

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ БИОНАНОАЭРОЗОЛЕЙ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ И ДИАГНОСТИКИ ЛЕГОЧНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Морозов В.Н.

Институт Теоретической и Экспериментальной биофизики РАН
Ул. Институтская, 3, г. Пущино, 142290 РФ; e-mail: tammorozova@rambler.ru

Поступила в редакцию: 16.06.2018

Аннотация. Представлено новое направление биотехнологии, основанное на использовании наноаэрозолей для лечения и диагностики легочных заболеваний. В обзоре описаны методы генерации бионаноаэрозолей (БНА), которые сохраняют структуру и биологическую активность молекул. Разработанный автором метод генерации использует электрогидродинамическое распыление растворов лекарств с последующей нейтрализацией заряженных нанокластеров в газовой фазе. Он позволяет превращать в БНА практически любое вещество, растворимое в воде или в спирте (включая пептиды, белки, ДНК) без изменения его функциональных свойств. Представлены методы дозиметрии наноаэрозольных лекарств, приведены примеры использования БНА антибиотиков и других лекарств для лечения инфекционных и системных заболеваний лабораторных животных. Описаны особенности лекарственных БНА, их преимущества по сравнению с другими способами введения лекарства и возможные побочные эффекты. Показано, что наноаэрозольные частицы, образующиеся в выдыхаемом воздухе при высыхании микрокапель легочной жидкости, могут быть использованы для неинвазивной диагностики легочных заболеваний. Разработаны специальные фильтры и одноразовые приспособления для сбора таких микрокапель из выдыхаемого воздуха. Продемонстрирована принципиальная возможность неинвазивной диагностики туберкулеза легких по выдыхаемым антителам, специфичным к секретируемым антигенам микобактерии. Аналогичные устройства, успешно примененные для анализа нозокомиальных инфекций в клинике, можно использовать для обеспечения безопасности на транспорте, в промышленных и жилых помещениях.

Ключевые слова: бионаноаэрозоли, генератор, лечение бионаноаэрозолями, выдыхаемый воздух, неинвазивная диагностика.

ВВЕДЕНИЕ

В данном сообщении представлена новая область исследований в биотехнологии, связанная с изучением и использованием наноаэрозолей биологических и биологически-активных веществ в терапевтических целях и для диагностики легочных заболеваний. Термином «наноаэрозоли» мы будем далее обозначать взвешенные в воздухе частицы с размерами от нескольких нанометров до 200-300 нм. Наноаэрозольные частицы такого размера, состоящие из органического материала, мы будем далее называть бионаноаэрозолями (БНА). БНА поступают в атмосферу в ряде природных процессов. Например, большое количество БНА образуется над лесными массивами при фотоокислении летучих органических веществ, выделяемых растениями [1]. Конденсация водяных паров на таких наночастицах в значительной степени определяет осадки и климат и влияет на здоровье населения [2]. БНА могут нести токсины или патогены. Так, наноаэрозоли, содержащие вирусные частицы, могут попадать в воздушную среду при смыве туалета [3].

БНА представляют собой сравнительно новую область исследования, направленную на изучение токсичности вдыхаемых наноаэрозолей, на создание новых лекарственных форм и новых способов введения лекарственных веществ в организм, на разработку новых методов бесконтактной неинвазивной диагностики легочных заболеваний, основанных на сборе и анализе микрокапель и наночастиц в выдыхаемом воздухе. Эта область исследования возникла как результат разработки технических средств для генерации БНА, методов дозиметрии и определения регионального осаждения БНА. При вдыхании БНА он проникает в альвеолярные структуры легкого, где непосредственно вступает в контакт с клеточными мембранами легочного эпителия и альвеолярных макрофагов. Поэтому, для понимания биологических эффектов БНА требуется фундаментальное исследование взаимодействия БНА с поверхностью клетки в зависимости от состава наночастиц, их формы и заряда поверхности. Также как при других способах доставки можно существенно увеличить эффективность лекарства в БНА, упаковав его в специальные наноконтейнеры, которые защитят лекарство от разрушения, обеспечат длительное его выделение в легочную жидкость или доставку в специальные клетки (в макрофаги или в клетки опухоли). Таким образом, разработка наноаэрозольных лекарств предполагает решение целого ряда технологических проблем.

Природные наноаэрозоли, в частности БНА, образующиеся при высыхании микрокапель легочной жидкости в выдыхаемом воздухе, также представляют большой практический интерес, так как их анализ позволит получать сведения о биохимических процессах в глубине легкого. С учетом неинвазивного характера сбора проб такой метод обещает стать хорошим подспорьем рентгеновским методам в скрининге легочных заболеваний и в мониторинге их лечения.

Наноаэрозольные лекарства. В первой части обзора мы кратко рассмотрим современное состояние проблемы наноаэрозольных лекарств: методов генерации БНА лекарственных веществ, способов измерения дозы лекарства, полученного при вдыхании БНА, и особенности терапевтического действия наноаэрозольных лекарств, отличающие их от аэрозолей микронного размера, генерируемых стандартными небулайзерами и ингаляторами. Мы также кратко обсудим наиболее интересные опубликованные данные по терапии лекарственными БНА.

Методы генерации бионаноаэрозолей. Одной из проблем в исследовании биологических эффектов БНА являлось отсутствие надежных коммерческих приборов для их генерации. Из известных методов генерации наноаэрозолей, таких как горение, дуговой и искровой разряды, лазерная абляция, конденсация паров и высушивание микрокапель раствора (см. отличный обзор методов [4]), только два последних могут быть применены для генерации БНА. Так, сравнительно простые органические молекулы можно испарять или сублимировать при нагревании в атмосфере инертного газа (чтобы избежать окисления при высоких температурах), как схематически показано на рис. 1А. При охлаждении пара образуются частицы наноаэрозоля, размер которых определяется концентрацией пара и скоростью его охлаждения [5]. Данный принцип реализован в серии конденсационных генераторов БНА, два из которых изображены на рисунке 1В. Конденсационные генераторы отличаются простотой конструкции, дешевизной и возможностью миниатюризации [6]. Однако их применимость ограничена, только органические соединения небольшой молекулярной массы, способные испаряться при нагревании без разрушения, можно превратить в БНА. БНА сложных лекарств с большой молекулярной массой, таких как пептиды, белки, нуклеиновые кислоты, полисахариды и липиды (не говоря о лекарствах, запечатанных в наноконтейнеры) получить таким методом невозможно.

БНА сложных биологически активных веществ можно получить, распыляя раствор с помощью небулайзера и высушивая образовавшиеся микрокапли. Однако, значительные повторяющиеся сдвиговые нагрузки в компрессорном и в ультразвуковом небулайзерах приводят к повреждению биомолекул, например, к разрыву молекул ДНК [7]. В этом смысле наиболее щадящим является мембранный распылитель [8]. Все небулайзеры имеют еще один недостаток при их использовании для генерации БНА. Для того, чтобы превратить 5-микронную каплю раствора в наночастицу с диаметром 50 нм потребуется, чтобы объемная доля сухого вещества в растворе составляла 1 мкг/мл. Для полного высыхания таких микрокапель при относительной влажности 20% на 1 мкг сухой массы БНА потребуется не менее 200 литров сухого воздуха, т.е., максимальная массовая концентрация БНА составит всего 5 мкг/м³. При средней скорости вдыхания 8 л/мин за один час человек получит около 1 мкг лекарства (учтено, что только половина таких БНА осядет в легких [10]). Чтобы увеличить скорость поступления лекарства дозу требуется увеличить концентрацию распыляемого раствора и разбить его на значительно более мелкие микрокапли, чем это позволяют небулайзер. Такую возможность дает технология электрораспыления.

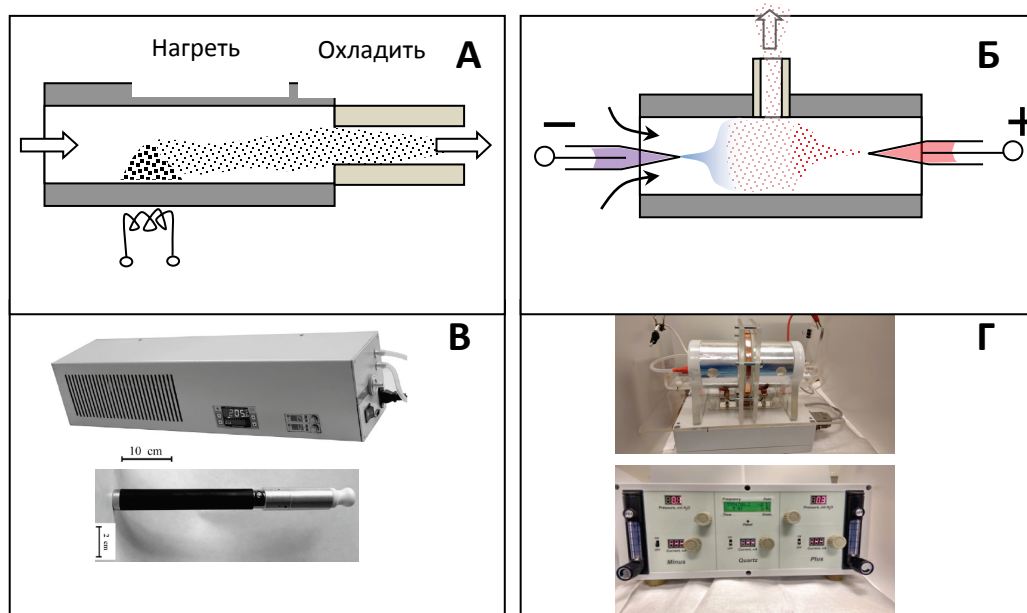


Рисунок 1. Схематическое изображение двух основных методов генерации БНА и изображения реальных генераторов БНА. А. Схема конденсационного генератора, в котором органическое вещество сублимируется при повышенной температуре, а затем охлаждается с образованием наноаэрозольных частиц. Б. Схематическое изображение генерации БНА методом электрораспыления с нейтрализацией продуктов электрораспыления противоположными ионами в газовой фазе. В. Реальные конструкции конденсационного наногенератора [6]. Г. Конструкция генератора БНА, основанного на электрораспылении растворов лекарств [9]

В методе электрогидродинамического распыления диспергирование раствора идет не за счет механического воздействия на раствор, как в небулайзерах, а вследствие действия электрических зарядов, разрывающих заряженные микрокапли на нанокაпли [11]. Технически процесс электрораспыления происходит при приложении высокого напряжения к раствору, помещенному в тонкий капилляр. Высокая напряженность электрического поля на конце капилляра приводит к инъекции струи микрокапель микронного размера, как в небулайзере, но сильно заряженных. По мере испарения растворителя, заряженные микрокапли достигают предела Рэлея, после чего испытывают дополнительные распады, в каждом из которых испускается серия дочерних нанокაпель с размерами, примерно на порядок меньшими, чем материнская капля. В результате таких распадов каждая капля микронных размеров превращается в сотни нанокაпель, которые высыхают и превращаются в сильно заряженные нанокластеры сухих остатков вещества. Так как размер нанокაпель при электрораспылении примерно на порядок меньше размера микрокапель, получаемых в небулайзере, для получения БНА с диаметром 50 нм можно распылять раствор с объемной долей сухого вещества 1 мг/мл, что позволит в 1000 раз увеличить концентрацию БНА и скорость поступления вещества БНА в организм по сравнению с небулайзером в примере, представленном выше.

Получаемые в процессе электрораспыления нанокластеры сильно заряжены. Облако таких наночастиц быстро расширяется за счет пространственного заряда и наночастицы осаждаются на стенках генератора, в трубках и в носоглотке. В следствие этого сильно заряженный наноаэрозоль не может проникнуть в бронхи и альвеолы. Было предложено несколько способов нейтрализовать избыточные заряды на нанокластерах: пропускать их через разреженную плазму, создаваемую радиоактивными изотопами [12] или через облако ионных продуктов коронного тлеющего разряда [13]. Однако, в этих методах возможно повреждение биомолекул ионами и радикалами. Чтобы избежать этих повреждений автором было предложено использовать электрораспыление для генерации противоионов [14,15]. В конструкции на рисунке 1Б схематически показано, как облако нанокластеров, полученное при распылении раствора лекарства из положительно заряженного капилляра, нейтрализуется облаком отрицательно заряженных противоионов, получаемых, например, при распылении спиртового водного раствора из отрицательно заряженного капилляра. На рисунке 1В представлен протип такого прибора для генерации БНА в опытах с животными. Детали конструкции прибора, его основные технические характеристики, а также примеры генерации БНА из белков и других веществ представлены в серии работ автора с сотр. [14,15]. Было показано, что практически любое вещество, растворимое в воде или в этаноле, может быть превращено в БНА с эффективностью до 40%, с полным сохранением структуры и функциональных свойств молекул (антибиотиков, пептидов, белков, ДНК) и их сложных комплексов (нанолипосом, заполненных антибиотиком [16]). Генератор создает БНА с размерами 20-300 нм в концентрации до 10^{13} м⁻³, и с выходом аэрозоля до 20 л/мин. При этом генератор может работать до 6 часов непрерывно. Отличительной чертой генератора является сохранение нескольких элементарных зарядов на БНА, что приводит примерно к двукратному увеличению вероятности осаждения БНА в легких по сравнению с нейтральными частицами такого же размера [17]. Преимуществом генератора по сравнению с небулайзерами является его значительно более высокая экономичность. Так, введение одинаковой дозы антибиотика в легкие мыши с помощью данного генератора потребовало в 20 раз меньшего количества антибиотика по сравнению с компрессорным небулайзером [16].

Измерение дозы наноаэрозольного лекарства, осажденного в легких. Дозиметрия БНА представляет определенные сложности как в измерении, так и в интерпретации. Во-первых, прямые методы ее измерения, основанные на использовании конденсационных счетчиков, сложнее и дороже лазерных счетчиков микронных аэрозольных частиц. Во-вторых, пока не ясно, в каких терминах описывать дозу БНА: как массовую, в мг вещества на кг массы тела, или как число частиц, отнесенное на площадь поверхности легкого. В первом случае предполагается, что лекарство поступает в кровоток, разбавляется там и распределяется по всем тканям. Во втором учитывается локальное действие в легком: терапевтическое, раздражающее, токсичное. По-видимому, тип дозы нужно будет подбирать для каждого лекарства в БНА форме, учитывая механизм его действия.

Технически дозиметрию БНА в опытах с животными осуществляют двумя способами. В наиболее распространенном способе БНА собирают после пропускания через клетку или устройство для носового дыхания в течении всего опыта, а затем смывают, измеряют в смыве количество лекарства и рассчитывают концентрацию БНА в воздухе. Далее, по известным данным об объеме воздуха, потребляемом животным, и о вероятности осаждения частиц данного размера в легких рассчитывают массовую дозу [18]. В более сложном методе используют размеры частиц и их концентрации, измеренные специальными конденсационными спектрометрами [15,19]. Этот метод позволяет вычислить не только общую массу лекарства, доставленного в легкие, но и определить локальную дозу, т.е., число частиц и массу лекарства, попавшего в разные отделы легкого.

Применение бионаноаэрозолей в терапии легочных и системных заболеваний. В настоящее время исследования в области наноаэрозольной терапии только начинаются. Известны немногочисленные публикации, описывающие эксперименты на животных моделях [6, 17, 19, 20-23]. Исследования в этой области сдерживаются отсутствием коммерчески доступных приборов для генерации и дозиметрии наноаэрозольных лекарств. Поэтому работа, как правило, делается на приборах, изготовленных самостоятельно.

Группа исследователей из Сибирского Отделения РАН изучила терапевтический эффект вдыхания БНА противовоспалительных и обезболивающих соединений (индометацина и ибупрофена) мышами. БНА создавали с помощью разработанного ими генератора конденсационного типа (рис. 1А, В) и показала, что

терапевтический эффект БНА данных веществ, а также диклофенака и бугадиона отмечается при массовой дозе (в мг/кг) в десятки и сотни тысяч меньших, чем при пероральном введении [19, 20]. Гипотензивное действие БНА нисолдипина на артериальное давление у крыс отмечалось при массовой дозе в сто раз меньшей пероральной [6]. В наших исследованиях эффективности наноаэрозолей левофлоксацина при лечении легочной формы туляремии также было обнаружено примерно стократное уменьшение массовой эффективной дозы антибиотика по сравнению с дозой при пероральном введении [16].

Был выявлен ряд интересных особенностей наноаэрозольных лекарств. Во-первых, отмеченное выше уменьшение рабочей дозы БНА на несколько порядков по сравнению с пероральной было обнаружено только для противовоспалительных и болеутоляющих веществ, что может свидетельствовать о действии особых механизмов, возможно, не зависящих от концентрации препарата в крови. Мы уже высказывали гипотезу [9], что противовоспалительное действие таких БНА в сверхмалых дозах может быть объяснено раздражением рецепторов блуждающего нерва, многочисленных в легких [24], которое по механизму холинэргического противовоспалительного рефлекса [25] приводит к системному подавлению воспалительной реакции в результате выброса противовоспалительных интермедиатов (адреналина и норадренолина) во всех тканях.

Интересно отметить еще одну особенность, отмеченную в работе [20]: при вдыхании БНА ибупрофена проницаемость легких для проникновения лекарства в кровь, постепенно уменьшалась в течение 1,5 часов, достигая $\sim 1/1000$ от исходной, причем, восстановление проницаемости после окончания вдыхания занимало несколько часов. В настоящее время, это явление не имеет объяснения, но указывает на необходимость исследования таких необычных эффектов БНА.

В наших исследованиях было показано [16], что действие БНА левофлоксацина существенно зависит от того в какой форме этот антибиотик вводится в организм мыши. В то время как БНА чистого левофлоксацина только слегка отдала гибель мышей, инфицированных легочной туляремией, та же массовая доза того же антибиотика, заключенного в нанолипосомы, 170 нм диаметром, приводила к практически полному выздоровлению мышей. Такой эффект упаковки лекарства в нанолипосомы можно объяснить способностью альвеолярных макрофагов фагоцитировать нанолипосомы. Так как туляремийный паразит (*Francisella tularensis*) развивается в макрофагах, такое фагоцитирование приводит к значительно большей концентрации антибиотика в этих клетках и к большему подавлению патогена по сравнению с БНА чистого антибиотика, растворенного во всем объеме легочной жидкости.

Еще один пример необычного действия наноаэрозольных лекарств представляет исследование влияния вдыхания БНА блеомицина, антибиотика используемого при лечении ряда форм рака [26]. Его широкому применению препятствует наличие частого побочного эффекта – развития фиброза легких после введения лекарства перорально или любым другим путем [27]. Указанная особенность блеомицина используется для создания экспериментальной животной модели фиброза [28]. Мы ожидали, что фиброз у мышей развивается быстрее и в более яркой форме при вдыхании наноаэрозоля блеомицина. Оказалось, однако, что длительное вдыхание БНА блеомицина в массовой дозе, достаточной для развития фиброза при однократном ингаляционном введении, не вызывало никаких признаков фиброза, только макрофагию и другие обратимые признаки воспаления [21]. Этот и другие примеры хорошо иллюстрируют трудности в прогнозировании эффектов наноаэрозольных лекарств, исходя из известного действия этих лекарств при других способах введения в организм.

Особенности и преимущества наноаэрозольных лекарств. Говоря об особенностях наноаэрозольных лекарств следует отметить как общие, свойственные всем ингаляционным лекарствам, так и специальные, присущие только наноаэрозолям. Во-первых, введение лекарства в легкие в виде БНА или аэрозоля микронных размеров предотвращает разрушение лекарства в ЖКТ и в печени при первом прохождении. Ферментов, способных разрушить лекарство в легочной жидкости значительно меньше, чем в ЖКТ [29]. Первое существенное различие между ингаляционными аэрозолями микронного размера и наноаэрозолями состоит в осаждении в разных структурах легкого. Если первые частицы оседают в верхних дыхательных путях, то наноаэрозольные частицы проникают глубоко в легкие, в альвеолярные структуры. Для ряда лекарств такое различие в осаждении будет существенно определять «время жизни»: частицы слабо растворимого лекарства будут выноситься из бронхов и трахеи мукоциллиарным аппаратом, в то время как наночастицы из того же лекарства, осевшие в альвеолах, будут существовать дольше и удаляться после фагоцитирования макрофагами.

Еще одним качественным различием между микро- и наноаэрозолями является соотношение между числом частиц лекарства и числом клеток. Так, при средней плотности вещества 1.5 г/см^3 , диспергирование 1 мг лекарства приведет к образованию $\sim 10^8$ частиц с диаметром 5 микрон и $\sim 10^{13}$ частиц с диаметром 100 нм, соответственно. С учетом того, что легкие человека состоят из $\sim 2 \times 10^{10}$ эпителиальных клеток 1-го типа [30], при вдыхании такого аэрозоля только одна частица упадет на каждую двухсотую эпителиальную клетку. В случае наноаэрозоля на каждую клетку эпителия упадет 500 наночастиц лекарства. Этот чисто иллюстративный пример показывает качественное различие между аэрозольными лекарствами микронного и наноразмеров: наноаэрозоль будет равномерно нанесен на все клетки, в то время как микроаэрозольные частицы «достанутся» очень небольшой фракции клеток. Кроме того, большая часть наноаэрозоля осядет в альвеолах, которые мало доступны для микронных частиц.

Наноаэрозольные лекарства вводятся в организм сравнительно медленно. Эта особенность обусловлена физическим ограничением на концентрацию частиц. С ростом концентрации начинается быстрая агрегация частиц. Например, если наноаэрозоль вдыхается в течение 10 секунд после генерации, его концентрация не

может превышать 10^8 частиц/см³ [15]. Легко оценить, что для частиц с диаметром 30 и 100 нм при средней скорости потребления воздуха 8 л/мин лекарство будет вводиться со скоростью 0.9 мг и 14 мг в час, соответственно [15]. Разумеется, это создаст некоторые неудобства для приема такой лекарственной формы. С другой стороны, в ряде случаев такое медленное введение лекарства будет иметь преимущества, обеспечивая поддержание высокого уровня лекарства в легких, наподобии капельного внутривенному введению. В отличие от последнего наноаэрозоль можно вводить неинвазивно без соблюдения специальных стерильных условий.

Другие перспективные применения наноаэрозольных лекарств. В настоящее время интенсивно разрабатываются многочисленные подходы к лечению заболеваний, основанные на использовании наночастиц (см. обзоры [31, 32]). Одним из перспективных направлений является доставка лекарства в мозг, основанная на способности наночастиц проникать при определенных условиях через гематоэнцефалический барьер [33]. Было показано, что наноаэрозольные частицы могут проникать в мозг, будучи нанесены на обонятельный эпителий животного [34]. Совершенно очевидно, что наноаэрозоли могут быть использованы для такого нанесения. Более того, придание наноаэрозольным частицам заряда позволит направленно осаждать такие частицы на обонятельный эпителий, предотвращая потерю лекарства за счет осаждения в носовой полости и в легких. Такого сорта устройства описаны в литературе [35]. Возможно использование подобных устройств в комбинации с эндоскопом для локальной обработки отдельных участков пищевода, желудка и других внутренних органов. Однако применение таких технологий потребует более углубленного изучения взаимодействия наночастиц с клетками.

Локальные эффекты наноаэрозольных частиц. Выше при обсуждении известных применений наноаэрозольных лекарств были представлены некоторые их «странные» эффекты: терапевтическое действие чрезвычайно малых концентраций противовоспалительных лекарств [19, 20], отсутствие фиброза при введении БНА блеомицина [21]. При объяснении таких эффектов следует учитывать качественное отличие микро- и наноаэрозолей. Как отмечалось выше, уменьшение размера частицы в 10 раз при той же массовой дозе увеличивает общее число частиц в 1000 раз, так что на каждую клетку легкого падает множество частиц. При толщине слоя легочной жидкости в альвеолах, оцениваемой как 50-80 нм [36], падение частицы с размером 100 нм приведет к прямому контакту с клеточной стенкой самой частицы или концентрированного раствора лекарственного вещества, из которого частица состоит. Никто и никогда не исследовал, как насыщенные растворы антибиотиков или других лекарств влияют на клеточную мембрану животной клетки. Концентрированный раствор вещества может вызвать раздражение клетки, изменив проницаемость клеточной мембраны, или вызвать гибель клетки. Мы называем такое воздействие «локальным эффектом» БНА. В настоящее время мало что известно о таких локальных эффектах и разработка методов лечения, основанных на БНА требует детального их изучения.

Бионаэрозоли в диагностике. В этой части показано, как БНА природного происхождения могут быть использованы в диагностике. Человек и животное производит очень большое число аэрозольных частиц. Так, в спокойном состоянии с человека падает до $5 \cdot 10^6$ частиц в течении часа, а при движении – до $5 \cdot 10^7$ частиц с общей массой до 5 мкг [37]. Это частицы кожи, волосяного покрова, высохшие остатки микрокапель слюны, образованных при разговоре и при кашле. Такая «человеческая пыль» может быть использована в диагностике. Мы показали, что, собирая на фильтре аэрозольные частицы в воздухе палат туберкулезной клиники и анализируя собранный материал на присутствие ДНК маркеров микобактерии, можно обнаружить биомаркеры патогена даже в том случае, когда всего 2-3 бактерии в среднем находятся в кубометре воздуха [38]. Таким же образом можно решать другие проблемы биобезопасности, обнаруживая аэрозольные патогены в воздухе клиник, в публичных зданиях и на транспорте.

Особый интерес для диагностики имеют наночастицы, возникающие при высыхании микрокапель легочной жидкости (МЛЖ). МЛЖ выносятся потоком выдыхаемого воздуха из бронхиол и альвеолярных структур. Их сбор позволяет неинвазивно получать пробы легочной жидкости из глубоких отделов легкого. Стандартным способом получения образцов легочной жидкости является «бронхоальвеолярный лаваж», при котором под местным наркозом в устье сегментарного бронха вводится эндоскоп и производится смыв легочной жидкости физиологическим раствором. Такая процедура является травмирующей, непригодной для мониторинга лечения легочных заболеваний и для скрининга заболеваний у больших групп населения. Кроме того, смыв происходит из верхних отделов легкого, не затрагивая альвеолярных структур. Возможность получить микроколичества легочной жидкости неинвазивно, просто собирая МЛЖ в выдыхаемом воздухе привлекает внимание исследователей уже давно, и мы далее рассмотрим различные методы сбора таких микрокапель и их сухих остатков для диагностики легочных заболеваний.

Механизмы генерации микрокапель в выдыхаемом воздухе. Хотя в настоящее время предложено несколько альтернативных механизмов образования МЛЖ [39-41], ряд хорошо установленных фактов, таких как увеличение концентрации микрокапель с увеличением объема и скорости вдоха [39], указывают на разрыв пленки легочной жидкости как на основной механизм их образования. Такой разрыв происходит при открывании альвеолярных мешков [42] или при выдувании жидких пробок из бронхов и бронхиол. Следует иметь в виду, что МЛЖ из разных отделов легкого могут отличаться как по размерам, так и по составу биомаркеров. Холмгрен с сотр. [43] показали, измеряя распределение размеров выдыхаемых микрокапель как функцию глубины дыхания, что концентрация небольших капель (менее 100 нм) не зависит от глубины дыхания, в то время как микрокапли с размером более 500 нм показывали 100-кратное увеличение концентрации с увеличением глубины дыхания. Естественно, МЛЖ, образовавшиеся в разных отделах легкого,

будут отличаться и по составу липидов, белков и других биомаркеров. Следует также иметь в виду, что количество выдыхаемой с микрокаплями легочной жидкости сильно варьирует у разных людей, и даже у одного человека в течении дня, а также меняется при вдыхании воздуха с аэрозолем соли [44], в зависимости от глубины дыхания и под влиянием других факторов.

Методы сбора нелетучих биомаркеров в выдыхаемом воздухе. Далее мы ограничимся только сбором и анализом нелетучих биомаркеров. Летучие маркеры также представляют большой интерес для диагностики легочных заболеваний, однако, выходят за рамки тематики данной статьи. В составе выдыхаемого воздуха они находятся в виде молекул, их сбор и детекция существенно отличаются от таковых для БНА. Известны четыре основных метода сбора нелетучих биомаркеров в выдыхаемом воздухе.

Метод, основанный на сборе конденсата выдыхаемого воздуха, относится к самым распространенным, ввиду его простоты. Описаны многочисленные самодельные и ряд коммерческих приборов [45]. В этом методе МЛЖ сильно укрупняются за счет конденсации на них воды при охлаждении выдыхаемого влажного воздуха и оседают на охлажденную поверхность. За 10 минут собирают около 1-2 мЛ конденсата, в котором легочная жидкость разведена примерно в 20 тысяч раз [46]. Такое сильное разведение делает недоступным определение биомаркеров в конденсате стандартными методами. Поэтому пробы часто концентрируют, объединяя пробы, собранные у нескольких добровольцев [47].

Чтобы избежать сильного разведения легочной жидкости в пробах, МЛЖ можно собрать на фильтрах [48-50]. Это простой и дешевый способ. Имеются коммерческие приборы для такого сбора [51], однако рекомендуемые объемы смыва (7 мЛ) не дают никаких преимуществ таким устройствам по сравнению с устройствами для сбора конденсата. Автором этой статьи с коллегами удалось разработать специальные аналитические нанофильтры, которые позволяют экстрагировать собранный материал в минимальном объеме (0.01-0.1 мЛ) жидкости [38, 50, 52], а в ряде случаев полностью исключить проблему смыва собранных биомаркеров, изготовив нанофильтр из материала, который после сбора растворяется в 5-20 мкЛ водного раствора, полностью освобождая все биомаркеры [52]. Последние фильтры были успешно использованы для выявления аэрозольных ДНК маркеров микобактерии в палатах туберкулезной клиники [38].

Технология изготовления наших нанофильтров основана на электропрядении полимерных растворов, как в случае изготовления фильтров Петрянова [53]. Однако, в отличие от технологии Петрянова, пленка из нановолокон формируется не на проводящей поверхности, а на отверстии в непроводящем экране, где нановолокна нейтрализуются облаком противоионов [54]. Такие пленки полностью свободны от дефектов (прогаров), обладают практически калиброванными порами (отверстиями между волокнами) и по качеству (задерживающая способность, отнесенная к сопротивлению потоку воздуха) превосходят все коммерческие и опубликованные фильтрующие материалы такого типа [50]. Для аналитического применения очень важно отметить, что фильтры, задерживающие 99 % частиц диаметром более 200 нм, сделаны из очень небольшого количества полимера (примерно 10 мг/м²). Это позволяет экстрагировать такой материал малым объемом жидкости, в результате чего получается концентрированная проба для анализа. Далее мы приведем пример использования таких фильтров в устройствах для сбора биомаркеров туберкулеза в выдыхаемом воздухе.

Микрокапли можно также собирать импактором. При сборе в импакторе микрокапли разгоняются до высоких скоростей (100-300 м/сек) в струе воздуха, направленной на подложку [55]. При резком повороте направления потока микрокапли не успевают за потоком воздуха и по инерции продолжают движение до столкновения с поверхностью. Такой метод был использован в ряде исследований, выдыхаемых микрокапель [56, 57]. К недостаткам метода следует отнести его техническую сложность, связанную с использованием мощного насоса и ограничение на минимальный размер собираемых микрокапель, который обычно не превышает 300 нм. К достоинствам метода относится большая скорость сбора и возможность сохранения на поверхности отдельных капель для анализа биомаркеров в каждой капле.

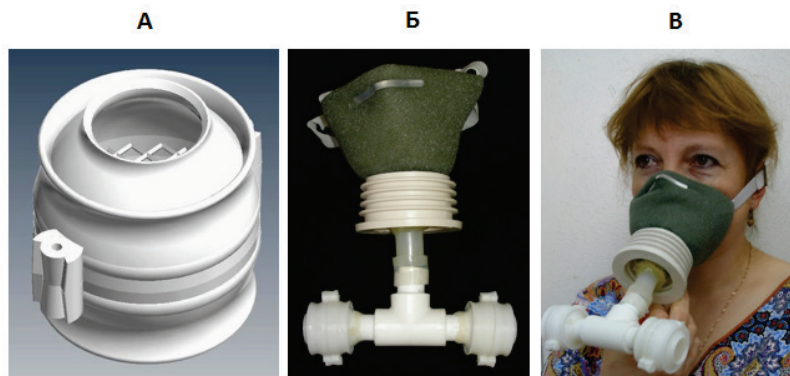


Рисунок 2. Одноразовое устройство, использованное для сбора биомаркеров туберкулеза легких в выдыхаемом воздухе. А. Конструкция держателя нанофильтра, изготовленная на 3-мерном принтере. Б. Общий вид устройства, собранного на основе коммерческого респиратора УК-2 и двух держателей нанофильтров. В. Фото добровольца, собирающего выдыхаемый воздух[50]

Электростатический преципитатор был разработан для визуализации наноаэрозольных частиц методом электронной микроскопии [58] и для исследования сухих остатком микрокапель методом атомно-силовой микроскопии [59]. В этом методе микрокапли или сухие их остатки заряжаются продуктами тлеющего коронного разряда и после зарядки осаждаются в электрическом поле на подходящую проводящую подложку. Преимуществом преципитатора по сравнению с импактором является отсутствие нижнего предела для размеров собираемых частиц. В то же время, преципитатор имеет два существенных недостатка. Во-первых, сбор осуществляется при малых скоростях потока воздуха (около 0.1 л/мин [59]). Во-вторых, при контакте микрокапель и БНА с радикалами и другими химически активными продуктами коронного разряда возможна фрагментация и химическая модификация биомолекул. Однако, несмотря на эти недостатки такой метод сбора хорошо дополняет возможности импактора. В частности, он позволил нам установить связь между количеством липидов в микрокаплях и их размерами. Было показано, что независимо от размеров, все капли в выдыхаемом воздухе покрыты слоем липида примерно одинаковой толщины [59].

В то время как в образцах, полученных методом конденсации и фильтрованием, все микрокапли объединяются в одну жидкую пробу, импактор и преципитатор позволяют собирать отдельные микрокапли и сухие остатки на поверхности в том месте, где они коснулись поверхности. Это открывает интересную возможность анализа биомаркеров в каждой отдельной микрокапле [60]. Учитывая, что микрокапли возникают в разных отделах легкого, следует ожидать, что состав легочной жидкости в них будет варьировать и по наличию определенных маркеров можно будет установить в каком отделе легкого микрокапля возникла. Например, по наличию муцина можно выделить микрокапли, образовавшиеся в бронхах и бронхиолах. Можно также ожидать, что микрокапли из зоны инфекции будут нести большее количество биомаркеров инфекции и определение биомаркеров в таких «горячих» микрокаплях позволит диагностировать инфекцию с большей надежностью, чем в сильно разбавленных пробах, полученных методом конденсации и на фильтрах. Однако, определение биомаркеров в отдельных микрокаплях требует решения ряда технологических задач, таких как подготовка специальных поверхностей, способных ковалентно связывать белки, разработка методов детекции единичных белковых маркеров (например, с помощью магнитных частиц или квантовых точек).

Бесконтактная диагностика туберкулеза легких по выдыхаемому воздуху. Разработанные нами фильтры [61] были использованы в одноразовых устройствах для сбора биомаркеров из воздуха, выдыхаемого пациентами туберкулезной клиники [50]. Их конструкцию и процедуру сбора иллюстрируют рисунки 2А, Б и В. После 10-минутного сбора выдыхаемого воздуха капроновые нанофильтры смывали буферным раствором и анализировали смывы на присутствие живых микобактерий (посев), ДНК микобактерий, двух секретируемых антигенов микобактерии (ESAT-6 и Psts-1) а также на общее содержание иммуноглобулинов (IgA и IgG) и на наличие антител, специфичных к указанным антигенам. Иммунохимический анализ антигенов и антител выполняли разработанным нами сверхчувствительным методом, основанным на электрофоретическом концентрировании анализа на микрочипе и детектировании отдельных связанных молекул анализа с помощью магнитных микросфер, покрытых вторичными антителами [62,63]. Метод имеет предел обнаружения в миллион раз меньший чем у стандартного ИФА и позволяет детектировать около тысячи молекул иммуноглобулина. Результаты анализа проб у пациентов с легочной формой туберкулеза и у здоровых добровольцев недавно опубликованы [50] и кратко представлены в таблице 1. Из анализа проб, собранных у 42 пациентов и 13 здоровых добровольцев, был сделан вывод о том, что по наличию в пробах иммуноглобулина IgA, специфичного хотя бы к одному из секретируемых антигенов микобактерии можно диагностировать легочный туберкулез с чувствительностью и специфичностью 72 % и 58 %, соответственно. Есть все основания полагать, что специфичность такого анализа можно существенно повысить, включив в анализ интерлейкины, свидетельствующие о наличии воспалительного процесса в легких.

Таблица 1. Результаты анализа биомаркеров туберкулеза легкого после сбора на нанофильтрах из капрона в течении 10 минут [50].

Биомаркер	Предел обнаружения	Здоровые добровольцы ^a	Туберкулез легкого ^a
Посев (Бактек)	1 клетка	-	0/42
ДНК микобактерии	10 колоний	-	0/42
ESAT-6	10 фг	0/13	0/42
Psts-1	10 фг	0/13	0/42
Общий IgA	1 фг	12/13 (495; 80-1200)	38/42 (200; 10-1000)
ESAT-6-специфичный IgA	0,1-1 фг	3/13 (51; 40-60)	14/42 (6,5; 0,2-55)
Psts-1 –специфичный IgA	0,1-1 фг	5/13 (40; 3-170)	23/42 (8,5; 0.7-90)
Общий IgG	1 фг	0/5	0/10

^aЧисло образцов, содержащих данный биомаркер/общее число проанализированных образцов; в скобках – содержание биомаркеров в образцах в фг (медиана; 5 % квантиль – 95 % квантиль).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследование биологических наноаэрозолей представляет большой практический интерес в связи с решением трех важных проблем. Одна из них связана с обеспечением биобезопасности (анализ инфекций, передаваемых аэрозольным путем, мониторинг токсичных выбросов на производствах). Наночистоты, импакторы и электростатические преципитаторы, кратко представленные выше, могут решить проблему сбора наноаэрозольных патогенов и токсинов. Эти же средства могут быть использованы для целей бесконтактной диагностики легочных и системных заболеваний по биомаркерам, покидающим легкие в виде микрокапель и бионаноаэрозолей с выдыхаемым воздухом. Наконец, превращение известных лекарств в бионаноаэрозоли обеспечивает новый путь для их введения в организм с принципиально иной фармакодинамикой и уменьшенными дозами, способствующими снижению побочных эффектов. Все это делает исследования бионаноаэрозолей крайне интересными и актуальными.

Автор признателен Российскому Научному Фонду за финансирование разработки неинвазивной диагностики туберкулеза легких (грант № 15-15-00086), Российскому Фонду Фундаментальных Исследований (грант НК 15-29-01180\15) и Агентству по Защите от Рисков США (Defense Threat Reduction Agency, DTRA, грант HDTRA1 – 11 – 1 – 0054, суб-контракт E2024051) за финансирование разработок наноаэрозольных лекарств. Автор также благодарит Т.Я. Морозову за ценные замечания при подготовке рукописи.

Список литературы / References:

1. Ehn M., Thornton J. A., Kleist E. et al. A large source of low-volatility secondary organic aerosol. *Nature*, 2014, vol. 506, pp. 476-479.
2. Julin J., Murphy B. N., Patoulias D., Fountoukis C., Olenius T., Pandis S. N., Riipinen I. Impacts of future european emission reductions on aerosol particle number concentrations accounting for effects of ammonia, amines, and organic species. *Environ. Sci. Technol.*, 2018, vol. 52, pp. 692-700.
3. Lin K., Marr L. C. Aerosolization of Ebola virus surrogates in wastewater systems. *Environ. Sci. Technol.*, 2017, vol. 51, pp. 2669-2675.
4. Biskos G., Vons V., Yurteri C.U., Schmidt-Ott A. Generation and sizing of particles for aerosol-based nanotechnology. *KONA Powder and Particle Journal*, 2008, vol. 26, pp. 13-35.
5. Samodurova A.V., Voxel' S.V., Baklanov A.M., Onishchuk A.A., Karasev V.V. A study of homogeneous nucleation of ibuprofen in a flow chamber. Determination of the surface tension of critical nuclei. *Colloid J.*, 2013, vol. 75, pp. 397-408.
6. Onishchuk A.A., Tolstikova T.G., Baklanov A.M., Khvostov M.V., Sorokina I.V., Zhukova N.A., An'kov S.V., Borovkova O.V., Dultseva G.G., Boldyrev V.V., Fomin V.M., Steven Huang G. Generation, inhalation delivery and anti-hypertensive effect of nisoldipine nanoaerosol. *J. Aerosol Sci.*, 2014, vol. 78, pp. 41-54.
7. Rajapaksa A.E., Ho J.J., Qi A., Bischof R., Nguyen T.H., Tate M., Piedrafita D., McIntosh M. P., Yeo L.Y., Meeusen E., Coppel R. L., Friend J. R. Effective pulmonary delivery of an aerosolized plasmid DNA vaccine via surface acoustic wave nebulization. *Respiratory Research*, 2014, vol. 15, pp. 1-12.
8. Lee S.H., Heng D., Nga W.K., Chan H.K., Tan R.B.H. Nano spray drying: A novel method for preparing protein nanoparticles for protein therapy. *Int. J. Pharmaceutics*, 2011, vol. 403, pp. 192-200.
9. Morozov V.N., Kanev I.L., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Shlyapnikov Y.M., Nwabueze A.O., Propst C. N., van Hoek M. L. Biological nanoaerosols: from delivering drugs to collecting lung liquid in exhaled air. *New Approaches combating Cancer & Aging*, 2016, vol. 3, pp. 11-14.
10. International Commission on Radiological Protection. Human respiratory model for radiological protection. *Ann ICRP*, 1994, vol. 24, pp. 1-3.
11. Kebarle P., Verkerk U.H. Electrospray: from ions in solution to ions in the gas phase, what we know now. *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, vol. 28, pp. 898-917.
12. Fu H., Patel A.C., Holtzman M.J., Chen D.R. A new electrospray aerosol generator with high particle transmission efficiency. *Aerosol Sci. Technol.*, 2011, vol. 45, pp. 1176-1183.
13. Ijsebaert J. C., Geerse K.B., Marijnissen J.C.M., Lammers J.W.J., Zanen P. Electro-hydrodynamic atomization of drug solutions for inhalation purposes. *J. Appl. Physiol.*, 2001, vol. 91, pp. 2735-2741.
14. Morozov V.N. Generation of biologically active nano-aerosol by an electrospray-neutralization method. *J. Aerosol Sci.*, 2011, vol. 42, pp. 341-354.
15. Morozov V.N., Kanev I.L., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Shlyapnikov Y.M., Nikitin M.P., Nikitin P.I., Nwabueze A.O., van Hoek M.L. Generation and delivery of nanoaerosols from biological and biologically active substances. *J. Aerosol Sci.*, 2014, vol. 69, pp. 48-61.
16. Propst C.N., Nwabueze A.O., Kanev I.L., Pepin R.E., Gutting B.W., Morozov V.N., van Hoek M.L. Nanoaerosols reduce required effective dose of liposomal levofloxacin against pulmonary murine *Francisella tularensis* subsp. novicida infection. *J. Nanobiotechnology*, 2016, vol. 14, pp. 1-10.
17. Morozov V.N., Kanev I.L. Dry lung as a physical model in studies of aerosol deposition. *Lung*, 2015, vol. 193, pp. 799-804.
18. Kim C. S. Methods of calculating lung delivery and deposition of aerosol particles. *Respiratory care*, 2000, vol. 45, pp. 695-671.

19. Onischuk A.A., Tolstikova T.G., Sorokina I.V., Zhukova N.A., Baklanov A.M., Karasev V.V., Borovkova O.V., Dultseva G.G., Boldyrev V.V., Fomin V.M. Analgesic effect from ibuprofen nanoparticles inhaled by male mice. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Delivery*, 2009, vol. 22, pp. 1-8.
20. Onischuk A.A., Tolstikova T.G., An'kov S.V., Baklanov A.M., Valiulin S.V., Khvostov M.V., Sorokina I.V., Dultseva G.G., Zhukova N.A. Ibuprofen, indomethacin and diclofenac sodium nanoaerosol: Generation, inhalation delivery and biological effects in mice and rats. *J. Aerosol Sci.*, 2016, vol. 100, pp. 164-177.
21. Shlyapnikova E.A., Kanev I.L., Novikova N.N., Litvinova E.G., Shlyapnikov Y.M., Morozov V.N. Inhalation of bleomycin nanoaerosol does not induce fibrosis in mice. *European J. Nanomedicine*, 2016, vol. 8, pp. 213-224.
22. Garbuzenko O.B., Mainelis G., Taratula O., Minko T. Inhalation treatment of lung cancer: the influence of composition, size and shape of nanocarriers on their lung accumulation and retention. *Cancer Biol. Med.*, 2014, vol. 11, pp. 44-55.
23. Kuzmov A., Minko T. Nanotechnology approaches for inhalation treatment of lung diseases. *Journal of Controlled Release*, 2015, vol. 219, pp. 500-518.
24. Yang X., Zhao C., Gao Z., Su X. A novel regulator of lung inflammation and immunity: pulmonary parasympathetic inflammatory reflex. *Q. J. Med.*, 2014, vol. 107, pp. 789-792.
25. Tracey K.J. The inflammatory reflex. *Nature*, 2002, vol. 420, pp. 853-859.
26. *Bleomycin Chemotherapy*. Academic Press, ed. I. Branimir, M. Sikic, S. Rozenzweig, K. Carter, 1985, 335 p.
27. Sheykh Z.V., Krutskovich A.O., Drebushevskiy N.S., Shvayko S.N., Dunaev A.P., Alekseev V.G. Pulmonary cytotoxicity induced by bleomycin and methotrexate. *Vestnik Rentgenologii i Radiologii*, 2015, vol. 3, pp. 46-51. (In Russ.)
28. Mouratis M.A., Aidinis V. Modeling pulmonary fibrosis with bleomycin. *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 2011, vol. 17, pp. 355-361.
29. Wall D.A., Lanutti A. T. High levels of exopeptidase activity are present in rat and canine bronchoalveolar lavage fluid. *Int. J. Pharmaceutics*, 1993, vol. 97, pp. 171-181.
30. Stone K.C., Mercer R.R., Gehr, P., Stockstill B., Crapo J.D. Allometric relationships of cell numbers and size in the mammalian lung. *Am. J. Resp. Cell Mol. Biol.*, 1992, vol. 6, pp. 235-243.
31. Coty J.B., Vauthie C. Characterization of nanomedicines: A reflection on a field under construction needed for clinical translation success. *Journal of Controlled Release*, 2018, vol. 275, 254-268.
32. Pelaz B., Alexiou C., Alvarez-Puebla R. A. et al. Diverse applications of nanomedicine. *ACS Nano*, 2017, vol. 11, pp. 2313-2381.
33. Zhou Y., Peng Z., Seven E. S., Leblanc R. M. Crossing the blood-brain barrier with nanoparticles. *J. Controlled Release*, 2018, vol. 270, pp. 290-303.
34. Kozlovskaya L., Abou-Kaoud M., Stepensky D. Quantitative analysis of drug delivery to the brain via nasal route. *J. Controlled Release*, 2014, vol. 189, pp. 133-140.
35. Xi J., Zhang Z., Si X. A. Improving intranasal delivery of neurological nanomedicine to the olfactory region using magnetophoretic guidance of microsphere carriers. *Int. J. Nanomedicine*, 2015, vol. 10, pp. 1211-1222.
36. Dasa S. C., Stewart P. J. The influence of lung surfactant liquid crystalline nanostructures on respiratory drug delivery. *Int. J. Pharmaceutics*, 2016, vol. 514, pp. 465-474.
37. Austin P.R., Timmerman S.W. *Design and operation of clean rooms*. Business News Publishing Co, Detroit (USA), 1965, pp. 235-251.
38. Vladimirovskiy M.A., Shipina L.K., Makeeva E.S., Alyapkina Y.S., Mikheev A.Y., Morozov V.N. Application of water-soluble nanofilters for collection of airborne *M. tuberculosis* DNA in hospital wards. *J. Hospital Infect.*, 2016, vol. 93, pp. 100-104.
39. Johnson G.R., Morawska L. The mechanism of breath aerosol formation. *J. Aerosol Med. Pulm. Drug Deliv.*, 2009, vol. 22, pp. 229-237.
40. Haslbeck K., Schwarz K., Hohlfeld J.M., Seume J.R., Koch W. Submicron droplet formation in the human lung. *J. Aerosol Sci.*, 2010, vol. 41, pp. 429-438.
41. Bondesson E., Jonsson L.T., Bengtsson T., Wollmer P. Exhaled breath condensate – site and mechanism of formation. *J. Breath Res.*, 2009, vol. 3, p. 016005.
42. Namati E., Thiesse J., de Ryk J., McLennan G. Alveolar dynamics during respiration. Are pores of Kohn a pathway to recruitment? *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.*, 2008, vol. 38, pp. 572-578.
43. Holmgren E., Gerth E., Ljungstrom A.C., Almstrand P., Larsson B., Bake A.C., Olin A.C. Effects of breath holding at low and high lung volumes on amount of exhaled particles. *Respir. Physiol. Neurobiol.*, 2013, vol. 185, pp. 228-234.
44. Edwards D.A., Man J.C., Brand P., Katstra J.P., Sommerer K., Stone H.A., Nardell E., Scheuch G. Inhaling to mitigate exhaled bioaerosols. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 2004, vol. 101, pp. 17383-17388.
45. Kubán P., Foret F. Exhaled breath condensate: Determination of non-volatile compounds and their potential for clinical diagnosis and monitoring. A review. *Anal. Chim. Acta*, 2013, vol. 805, pp. 1-18.
46. Effros R. M., Biller J., Foss B., Hoagland K., Dunning M. B., Castillo D., Bosbous M., Sun F., Shaker R. A simple method for estimating respiratory solute dilution in exhaled breath condensates. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 2003, vol. 168, pp. 1500-1505.

47. Muccillia V., Saletta R., Cunsolo V., Hob J., Gilic E., Contec E., Sichilic S., Foti V. C. S. Protein profile of exhaled breath condensate determined by high resolution mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2015, vol. 105, pp. 134-49.
48. Tinglev S., Ullah G., Ljungkvist E., Viklund A.C., Olin O., Beck O. Characterization of exhaled breath particles collected by an electret filter technique. *J. Breath Res.*, 2016, p. 026001.
49. Ullah S., Sandqvist S., Beck O. Measurement of lung phosphatidylcholines in exhaled breath particles by a convenient collection procedure. *Anal. Chem.*, 2015, vol. 87, pp. 11553-11560.
50. Morozov V.N., Nikolaev A.A., Shlyapnikov Y.M., Mikheev A.Y., Shlyapnikova E.A., Bagdasaryan T.R., Burmistrova I.A., Smirnova T.G., Andrievskaya I.Y., Larionova E.E., Lyadova I. V. Non-invasive approach to diagnosis of pulmonary tuberculosis using exhaled air. *J. Breath Res.*, 2018, vol. 12, p. 036010.
51. Beck O., Stephanson N., Sandqvist S., Frank J. Detection of drugs of abuse in exhaled breath using a device for rapid collection: comparison with plasma, urine and self-reporting in 47 drug users. *J. Breath Res.*, 2013, vol. 7, p. 026006.
52. Mikheev A.Y., Kanev I.L., Morozova T.Y., Morozov V.N. Water-soluble filters from ultra-thin polyvinylpyrrolidone nanofibers. *J. Membr. Sci.*, 2013, vol. 448, pp. 151-159.
53. Basmanov P.I., Kirichenko V.N., Filatov Y.N., Yurov Y.L. *Highly Efficient Cleaning of Gases from Aerosols with Petryanov's Filters*, Moscow, 2002, 193 p. (In Russ.)
54. Morozov V.N., Vsevolodov N.N. Electrospray-neutralization method for manufacturing free and supported nanomats. *Adv. Materials*, 2007, vol. 19, pp. 4381-4386.
55. Marple V.A., Liu B.Y.H. Characteristics of laminar jet impactors. *Environ. Sci. Technol.*, 1974, vol. 8, pp. 648-654.
56. Papineni R.S., Rosenthal F.S. The size distribution of droplets in the exhaled breath of healthy human subjects. *J. Aerosol. Med.*, 1997, vol. 10, pp. 105-116.
57. Almstrand A.C., Ljungström E., Lausmaa J., Bake B., Sjövall P., Olin A. C. Airway monitoring by collection and mass spectrometric analysis of exhaled particles. *Anal. Chem.*, 2009, vol. 81, pp. 662-668.
58. Miller A., Frey G., King G., Sunderman C. A handheld electrostatic precipitator for sampling airborne particles and nanoparticles. *Aerosol Sci. Technol.*, 2010, vol. 44, pp. 417-427.
59. Morozov V.N., Mikheev A.Y. A collection system for dry solid residues from exhaled breath for analysis via atomic force microscopy. *J. Breath Res.*, 2017, vol. 11, p. 016006.
60. Morozov V.N., Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Nikolaev A.A., Lyadova I.V. Non-invasive lung disease diagnostics. Perspectives and technical challenges. *J. Breath Res.*, 2018, vol. 12, p. 017103.
61. Mikheev A.Y., Shlyapnikov Y.M., Kanev I.L., Avseenko A.V., Morozov V. N. Filtering and optical properties of free standing electrospun nanomats from nylon-4,6. *European Polymer Journal*, 2016, vol. 75, pp. 317-328.
62. Morozov V.N., Groves, S., Turell M. J., Bailey C., Three minutes-long electrophoretically assisted zeptomolar microfluidic immunoassay with magnetic beads detection. *J. Am. Chem. Soc.*, 2007, vol. 129, pp. 12628-12629.
63. Shlyapnikov Y.M., Morozov V.N. Titration of trace amounts of immunoglobulins in a microarray-based assay with magnetic labels. *Anal. Chim. Acta*, 2017, vol. 966, pp. 47-53.

USE OF BIONANOAERSOLS IN TREATMENT AND DIAGNOSTICS OF LUNG DISEASES

Morozov V.N.

Institute of Theoretical and Experimental Biophysics, RAS

Institutskaya str., 3, Pushchino, 142290, Russia; e-mail: tammorozova@rambler.ru

Abstract. The report outlines a new field of biotechnology, which employs nanoaerosols for treatment, and diagnostics of lung diseases. It presents a brief review of known methods for generation of nanoaerosolized drugs without damaging their functional activity. The author's method is based on electrohydrodynamic atomization of drug solutions followed by gas-phase neutralization of charged nanoclusters with counter-ions. This method turns any water- or ethanol-soluble substance (including peptides, proteins and DNA) into bionanoaerosol (BNA) with their structure and functional properties retained. Methods for measurement of inhaled BNA doses are briefly outlined and a few examples of successful application of BNA from antibiotics and other drugs for treatment of diseases in animals are presented. Some peculiarities of BNA, advantages of drug introduction via BNA inhalation over the other administration routes, as well as potential side effects of BNA are discussed. It is demonstrated that nanoaerosol particles formed upon drying of microdroplets of lung fluid (MLFs) can be used in non-invasive diagnostics of lung diseases. Special filtering material was developed and disposable filtering devices were designed to collect such nanoaerosols and MLFs from exhaled air of patients with pulmonary tuberculosis. Tuberculosis biomarkers (antibodies specific to secreted mycobacterium antigens) were detected in most probes collected from the patients, illustrating feasibility of non-invasive diagnostics. Similar filtering devices were successfully employed in analysis of nosocomial infections in clinics. These devices may also be used to control biosafety in transport, in private houses and in industrial buildings.

Key words: *bionanoaerosols, generation, treatment with bionanoaerosols, exhaled air, non-invasive diagnostics.*