УДК: 615.456

Возможность применения лекарственных контейнеров с основой из наноалмазного композита для проведения локальной химиотерапии. Экспериментальные данные

А.А. Курильчик[1], В.В. Южаков[1], А.Г. Коноплянников[1], Л.Н. Бандурко[1], Л.Е. Севанькаева[1], М.В. Филимонова[1], С.Б. Корчагина[2], С.К. Гордеев[2], О.И. Киселёв[3], А.Ф. Цыб[1]

[1] ФГБУ «Медицинский радиологический научный центр» Минздрава России, г. Обнинск
[2] ОАО «Центральный научно-исследовательский институт материалов», г. Санкт-Петербург
[3] ФГБУ «НИИ гриппа Минздрава России», г. Санкт-Петербург

Ключевые слова: **наноалмазный лекарственный контейнер, локальная химиотерапия опухолей, доксорубицин, саркома М-1, иммуногистохимия, PCNA**

Цель работы. **Изучить влияние доксорубицина, иммобилизованного в углеродные наноструктурные лекарственные контейнеры, на патоморфологию экспериментальной перевивной опухоли.**
Материалы и методы. **Эксперименты выполнены на крысах с привитой под кожу голени саркомой М-1. Для доставки противоопухолевого препарата в паренхиму новообразований использовали углеродные контейнеры, изготовленные на основе наноалмазного композита и предварительно инкубированные в 0,01 и 0,1% растворе доксорубицина. Методы исследования включали иммуноокрашивание гистологических срезов саркомы М-1 на PCNA.**
Результаты. **При изучении гистологических препаратов вокруг контейнеров, пропитанных 0,01% раствором доксорубицина, визуализировались узкие зоны шириной от 0,1 до 0,35 мм деструкции опухолевой ткани с отсутствием положительной реакции ядер клеток на PCNA. При увеличении концентрации доксорубицина в 10 раз зоны индуцированного повреждения саркомы М-1 были в 3–4 раза шире. В опухолевой ткани, прилегающей к зонам полной деструкции клеточных элементов, отмечался отек стромы, диссоциация опухолевых клеток, а также их гибель в фазе митоза.**
Заключение. **Имплантированные в зону роста новообразований углеродные контейнеры с доксорубицином оказывают локальное альтеративно-деструктивное действие на экспериментальную соединительнотканную опухоль. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения наноалмазных композитов для селективной доставки препаратов в опухоль.**

Введение

Большинство схем комбинированного лечения злокачественных новообразований включает цитостатики, обладающие наряду с высокой эффективностью и широким спектром противоопухолевого действия высокой системной токсичностью [1]. Считается, что для повышения эффективности химиотерапии необходимо добиться повышения концентрации и постоянного присутствия лекарственного препарата в опухоли [2, 3]. Использование локо-регионарной химиотерапии делает возможным создание высоких доз противоопухолевого препарата в очаге поражения. К перспективным подходам для контроля солидных новообразований можно отнести такие методы, как изолированная регионарная химиотерапевтическая перфузия, химиоэмболизация с применением масляных суспензий и микросфер, а также аппликационная химиотерапия с использованием биорастворимых лекарственных пленок [2–6].

Одним из направлений в терапии злокачественных новообразований является создание иммобилизованных лекарственных форм, обеспечивающих органоспецифичность и снижение общей токсичности химиотерапевтических агентов [5, 6].

В качестве лекарственного контейнера мы использовали углеродно-алмазный композит, созданный на основе наночастиц углерода и разработанный

Адрес для корреспонденции
Курильчик А.А.
E-mail: Aleksandrkurilchik@yandex.ru

совместно в ОАО «Центральный научно-исследовательский институт материалов» (г. Санкт-Петербург), ФГБУ «Санкт-Петербургский НИИ фтизиопульмонологии» Минздрава России и ФГБУ «НИИ гриппа» Минздрава России (г. Санкт-Петербург).

Наноалмазы – это трехмерно упорядоченные алмазные частицы, полученные при взрыве в замкнутом пространстве. Наноалмазные частицы имеют размеры 4–6 нм. Их удельная поверхность составляет 250–400 м^2/г.

Из наноалмазного порошка получен наноалмазный композит (НАК), в котором частицы связаны между собой тончайшим слоем углеродной неалмазной матрицы (рис. 1).

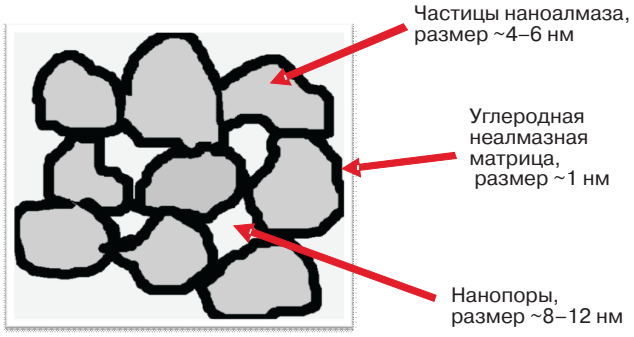


Рис. 1. Структура наноалмазного композита

Композиты углерод-наноалмаз обладают высокой пористостью, которая может быть использована для поглощения, хранения и пролонгированного выделения лекарственных препаратов. Важно, что нанопористая структура композита обеспечивает процессы физической адсорбции лекарств и их удержание в силовом поле нанопор. Проведенные нами предварительные исследования адсорбции и десорбции из водных растворов левофлоксацина показали, что композиционный материал углерод-наноалмаз может быть насыщен лекарственным

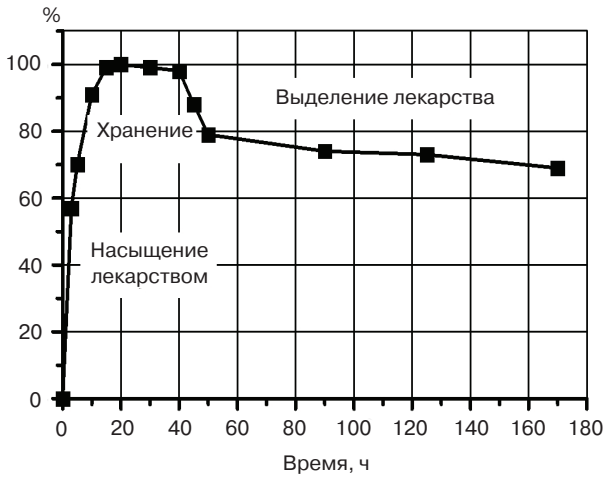
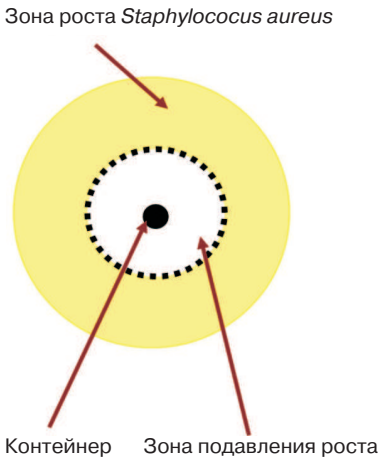


Рис. 2. Динамика изменения содержания левофлоксацина в НАК

веществом. Тем самым получены лекарственные контейнеры НАК/лекарство.

Сохранение биологической активности лекарства после выделения из контейнера было подтверждено микробиологическими тестами по подавлению роста колоний золотистого стафилококка. Так, лекарственный контейнер из композиционного материала наноалмаз-углерод, наполненный левофлоксацином, активно подавлял рост *Staphylococus aureus* (рис. 3). При этом НАК-левофлоксацин сохранял свою активность при многократном использовании без снижения способности подавлять рост бактерий. Это свидетельствует о пролонгированной десорбции левофлоксацина из контейнера в бактерицидных концентрациях.



Подавление роста *Staphylococus aureus*

Контейнер	Диаметр зоны подавления роста, мм		
	1-й этап (24 ч)	2-й этап (24 ч)	3-й этап (24 ч)
НАК-20+ L-флоксацин	17,8	17,6	17,5
Стандарт-тест	15,2	–	–

Рис. 3. Биологическая активность лекарственного контейнера на основе НАК

Цель настоящей работы – изучение влияния доксорубицина, иммобилизованного в углеродные наноструктурные лекарственные контейнеры на экспериментальную перевивную опухоль.

Материалы и методы

Эксперименты выполнены на самцах белых беспородных крыс в возрасте 3 мес с привитой по ранее описанной нами методике [7] под кожу правой голени саркомой М-1 (рис. 4).

Для направленной доставки противоопухолевого препарата в паренхиму новообразований использовали углеродные контейнеры диаметром 1 мм и длиной 3 мм (рис. 5), предварительно про-

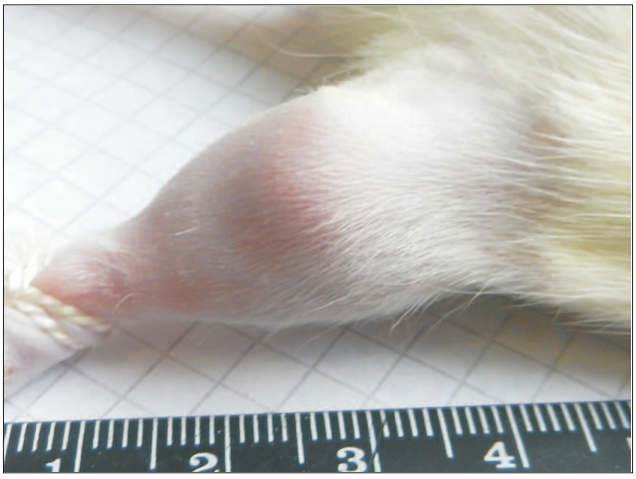


Рис. 4. Саркома М-1, привитая под кожу голени крысы

питанные в течение 3 сут в 0,01% и 0,1% растворе доксорубицина.

С помощью троакара носители доксорубицина имплантировали в периферическую зону опухолевых узлов размером 0,8–1,2 см^3.

Рис. 5. Лекарственные контейнеры

Животных-опухоленосителей выводили из опыта через 1 сут после имплантации углеродных носителей доксорубицина. Опухолевые узлы, выделенные под тиопенталовым наркозом, фиксировали 24 ч в кислой жидкости Буэна. Крыс подвергали лекарственной эвтаназии введением раствора нембутала (50 мг/кг массы тела) t с последующей декапитацией. После отмывки материала в 70% этаноле ткань опухолей вырезали в виде блоков, обезвоживали и заливали в Гистомикс с ориентацией для получения поперечных срезов контейнеров, введенных в паренхиму саркомы М-1.

Для гистологического исследования микротомные срезы опухолей толщиной 5 мкм окрашивали гематоксилином и эозином. Для иммуноокрашивания пролиферирующих клеток использовали мышиные моноклональные антитела к PCNA (*Proliferating Cell Nuclear Antigen*) в разведении 1:400 (PC10, «DAKO»), биотинилированные лошадиные антитела к мышиным IgG (BA-2000, «Vector Lab.», 1:250) и стрептавидин-пероксидазный комплекс (SA-5004, «Vector Lab.», 1:250) [8]. Растворы для иммуногистохимии готовили на фосфатно-солевом буфере (ФСБ), pH 7,4. Эндогенную пероксидазу блокировали в 3% перекиси водорода. В блокирующий буфер добавляли 2% нормальной сыворотки животных-доноров вторых антител, 1% бычьего сывороточного альбумина и 0,1% Тритона X-100. В растворе первых антител препараты инкубировали в течение ночи во влажной камере при 4 °С. После отмывки в ФСБ материал обрабатывали вторичными антителами. Для снижения уровня неспецифических реакций при выявлении антител к PCNA в раствор биотинилированных антител к мышиным Ig добавляли 2% нормальной крысиной сыворотки. Субстратный фермент (пероксидазу) проявляли диаминобензидином (Liquid DAB+, «DAKO»). Гистологические препараты изучали в микроскопе «Olympus CX41» с микрофотосъемкой на цифровую камеру INFINITY «Lumenera corp.».

Результаты

Вне зоны имплантации НАК саркома М-1 представляла опухоль из полиморфных клеток с явлениями тканевой и клеточной атипии (рис. 6 а). В участках солидного строения опухолевые клетки плотно прилегали друг к другу, тесно контактируя между собой. При микроскопическом исследовании в полях зрения видны относительно многочисленные фигуры митоза и единичные опухолевые клетки, погибающие путем апоптоза. Микроциркуляторное русло состояло из тонкостенных сосудов капиллярного и синусоидного типа. На препаратах, иммуноокрашенных на PCNA (рис. 6 б), пролиферирующие клетки располагались в периферических участках опухолей с тенденцией концентрироваться вокруг сосудов. Интенсивную реакцию на PCNA давали ядра эндотелиальных клеток. Центральные отделы опухолевых узлов представлены участками спонтанного некроза, которые занимали от 10 до 30% поверхности среза.

При изучении гистологических препаратов саркомы М-1 вокруг контейнеров, пропитанных 0,01% раствором доксорубицина, визуализировались узкие зоны шириной от 0,1 до 0,35 мм однотипных изменений паренхимы с выраженными признаками дистрофии и гибели опухолевых клеток (рис. 7 а, б). В сохранившейся опухолевой ткани, прилегающей к зонам локальной деструкции клеточных элементов, отмечался отек стромы и диссоциация опухолевых клеток, а также их гибель в фазе митоза (рис. 7 б).

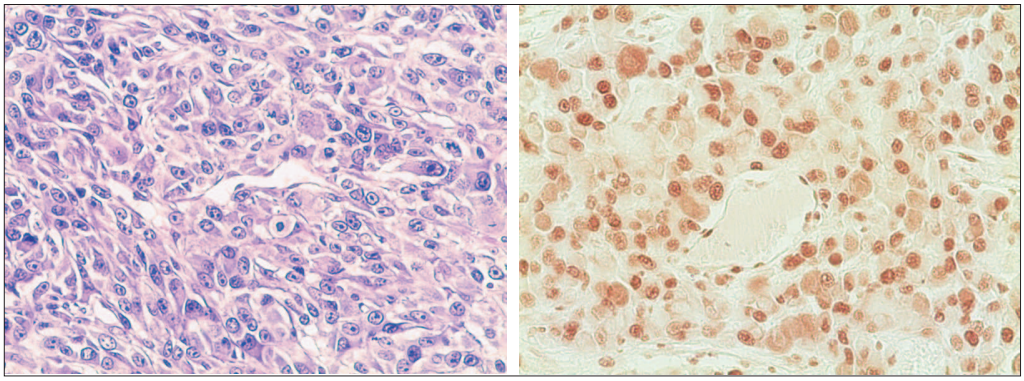


Рис. 6. Гистологическая картина саркомы М-1 вне зоны имплантации лекарственного контейнера. а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – иммуноокрашивание на PCNA. Ув. × 240

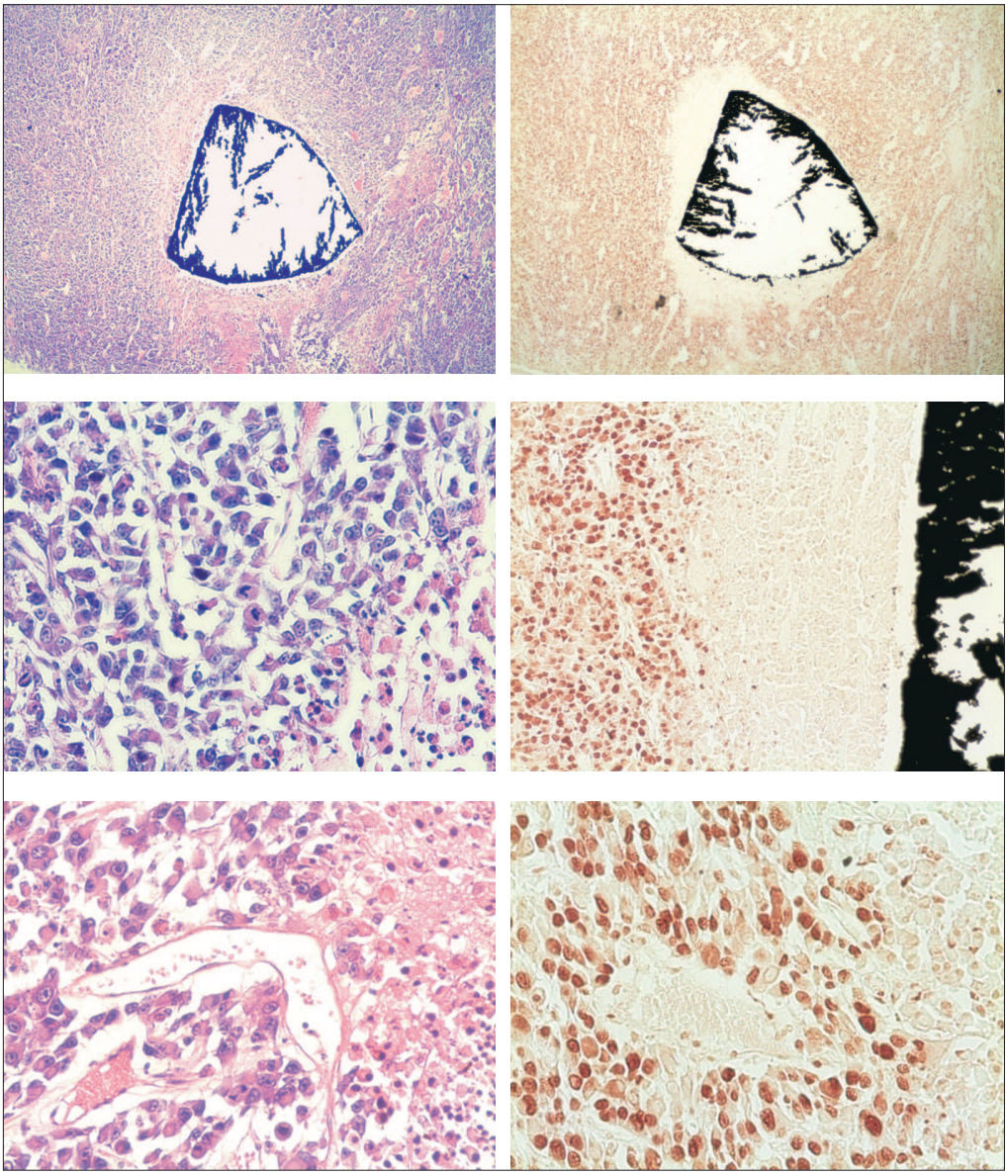


Рис. 7. Действие лекарственного контейнера, насыщенного 0,01% раствором доксорубицина (20 мкг в контейнере), на саркому М-1: а–в – окрашивание гематоксилином и эозином; г–е – иммуноокрашивание на PCNA. Ув.: а, г – ×24; б, в, е – ×240; д – ×120

На иммуноокрашенных препаратах зона альтеративно-деструктивных изменений вокруг контейнеров отчетливо контурировалась за счет практически полного отсутствия положительной реакции ядер клеток на PCNA (рис. 7 г, д). По периферии зон гибели опухолевых клеток видна деструкция стенки сосудов с десквамацией эндотелиальных клеток в их просвет (рис. 7 в), изменение формы ядер эндотелия и снижение интенсивности их окрашивания на маркер пролиферации (рис. 7 е). На основании этих наблюдений можно полагать, что токсический эффект лекарственного контейнера реализуется не только путем прямого действия доксорубицина на опухолевые клетки, но и опосредованно через сосудистое русло.

На гистологических срезах саркомы М-1 с углеродными контейнерами, заполненными 0,1% раствором доксорубицина, зоны индуцированного повреждения опухолевой паренхимы были в 3–4 раза шире. При этом поля деструктивных изменений распространялись в стороны от стенок НАК в виде тяжей разной ширины и протяженности и сливались с оксифильными участками спонтанного некроза (рис. 8).

сителей для селективной доставки препаратов в опухоль.

Учитывая, что углеродно-алмазные композиты разного размера и конфигурации могут быть легко адаптированы практически для любого препарата, в том числе и гидрофобного, а его воздействие осуществляется за счет медленной диффузии и длительной десорбции, есть основание полагать, что углеродные контейнеры можно использовать для локальной пролонгированной химиотерапии с адресной доставкой лекарственных средств непосредственно к компрометированным областям в необходимой дозировке.

ЛИТЕРАТУРА

1. Переводчикова Н.И. Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний. М., Пратическая медицина. 2011, 512 с.
2. Харатишвили Т.Л., Мартынков Д.В., Бохян Б.Ю., Феденко А.А., Николаев А.П., Алиев М.Д. Изолированная химиотерапевтическая перфузия в лечении местно-распространенных опухолей таза. Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи. 2012, № 4, с. 30-34.

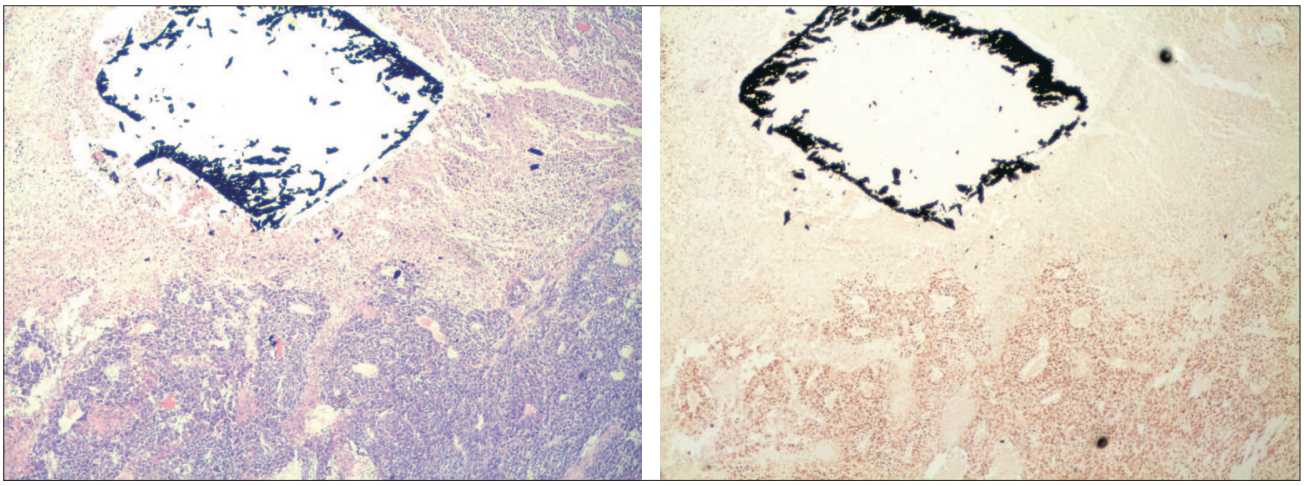


Рис. 8. Действие лекарственного контейнера, насыщенного 0,1% раствором доксорубицина (200 мкг в контейнере), на саркому М-1: а – окрашивание гематоксилином и эозином; б – иммуноокрашивание на PCNA. Ув. ×24

Заключение

Результаты выполненной работы показали, что имплантированные в зону роста новообразований углеродные контейнеры с доксорубицином оказывают локальное альтеративно-деструктивное действие на экспериментальную соединительнотканную опухоль. Эффективность цитотоксического действия лечебного композита на опухолевые клетки зависит от концентрации накопленного в носителе противоопухолевого препарата.

Полученные результаты свидетельствуют о перспективности применения углеродных но-

3. Lans T.E., Wilt J.H.W. de, van Geel A.N., Eggermant A.M.M. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for nonresectable Stewart-Treves lymphangiosarcoma. Ann. Surg. Oncol. 2002, v. 9, p. 1004-1009.
4. Лиходед В.А., Зайнуллин Ф.Ш., Ишмуратова Р.Ш. и соавт. Локальная химиотерапия – от эксперимента в клинику. Креативная хирургия и онкология. 2009, № 2, с. 37-38.
5. Зайнуллин Ф.Ш., Шикова Ю.В. Оценка противоопухолевой активности пролонгированной лекарственной формы с 5-фторурацилом на перевивных опухолях [Электронный ресурс]. Креативная онкология и хирургия. 2012, № 3 (17.07.12).

6. Карпенко Е.Н. Разработка иммобилизированных лекарственных форм доксорубицина и методик его анализа. Автореферат диссертации канд. фармацевт. наук. Курск, 2004, 22 с.
7. Южаков В.В., Хавинсон В.Х., Кветной И.М. и соавт. Кинетика роста и функциональная морфология саркомы М-1 у интактных крыс и после гамма-облучения. Вопросы онкологии. 2001, т. 47. № 3, с. 328-334.
8. Южаков В.В., Севанькаева Л.Е., Ульяненко С.Е. и соавт. Эффективность фракционированного воздействия γ-излучения и быстрых нейтронов на саркому М-1. Радиационная биология. Радиоэкология. 2013, т. 53, № 3, с. 267-279.

Статья поступила 20.02.2014 г., принята к печати 21.04.2014 г.
Рекомендована к публикации Т.К. Харатишвили

POSSIBILIES OF APPLICATION NANODIAMOND-BASED DRUG CARIERS FOR LOCAL CHEMOTHERAPY. EXPERIMENTAL DATA

Kurilchik A.A.[1], Yuzhakov V.V.[1], Konoplyannikov A.G.[1], Bandurko L.N.[1], Sevankaeva L.E.[1], Filimonova M.V.[1], Korchagina S.B.[2], Gordeev S.K.[2], Kiselev O.I.[3], Tsyb A.F.[1]

[1] Federal State Budget Institution «Medical Radiological Research Center» of the Russian Ministry of Health, Obninsk
[2] Central Research Institute of Materials, Open Joint-Stock Company, St. Petersburg
[3] Federal State Budget Institution «Research Institute of Influenza» of the Russian Ministry of Health, St. Petersburg

Key words: **nanodiamond drug carier, local chemotherapy of tumors, doxorubicin, sarcoma M-1, immunohistochemistry, PCNA**

Purpose. **To study the effect of doxorubicin immobilized onto carbon nanostructured drug reservoirs on pathological morphology of experimental transplanted tumors.**
Materials and methods. **Experiments were performed on rats inoculated subcutaneously with sarcoma M-1 in the leg area. For anticancer drug delivery to the parenchyma of neoplasms we applied carbon reservoirs that had been fabricated on the basis of the nanodiamond composite and incubated in 0,01% and 0,1% doxorubicin solution. Immunohistochemical staining of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) was performed in histological sections of sarcoma M-1.**
Results. **Histological examination revealed that around the drug reservoirs impregnated with 0,01% doxorubicin solution, there were narrow zones (0,1–0,35 mm wide) of tumor tissue destruction without the PCNA-positive reaction of cell nuclei. When the doxorubicin concentration increased by 10 times, the zones of the induced damage of M1 sarcoma appeared to be 3–4 times wider. In the tumor tissue adjoining to the areas of total destruction of cellular elements, a stromal edema, dissociation of tumor cells and their death in the mitotic phase were noted.**
Conclusion. **Doxorubicin-loaded carbon reservoirs implanted into the site of tumor growth produce a local alterative-and-destructive effect on experimental connective tissue tumors. The obtained results suggest that nanodiamond composites are promising for a selective delivery of chemotherapeutic agents to tumors.**