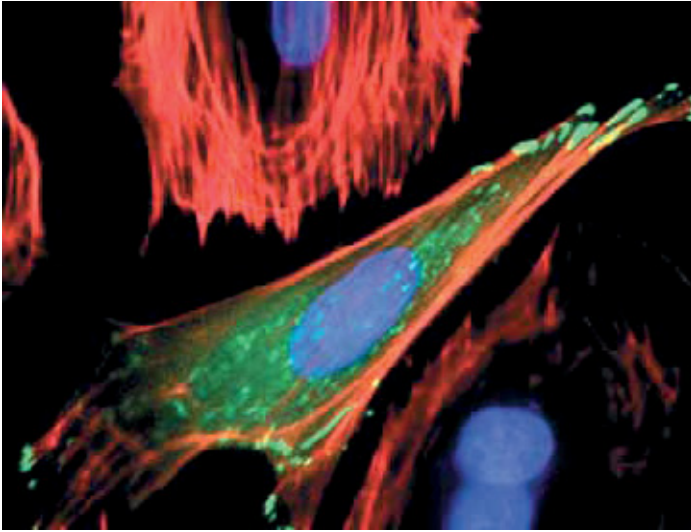


Рис. 12.1. Флуоресцентное изображение отдельной клетки капилляра эндотелия с экспрессией. Зеленым цветом выделен GPG винкулина. F-актин окрашен красителем Alexa 468-фаллоидин (красный цвет), а ядро — DAPI (синий). Отметим, что каждое стрессорное волокно актина закрепляет фокальную адгезию на удаленных концах

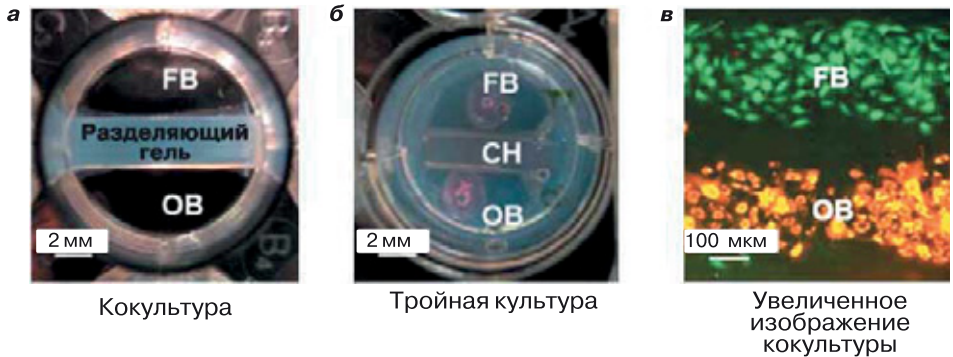


Рис. 14.2. Примеры использования моделей межклеточного взаимодействия в тканевой инженерии: *a* — кокультура фибробластов и остеобластов с временным разделяющим агарозным гелем; *b* — совместное культивирование фибробластов и остеобластов в присутствии хондроцитов, включенных в трехмерный гидрогель; *v* — изображение кокультуры фибробластов и остеобластов, полученное с помощью микрожидкостной технологии. FB — фибробласты, OB — остеобласты, CH — хондроциты

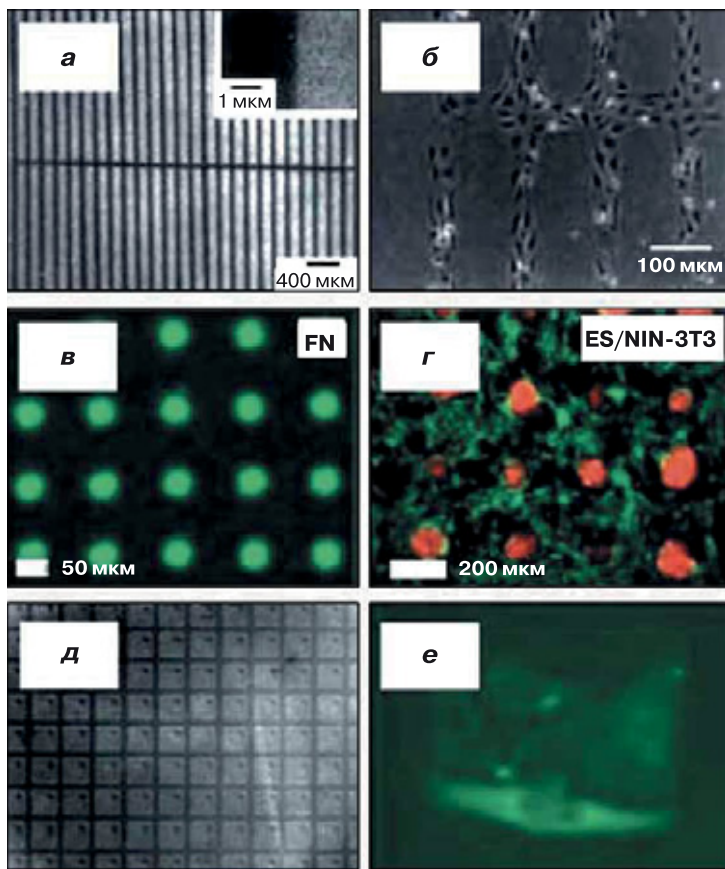


Рис. 15.4. Создание специфического рисунка поверхности с помощью нескольких новых методов. Микрофотографии самоорганизующихся монослоев (SAM), полученных на поверхности золота методом микроконтактной печати, со связанным фибронектином (*a*) (черный цвет) и со связанными клетками эпителия капилляров быка (*b*); воспроизводится из [56] с разрешения Academic Press. Послойное покрытие с помощью метода литографии капиллярных сил: *в* — флуоресцентное изображение адсорбции фибронектина на поверхности, обработанной гиалуроновой кислотой; *г* — флуоресцентное изображение однодневной кокультуры клеток ES (красные) и фибробластов NIH-3T3 (зеленые); воспроизводится из [62] с разрешения Elsevier. Флуоресцентная микрофотография, изображающая избирательную адсорбцию белка на адгезивных участках аминопропилсилана (*д*, ширина линии $L = 4$ мкм) и отраженное изображение трансфицированных GFP-меченных тубулином клеток HeLa, прикрепленных на островке площадью 100 мкм^2 (*е*); (воспроизводится из [64] с разрешения Nano Science и Technology Institute)

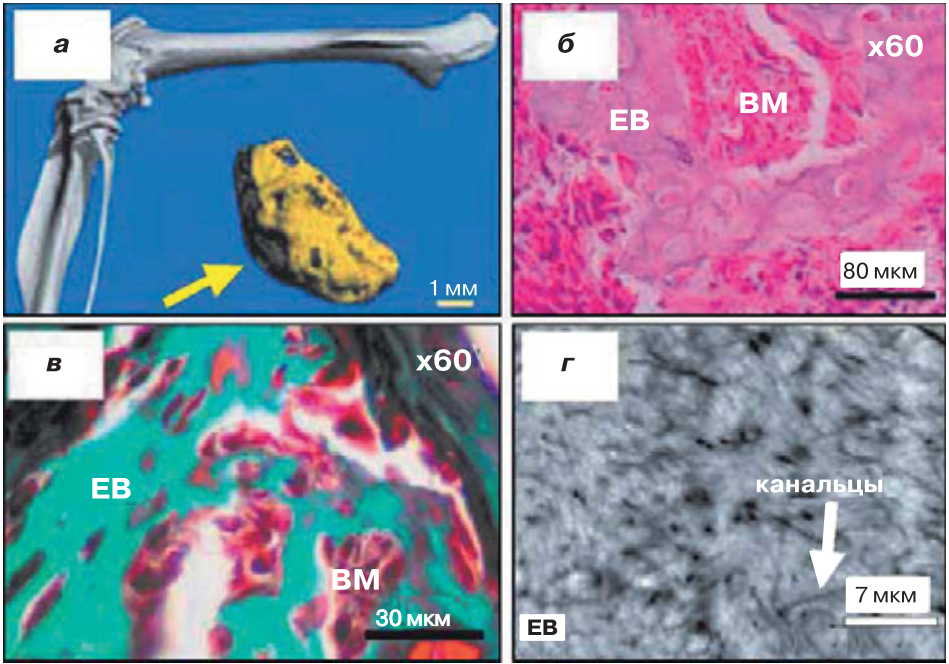


Рис. 15.6. *a* — Полученное с помощью микрокомпьютерной томографии изображение бедренной кости и реконструированной костной ткани. На следующих рисунках отражены результаты гистологического анализа реконструированной костной ткани. Участки локализации костного мозга (*б* — окрашивание гематоксилином-эозином) и коллагена (*в* — окрашивание трихромом по Массону; зеленый цвет); *г* — метод электронной микроскопии обратного рассеяния выявил наличие канальцев, характерных для структуры бедренной кости (EB — реконструированная костная ткань; BM — костный мозг). Воспроизводится из [79] с разрешения Elsevier

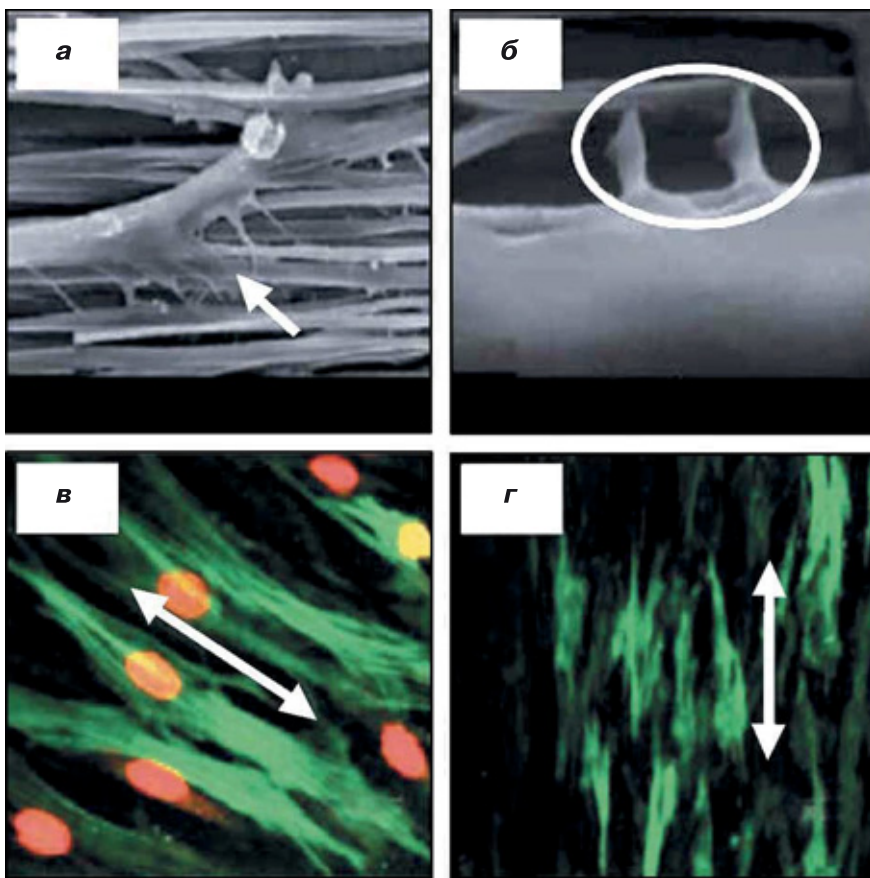


Рис. 15.7. СЭМ-изображение, демонстрирующее адгезию ГМК на нановолокнах сополимера *L*-молочной кислоты и капролактама: *а* — выстраивание ГМК вдоль волокна и участок локального контакта; *б* — увеличенное изображение локальных контактов между ГМК на соседних нановолокнах. Микрофотографии ГМК после суток культивирования и иммунологического окрашивания нитей α -актина (*в*) и миозина (*г*). Стрелки показывают ориентацию волокон. Воспроизводится из [88] с разрешения Elsevier

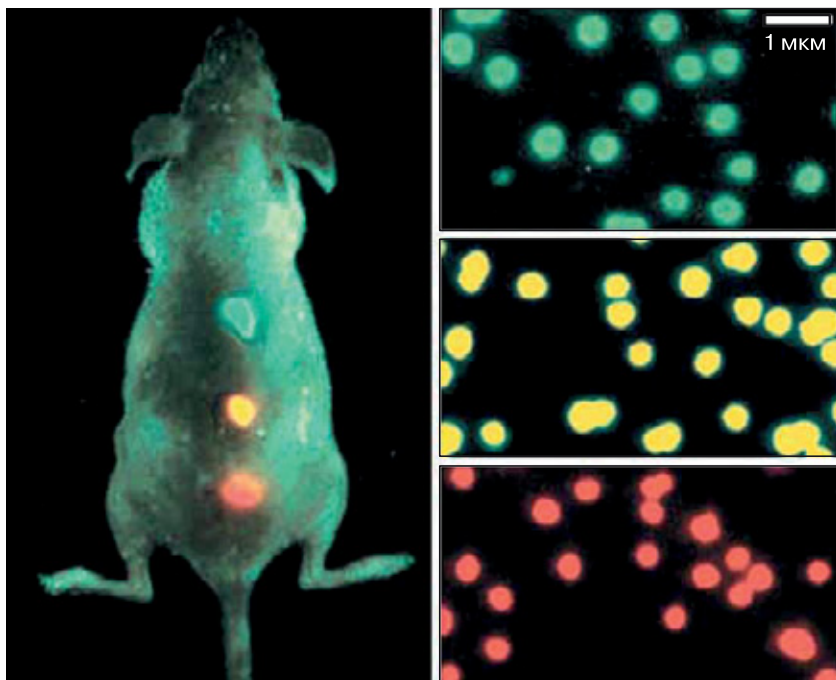


Рис. 16.1. Возможность получения многоцветного изображения с помощью КТ в живом организме. В три соседних участка тела животного подкожно вводили от одного до двух миллионов КТ каждого цвета. Изображения получали в результате возбуждения с помощью вольфрамовой или ртутной лампы. Воспроизводится из [25] с разрешения издательства Macmillan Publisher Ltd.

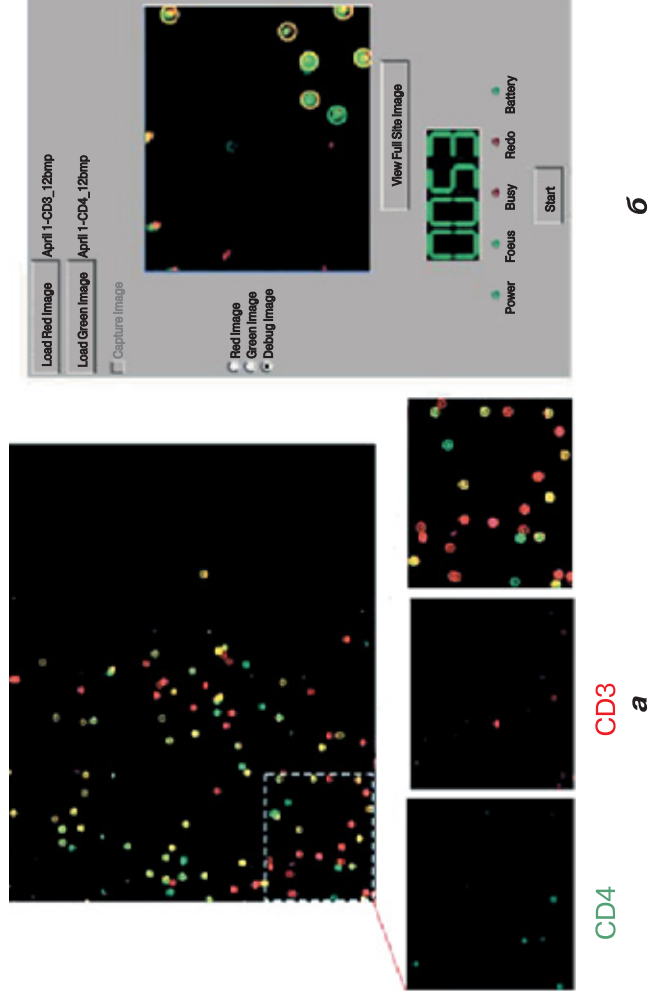


Рис. 17.5. Обнаружение CD4+ T-лимфоцитов с помощью микрожидкостного устройства для мониторинга ВИЧ: *a* — на полученном изображении клетки красного цвета соответствуют CD3+ T-лимфоцитам; зеленые — CD4+ T-лимфоцитам, а желтые — CD4+ и CD3+ T-лимфоцитам; *б* — автоматическая обработка конкретного образца: программа распознает желтые кружки и определяет концентрацию CD4+ T-лимфоцитов, которая в данном примере составляет 53 клетки/мкЛ

Минимальные системные требования определяются соответствующими требованиями программы Adobe Reader версии не ниже 11-й для платформ Windows, Mac OS, Android, iOS, Windows Phone и BlackBerry; экран 10"

Научное электронное издание

Серия: «Нанотехнологии»

НАНОСТРУКТУРЫ В БИОМЕДИЦИНЕ

Ведущий редактор канд. хим. наук *Д. К. Новикова*

Редактор канд. биол. наук *О. К. Хованская*

Художник *С. Инфантэ*

Технический редактор *Е. В. Денюкова*

Корректор *Е. Н. Клитина*

Компьютерная верстка: *В. А. Носенко*

Подписано к использованию 19.03.15.

Формат 145×225 мм

Издательство «БИНОМ. Лаборатория знаний»

125167, Москва, проезд Аэропорта, д. 3

Телефон: (499) 157-5272

e-mail: info@pilotLZ.ru, <http://www.pilotLZ.ru>