В течение последнего десятилетия пристальный интерес исследователей всех отраслей прикован к соз- данию и изучению свойств наноматериалов. Наиболее перспективным является применение наноматериалов ​ в терапевтических и диагностических целях, а также их использование для изготовления изделий медицин- ского назначения [1].

К наноматериалам относят материалы, содержа- щие структурные элементы, размеры которых в одном из измерений не превышают 100 нм, обладающие ка- чественно новыми свойствами.

На 7-й Международной конференции по нанотех- нологиям (Висбаден, 2004) была принята классифика- ция, согласно которой наноматериалы подразделяются на следующие типы:

• нанопористые структуры;

• наночастицы;

• нанотрубки и нановолокна;

• нанодисперсии (коллоиды);

• нанокристаллы и нанокластеры.

На сегодняшний день углеродные нанотрубки (УНТ) являются наиболее популярным типом нанома- териалов, который вызывает повышенный интерес среди представителей разных медицинских направле- ний. Развитие фундаментальных и прикладных пред- ставлений об углеродных нанотрубках уже в ближай- шие годы может привести к кардинальным изменени- ям в материаловедении, электронике, биологии, медицине и экологии [2].

Строение и классификация УНТ

Нанотрубки – это класс наноматериалов, имею- щий уникальные геометрические, оптические и меха- нические свойства в сочетании с химической стабиль- ностью [3]. УНТ имеют ультралегкий вес и развитую удельную поверхность, что определяет высокое отно- шение их площади к массе [4, 5]. УНТ обладают вы- сокой теплопроводностью и необычными электриче- скими свойствами, которые варьируют от металличе- ских до полупроводниковых. УНТ имеют большую площадь поверхности, что делает их способными по- глощать и включать в свой состав большое количество веществ (например, лекарственных препаратов).

Идеальная нанотрубка представляет собой свер- нутую в цилиндр графеновую плоскость, т.е. поверх- ность, образованную правильными шестиугольника- ми, в вершинах которых расположены атомы углеро- да. Одной из особенностей нанотрубок является то, что их свойства в большой мере зависят от их геомет- рии.

Одностенные углеродные нанотрубоки (ОУНТ) представляют собой листы графена, построенные из sp2-гибридизированных атомов углерода, и имеют диаметр около 0,4 нм. Вершина идеальной нанотрубки представлена полусферой.

Многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) отличаются от одностенных значительно более широ- ким разнообразием форм и конфигураций. Они пред- ставляют собой 2–30 концентрически расположенных трубок с наружным диаметром от 5 до 100 нм. Разно- образие структур проявляется как в продольном, так и в поперечном направлении.

Структура типа матрешки представляет собой со- вокупность коаксиально вложенных друг в друга ци- линдрических трубок или призм. Другая разновид- ность структуры многослойной нанотрубки представ- лена в виде единой графеновой плоскости, свернутой в свиток.

Структура типа папье-маше – многослойная ци- линдрическая структура, составленная из небольших графитовых фрагментов.

Для всех приведенных структур расстояние между соседними графеновыми слоями близко к 0,34 нм, что соответствует расстоянию между соседними плоско- стями кристаллического графита [6].

Немодифицированные углеродные нанотрубки.

В настоящее время вопрос о механизмах токсич- ности немодифицированных нанотрубок остается от- крытым, имеются сведения как об их безвредности для организма животных, так и о разрушительном влиянии на клеточном уровне.

Воздействие ОУНТ может вызвать повышенную гибель нормальных клеток, повреждение ДНК, фос- форилирование Н2АX и активирование PARP, AP-1, NF-B, p38 в зависимости от дозы. На основе клеточ-ных и молекулярных данных действительно можно предположить, что УНТ способны вызывать неблаго-приятные клеточные реакции, связанные с окисли-тельным стрессом [7].

Применение ОУНТ на животных показывает, что они плохо распознаются макрофагами, и легочный воспалительный ответ на ОУНТ является непостоян- ным [8]. R.R. Mercer и соавт. [9] сообщили об осажде-нии меченых ОУНТ в альвеолярном интерстиции, в том числе субплевральных областях и мезотелии, по-сле ингаляционного введения ОУНТ. D.B. Wahrheit и соавт. Сообщили, что ингаляцион-ное воздействие ОУНТ на крыс приводит к недозоза-висимым мультифокальным гранулемам в легких.

C.W. Lam и соавт. Определили, что все ОУНТ вызы-вают дозозависимую гранулему и воспаление в легких [8]. Токсикологические исследования, проведенные на мышах J. Folkmann, дали неоднозначные результаты: от отсутствия токсичности до воспаления с формиро-ванием гранулем в легких [10] и смерти эксперимен-тальных животных [11] из-за введения ОУНТ интрат-рахеально. Исследования in vivo и in vitro M. Pacurari и соавт. На токсичноcть и патогенность ОУНТ проде-монстрировали клеточные реакции, включающие вос-палительный ответ, окислительный стресс и разраста-ние фиброзной ткани [7]. H. Tsuda и соавт. Выявили, что наночастицы формируют агрегаты и агломераты и вызывают воспалительные реакции в тканях. При вве- дении нанотрубок интратрахеально самкам мышей воспалительных процессов в трахее и бронхах не вы- явлено. Образование грануляций наблюдалось в брон- хиолах и альвеолах. При использовании МУНТ не- большие грануляции были обнаружены в бронхиолах и межальвеолярных перегородках [12]. Исследования R.M. Reilly показали, что водонерастворимые УНТ обладают высокой токсичностью in vitro ко многим клеткам организма: кератиноцитам человека, нейро-нам крыс, гепатоцитам эмбрионов человека и клеткам рака легкого человека [13]. Воздействие УНТ длиной 220 и 825 нм на моноциты человека in vitro вызвало их активацию вне зависимости от длины УНТ [14].

Следует отметить, что генерация активных форм кислорода (АФК) и развитие окислительного стресса является важным механизмом действия всех наноча- стиц. Опасное воздействие фуллерена и ОУНТ заключа- ется в окислительном стрессе и повреждении ДНК, что может стать начальным этапом в развитии рака. Срав- нение эффектов МУНТ и ОУНТ показывает, что длин- ные и толстые МУНТ вызывают значительные повреж- дения ДНК, в то время как аналогичные по длине ОУНТ оказывают меньший негативный эффект [15].

А.А. Шведова и соавт. Показали реакцию альвео-лярных макрофагов мышей на ОУНТ, которые сни-жают активность фагоцитоза и производство NO.

Также было продемонстрировано, что использование ОУНТ снижает способность легких мышей восстанав-ливаться после бактериальных инфекций. Исследова-ния in vitro выявили, что ОУНТ подавляет способ-ность RAW-клеток продуцировать циклокиназу-2 в ответ на бактериальные липополисахариды [16].

УНТ вызывают легочную токсичность, подобно асбестовым волокнам [7]. Kак и асбест, нанотрубки длиной более 20 мкм вызывают повреждения в брю-шине мышей, что считается начальным этапом разви-тия мезотелиомы, рака плевры и брюшины. Короткие нанотрубки не приводят к такому эффекту [17].

Модифицированные углеродные

нанотрубки

Для того чтобы нивелировать негативные эффек- ты немодифицированных нанотрубок, а также придать им ряд дополнительных свойств, существует возмож- ность их модификации.

Показано, что углеродные нанотрубки могут свя- зывать различные соединения: пептиды, белки (стреп- тавидин), углеводы, нуклеиновые кислоты, а также проникать через мембраны клеток в цитоплазму за счет функционализированных поверхностей [18]. Тем не менее количество молекул, особенно высокомоле- кулярных соединений, сопряженных с каждой УНТ, существенно ограничено. Кроме того, молекулы, при- нятые УНТ, должны быть освобождены в клетке в неизменном состоянии, чтобы иметь возможность участвовать в метаболизме [19, 20].

Прежде чем использовать ОУНТ, необходимо пре- вратить их в стабильные в водных растворах структуры [21]. Это может быть достигнуто путем нековалентного покрытия ОУНТ поверхностно-активными веществами или полимерами, либо ковалентной функционализацией их боковых стенок с подходящими гидрофильными группами. Нуклеиновые кислоты, в том числе одноце- почечные ДНК и РНК, способны стабилизировать ОУНТ в воде через нековалентные связи [22].

Функционализация УНТ может проводиться допол- нительной реакцией присоединения к ненасыщенной π- электронной системе карбенов, нитрилов, радикалов или солей диазония [16, 23]. Покрытие поливинилацета- том предотвращает агрегацию между поверхностно- модифицированными УНТ и препятствует осаждению УНТ в водном растворе за счет гидрофобных взаимо- действий [24]. Функционализированные УНТ способ- ны одновременно связывать несколько структур, обеспечивающих нацеливание (белки, металлы), диаг- ностику и лечение, тем самым улучшая терапевтиче- ский эффект. За счет сорбционных взаимодействий нанотрубки способны изменять структуру ДНК, инги- бируя основные клеточные процессы (транскрипция, трансляция и репликация), что приводит к гибели кле- ток.

Функционализированные гидрофильные ОУНТ могут транспортировать пептиды, белки, гены и ДНК через клеточные мембраны и обладают низкой токсичностью. Функционализация делает УНТ гид- рофильными и снижает их цитотоксичность и имму- ногенность [25].

УНТ могут обеспечивать безопасную невирусную доставку молекул ДНК в клетки млекопитающих.

R. Singh и соавт. Обнаружили, что структура УНТ – ген приводит к более высокому уровню экспрессии генов по сравнению с нативной ДНК [26]. Токсич-ность УНТ не зависит от присутствия примесей и, вероятно, определяется геометрией, степенью функ-ционализации, агломерацией и другими параметрами [27].

Функционализация полиэтиленгликолем (ПЭГ) является признанной платформой для разработки сис- тем адресной доставки [2]. УНТ также функционали- зируют хелатом 1,4,7,10-тетраазациклододекан- 1,4,7,10-тетрауксусной кислоты (DOTA) для создания комплекса с иттрием-86 или индием-111 и монокло-нальными антителами анти-CD20, чтобы обнаруживать

В-лимфоциты при лимфомах [28]. Покрытие наноча- стиц гидрофильными молекулами, такими как ПЭГ, обычно используется для инициации быстрого погло- щения системой мононуклеарных фагоцитов [29, 30].

Полимеросновные наночастицы имеют много пре- имуществ, таких как высокая биодоступность и рас- творимость. Пэгилированные ОУНТ могут переносить широкий спектр гидрофобных лекарств.

Кроме того, функционализированные УНТ могут проходить через клеточную мембрану млекопитаю- щих путем эндоцитоза и другими механизмами [27, 31] за счет специальных пептидов или лигандов на их поверхности, взаимодействующими с опухолевыми рецепторами плазмолеммы.

Функционализированные УНТ проникают через клеточные мембраны и доставляют ассоциированные с ними материалы в клетку, что может быть использо- вано в системах генной доставки и молекулярной ви- зуализации [32, 33].

Однако большинство разработанных модифици- рованных нанотрубок не могут гарантировать опухо- левую абляцию, доставку генов и лекарств к клеткам.

Карбоксилирование УНТ усиливает гидрофиль- ность их поверхности, делая ее более доступной для сопряжения с транспортируемыми молекулами, и сни- жает токсичность нанотрубок [34]. Эксперименты с бак- териальными культурами также продемонстрировали снижение цитотоксичности при функционализации УНТ [23]. ОУНТ, покрытые фенил-SO3H и фенил-(COOH)2, обеспечивают лучшую жизнеспособность клеток [34]. M.R. McDevitt и сотр. [35] создали наноструктуры, состоящие из биопрепаратов, радионуклидов, флюо-рохромов и УНТ, которые предназначены для опухо-левых клеток-мишеней. Структуры на основе УНТ для адресной доставки к опухолям были получены из гид-рофильных УНТ путем ковалентного присоединения множественных копий опухолеспецифичных моно-клональных антител, радиометаллических ионных хелатов и флюоресцентных зондов.

Противомикробная активность УНТ

Уникальная противомикробная активность УНТ положена в основу разработок по защите здоровья человека. УНТ могут оказаться полезными для дезин- фекции воды, создания антимикробных покрытий и препаратов. Одним из направлений использования антимикробных свойств нанотрубок является созда- ние бионанопленок.

Бионанопленки – это материалы, которые полу- чаются после нанесения наноматериалов на поверх- ность. Они биосовместимы, имеют высокую антимик- робную активность, инертны, гидрофильны и легко удаляются после нанесения. Наибольшее распростра- нение получили наноструктуры на основе углеродных нанотрубок, функционализированных поливиниловым спиртом и серебряными наночастицами [30].

Неинвазивная визуализация

с помощью УНТ

Среди важных задач, которые встают перед иссле- дователями, – прижизненная визуализация опухолей in vivo. Одним из современных методов неинвазивной ви- зуализации органов и тканей является фотоакустическая томография. Повысить контрастность опухоли можно введением контрастирующих агентов на основе УНТ, сопряженных с циклическим аргинилглициласпараги- новым пептидом (RGD-пептидом) [36]. Фотоакустиче-ский сигнал ОУНТ находится в линейной зависимости от их концентрации. Использование ОУНТ в качестве контрастного вещества позволяет получить изображе-ние ткани на достаточной глубине [37].

Магнитные МУНТ также могут стать основой технологии отслеживания пораженных лимфатиче- ских узлов для распознавания и удаления опухоль- положительных лимфоузлов за счет агрегации маг- нитных частиц в очагах метастазирования [4].

Для выявления лимфатических метастазов были разработаны МУНТ, которые успешно доставляют гемцитобин в лимфатические узлы [38], и МУНТ, рас- творяющиеся в воде путем полимеризации акриловой кислотой in situ [27].

Целевая доставка лекарственных

и диагностических препаратов

с помощью УНТ

Существует три подхода к доставке лекарственных и диагностических препаратов с помощью нанотрубок [33]: а) использование функционализированных УНТ в качестве платформ для доставки препаратов; б) соеди- нение УНТ с противоопухолевым пролекарством, кото- рое активируется внутри опухолевых клеток при воз- действии на нанотрубки извне; в) прикрепление опу- хольраспознающих модулей к поверхности нанотрубок.

ОУНТ могут использоваться в качестве транспорт- ного средства для доставки малых интерферирующих РНК в клетки млекопитающих [25]. УНТ широко при- меняются в противоопухолевой терапии, существует множество работ по их применению в качестве генных и лекарственных средств доставки [39].

Высокоочищенные (чистота 99% и более) и функ- ционализированые УНТ считаются практически не токсичными, если используются в низких концентра- циях и локально. Кроме того, слабая цитотоксичность делает их универсальным средством доставки [39].

Нанотрубки могут служить в качестве основы для систем целевой доставки лекарств и способны перено- сить большие дозы радионуклидов и химиотерапевти- ческих агентов в опухолевые клетки без разрушения нормальных тканей, значительно снижая побочные эффекты, которые обычно сопровождают многие со- временные методы лечения [40]. Основные преиму- щества нанотрубок заключаются в том, что они уве- личивают селективность лекарственных препаратов через пассивное или активное нацеливание, обеспечи- вая минимальную потерю препаратов, содействуя по- глощению их клетками. G. Pastorin и соавт. [41] разработали конъюгаты УНТ-метатрексат с помощью ковалентного взаимодей-ствия для использования в качестве мультимодальных систем по доставке лекарств. Исследовалась способ-ность доксорубицина нековалентно взаимодействовать с МУНТ в различном соотношении масс и оценивалась способность этого комплекса убивать опухолевые клет-ки рака молочной железы. Было показано, что МУНТ могут формировать нековалентные супрамолекулярные комплексы с доксорубицином, о чем свидетельствует резкое снижение интенсивности спектра флюоресцен-ции предположительно из-за π-π-сопряжения с МУНТ.

М. Mahmood и соавт. [42] провели следующее ис-следование: золотые, серебряные наночастицы и ОУНТ были доставлены к двум линиям клеток (MLO-Y4 и

HeLa) в различных концентрациях. После поглощения наноматериала процент клеточной гибели был самым высоким для УНТ и повышался постепенно с увеличе-

нием концентрации этих структур. Более того, когда наноматериалы доставлялись к клеткам с широко ис-пользуемыми химиотерапевтическими средствами, та-кими как этопозид и дексаметазон, число погибших клеток значительно возрастало (100–300%) по сравне-нию с раздельной доставкой этих средств и нанотрубок, т.е. клетки подверглись апоптозу при совместном вне-дрении наноматериалов с агентами.

Также было показано, что наличие противоопухо- левых агентов на поверхности УНТ может значитель- но усиливать эффективность химиотерапевтических препаратов [42]. Кроме того, функционализированные УНТ не нарушают функциональные свойства иммун- ных клеток [43].

Пегилированные МУНТ проникают в клетки мле- копитающих без повреждения клеточной мембраны, а их накопление не влияет на клеточную пролиферацию и клеточный цикл. Функционализированные УНТ гидрофильны и стабильны в сыворотке, проникают в опухолевые клетки млекопитающих, помогая транс- портировать биологические молекулы без изменения их

активности [2]. Такие УНТ имеют относительно дли- тельный период циркуляции и низкое поглощение системой мононуклеарных фагоцитов без заметных побочных эффектов у мышей, что делает их пригод- ными для доставки лекарственных препаратов [44].

Изучен транспорт рекомбинантного белка рицина в клетки при помощи МУНТ [45]. Рицин является од- ним из видов токсичных белков, который вызывает гибель клетки путем прохождения ретроградным транспортом из аппарата Гольджи в эндоплазматиче- скую сеть. Токсичный комплекс белка с МУНТ поме- щали в цитоплазму различных клеток, где он выпол- нял свою биологическую функцию, о чем свидетель- ствовала значительная гибель клеток. Малые размеры МУНТ являются ключевым моментом для успешной доставки молекул терапевтических препаратов, так как они представляют собой идеальные устройства для селективного прохождения внутрь клетки: их форма позволяет им выборочно проникать через био- логические барьеры неинвазивным путем.

Z. Liu и соавт. Исследовали возможность π-π- укладки доксорубицина на УНТ-ПЭГ для применения в качестве транспортного средства. Новый препарат обладает более высокой эффективностью, при этом отмечалось снижение токсичности по сравнению со свободным доксорубицином. Несмотря на то что большая часть комплекса оставалась в связанной форме в первые несколько минут после приема, по-степенно доксорубицин отделялся от нанотрубок и выводился через почки с мочой [46].

МУНТ используются для доставки генов (интер- ферирующих РНК), увеличивающих активность фаго- цитов, стимулирующих иммунный ответ и предот- вращающих рост опухоли. МУНТ захватываются микроглией и макрофагами, не вызывая значительных реакции со стороны иммунокомпетентных клеток как in vitro, так и in vivo [39].

Заключение

Открытие углеродных нанотрубок относится к наиболее значительным достижениям современной науки. Такие свойства УНТ, как небольшие размеры, хорошая электропроводность, высокие эмиссионные характеристики, высокая химическая стабильность и способность присоединять к себе различные химиче- ские соединения, позволяют надеяться на эффектив- ное применение нанотрубок в различных областях – электронике, химической технологии, нанобиотехно- логии и др.

Ключевым моментом прикладного использования УНТ в разнообразных биомедицинских приложениях является их способность проникать в ткани организма и переносить большие дозы агентов, оказывая тера- певтический и диагностический эффекты.

Функционализированные УНТ проникают через клеточные мембраны и доставляют ассоциированные с ними вещества в клетку. Благодаря этим преимущест- вам, нанотрубки являются перспективной основой для систем целевой доставки различных веществ.

Другим актуальным направлением использования УНТ в медицине является визуализация объектов на молекулярном, клеточном и тканевом уровнях. Свя- занные с УНТ контрастирующие вещества улучшают визуализацию клеток и тканей, что позволяет выяв- лять новые закономерности развития патологического процесса.

В то же время практическое применение нанотру- бок в медицине и биотехнологии тормозится из-за неясности вопроса об их токсичности на клеточном и организменном уровнях. Введение УНТ в организм экспериментальных животных в зависимости от строения и дозы наноматериала может вызывать ши- рокий спектр эффектов: от положительных до резко негативных.

Механизм воздействия углеродных нанотрубок на клетки и организм остается неизученным. В ближай-шее время ожидаются новые успехи, связанные с раз-работкой новых параметров УНТ, которые будут оп-ределять их свойства и эффекты. Перед внедрением УНТ в практическое здравоохранение необходимо предусмотреть все возможные последствия использо-вания нанотрубок.