

ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ ШКОЛА ДЛЯ МОЛОДЕЖИ

# **НАНОМЕДИЦИНА И НАНОТОКСИКОЛОГИЯ**

(сборник тезисов и статей)

Москва  
2009

Сборник тезисов и статей: Всероссийская научная школа для молодежи  
«Наномедицина и нанотоксикология». – М., МДВ, 2009. – 32 с.

# СОДЕРЖАНИЕ

<i>Н.Н. Белушкина, В.В. Тарасов, О.Г. Дегтярева, Д.Ю. Юрьева, Л.А. Павлова</i> Разработка наночастиц препаратов антиангиогенного действия на основе RGD-пептидов.....	4
<i>Е.В. Блынская, Буй Зыонг Квинх, Р.Н. Аляутдин, К.В. Алексеев</i> Разработка технологии и фармакокинетическое исследование наноразмерных систем доставки лекарственных веществ на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот .....	7
<i>Д.В. Жуликов, А.И. Глухов</i> Теломераза. Клеточное старение и рак.....	10
<i>С.Т. Захидов</i> Нанотехнологии и генетическая безопасность.....	14
<i>О.В. Климова, Е.А. Воронцов</i> Изучение влияния технологических параметров синтеза на физико-химические свойства наночастиц, получаемых на основе биodeградируемых полимеров.....	16
<i>А.В. Лавров</i> Методы молекулярной генетики в медицине.....	19
<i>П.Г. Свешников, В.И. Киселев, М.А. Пальцев</i> Исследования маркеров онкогенеза с использованием нанобиотехнологий .....	22
<i>В.В. Тарасов, Л.А. Павлова, И.И. Краснюк, Р.Н. Аляутдин</i> Создание и исследование наноразмерных лекарственных форм для ангиолигандной структуры .....	24
<i>Н.Л. Шимановский</i> Перспективы развития нанофармакологии.....	27

# РАЗРАБОТКА НАНОФОРМ ПРЕПАРАТОВ АНТИАГРЕГАЦИОННОГО ДЕЙСТВИЯ НА ОСНОВЕ RGD-ПЕПТИДОВ

## **Н.Н. БЕЛУШКИНА**

д.б.н, профессор,  
ученый секретарь НИИ молекулярной медицины  
ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова

## **В.В. ТАРАСОВ**

аспирант кафедры технологии лекарственных форм  
ММА им. И.М. Сеченова

## **О.Г. ДЕГТЯРЕВА**

студент РХТУ им. Д.И.Менделеева

## **Д.Ю. ЮРЬЕВА**

студентка ММА им. И.М.Сеченова

## **Л.А. ПАВЛОВА**

доцент, к.ф.н, заведующая лабораторией  
биологически активных соединений  
НИИ молекулярной медицины  
НИЦ ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова

## ВВЕДЕНИЕ

Разработка лекарственных препаратов на основе структуры RGD-пептидов – перспективное направление получения антиагрегационных препаратов. Для повышения стабильности препаратов можно использовать подход разработки лекарственных наночастиц.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Разработка технологической схемы получения наночастиц лекарственной формы RGD-пептидов.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез пептидов проводился по разработанной методике на автоматическом пептидном синтезаторе ABI 433A Peptide Synthesizer фирмы Applied Biosystems. Отмывка и экстракция пептида проводилась по разработанной методике. Наночастицы получали при помощи модифицированной методики анионной полимеризации в водной среде. В основе методики лежит способность мономера (бутилцианоакрилата) полимеризоваться с образованием стабильных частиц при значениях pH=2-3. Выбор бутилцианоакрилата обусловлен низкой токсичностью, биodeградируемостью и способностью эффективно сорбировать вещества. Сорбцию пептида проводили следующим образом: растворяли лиофилизированный пептид в изотоническом растворе натрия хлорида, лиофилизированные наночастицы диспергировали в изотоническом растворе до получения однородной суспензии молочно-белого цвета. К суспензии наночастиц добавляли раствор пептида и инкубировали при пониженной температуре. Затем полученную суспензию инкубировали с 1% раствором ПС-80. Размер частиц определяли методом лазерного светорассеяния. Качественный и количественный анализ полученной лекарственной формы проводили при помощи ВЭЖХ с масс-селективным детектированием. Исследование биологической активности проводилось на тромбоцитбогатой плазме человека. Агрегацию тромбоцитов изучали с использованием турбидиметрического метода Борна (Born, 1962). В качестве индуктора агрегации применяли АДФ на агрегометре LA230-2 («Биола», Россия).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Выбор RGD-пептида объясняется наличием трипептидной последовательности Arg-Gly-Asp у адгезивных белков и альфа-гранул тромбоцитов, являющихся лигандами интегринов, которые опосредуют взаимодействие тромбоцитов друг с другом и тромбоцитов с другими клетками. Выход чистого субстрата RGD-пептида составил 89%. Для подтверждения структуры полученного аналога RGD-пептида применялся ядерно-магнитный резонанс. Структура пептида подтверждена. В ходе исследований была разработана технологическая схема получения наносомальной лекарственной формы пептидов. Получены частицы со средним размером  $240 \pm 17$  нм. Ингибирование АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов человека проводили при концентрации пептида  $10^{-6}$  –  $3 \times 10^{-3}$  М. Было выявлено доз-зависимое снижение агрегации тромбоцитов наночастиц пептидов от 5 до 20 % при различных концентрациях.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработана технологическая схема получения наносомальной лекарственной формы RGD-пептидов.

РАЗРАБОТКА ТЕХНОЛОГИИ  
И ФАРМАКОКИНЕТИЧЕСКОЕ  
ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОРАЗМЕРНЫХ  
СИСТЕМ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ  
ВЕЩЕСТВ НА ОСНОВЕ СОПОЛИМЕРОВ  
МОЛОЧНОЙ И ГЛИКОЛЕВОЙ КИСЛОТ

**Е.В. БЛЫНСКАЯ**

аспирант кафедры фармакологии  
ММА им. И.М. Сеченова

**БУЙ ЗЫОНГ КВИНХ**

аспирант кафедры фармакологии  
ММА им. И.М. Сеченова

**Р.Н. АЛЯУТДИН**

д.м.н., профессор,  
заведующий кафедрой фармакологии  
ММА им. И.М. Сеченова

**К.В. АЛЕКСЕЕВ**

д.ф.н., аведующий лаборатории технологии  
ГЛФ НИИ Фармакологии РАМН им. В.В.Закусова

## ВВЕДЕНИЕ

В современной фармакологии фармацевтической технологии одним из наиболее значимых направлений является повышения степени эффективности и безопасности химиотерапевтических средств. Одним из возможных решений вопроса является разработка наноразмерных носителей.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Создание наноразмерных систем доставки лекарственных веществ на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот, а также оценка их фармакокинетических показателей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Осуществление выбора оптимальной технологии получения наноразмерных систем доставки включало в себя использование как различных базисных технологических приемов и методов (полимеризационный метод, метод испарения растворителя, метод высаливания и т.д.), так и вариации в ключевых показателях процесса (рН среды, соотношение лекарственное вещество: полимер, скорость испарения, температурный режим). Выбор методики осуществлялся в ходе оценки показателей степени включения лекарственного вещества в наноразмерную систему доставки и воспроизводимости. Наилучшие результаты были получены при применении следующего метода: полимер растворяется в органическом растворителе, лекарственное вещество солюбилизируется в растворе полимера, и эта смесь эмульгируется в водном растворе с помощью ПАВ для получения эмульсии типа «вода-масло» (в качестве органических растворителей выбраны ацетон и дихлорметан). Были выбраны следующие соотношения органический растворитель: полимер: 1:20; 1:40; 1:60; 1:80; 1:100. Внутренняя водная фаза – раствор лекарственного вещества в воде, внешняя – раствор ПАВ.

Оценку фармакокинетических параметров проводили на кроликах-самцах породы Шиншилла. Исследуемые субстанции лекарственного вещества вводили животным однократно путем внутривенной инфузии в соответствующих дозировках. Пробы крови в объеме, достаточном для получения 0,5 мл плазмы, отбирали из краевой ушной вены через 0,5, 1, 1,5, 2, 4, 6, 8, 12, 24 и 36 часов после введения.

Осуществляли определение концентрации лекарственного вещества в плазме крови.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Введение лекарственного вещества в виде наночастиц приводит к изменению фармакокинетического профиля препарата в плазме крови: увеличивается период полувыведения ( $T_{1/2}$ ) и среднее время удерживания лекарственного вещества в организме (MRT), площадь под фармакокинетической кривой «концентрация – время» ( $AUC_{(0 \rightarrow 36)}$ ) также возрастает (в основном за счет терминального участка кривой). Полученные данные свидетельствуют о более длительном нахождении препарата в кровяном русле в концентрациях достаточных для эффективного воздействия, что позволяет предположить пролонгацию действия лекарственного вещества в виде наноразмерной системы доставки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработан оптимальный состав и технологическая схема изготовления наноразмерных систем доставки на основе сополимеров молочной и гликолевой кислот, а также проведено изучение их фармакокинетических параметров.

ТЕЛОМЕРАЗА.  
КЛЕТОЧНОЕ СТАРЕНИЕ И РАК

**Д.В. ЖУЛИКОВ**  
**А.И. ГЛУХОВ**

ГОУ ВПО ММА им. И.М. Сеченова

В 60-х гг. XX века Л. Хейфлик, исследуя размножение клеток в культуре *in vitro*, установил, что время существования культуры соматических клеток конечно и определяется количеством их делений (в среднем 60). Это количество варьировало в зависимости от возраста организма, клетки которого были исследованы (обратная пропорциональность). Таким образом, была опровергнута существовавшая ранее гипотеза о том, что отдельная клетка *in vitro* может жить и делиться неограниченно долгое время при условии постоянного поступления и отвода необходимых ей метаболитов.

Барьер в 60 делений (получивший затем название лимита Хейфлика) преодолевали лишь герминативные клетки половых желез, стволовые клетки крови и тканей, а также клетки злокачественных опухолей. Попытку объяснения лимита Хейфлика предпринял в 1971 г. советский ученый А. Оловников, разработав т.н. теломерную гипотезу старения клетки.

Теломеры, участки ДНК с повторяющимися последовательностями нуклетоидов, расположенные на концах эукариотических хромосом были открыты в 1938 г. Б. Мак-Клинток и Г. Мюллером. Уже после открытия Хейфлика было установлено, что в культуре соматических клеток в процессе деления происходит прогрессивное укорочение теломер, которое становится критическим при достижении клеткой лимита деления. Было установлено, что с каждым клеточным делением концы хромосом укорачиваются в среднем на 200 бп. Это явление связано с тем, что уже в самом генетическом аппарате клетки и в способе его воспроизведения заложено то, что хромосомная ДНК должна необратимо укорачиваться при ее репликации. Данный феномен получил название «проблема концевой недорепликации». Суть данного явления заключается в неспособности ДНК-полимеразы  $\beta$  достроить отстающую цепь ДНК до конца, в случае расположения репликативной вилки близко к концу хромосомы.

Феномен концевой недорепликации ДНК и связанное с ним прогрессивное укорочение теломер в процессе клеточного деления, подтвержденные экспериментально, считаются в настоящее время основным механизмом, опосредующим процесс генетически детерминированного старения и гибели клеток.

В то же время, длина теломер «клеточного депо» (стволовые клетки тканей и половые клетки) должна поддерживаться на относительно постоянном уровне, не достигая критически малого значе-

ния, с целью обеспечения достаточного запаса делений для регенерации ткани, а также репродукции организма. Длина теломер клеток злокачественных опухолей также является достаточно стабильной. В 1971 г. А. Оловников, предложив теломерную гипотезу старения, высказал также и предположение о наличии специализированной ферментной системы, контролирующей и поддерживающей длину теломерной ДНК. Указанный фермент, способный увеличивать длину теломерных последовательностей ДНК, был выделен Э. Блэкберн и Э. Грайдер в 1984 г. из культуры жгутиковых простейших и назван теломеразой.

Теломераза – ферментный комплекс, являющийся истинной обратной транскриптазой, синтезирующий ДНК теломерных повторов на основе входящей в его состав РНК-матрицы. Теломераза обнаружена в клетках большинства эукариотических организмов, в т.ч. и человека.

В настоящее время установлена ключевая роль теломеразы в поддержании стабильности длины теломер клетки, а также ряд других функций данного фермента, направленных на регуляцию деления клетки и запрограммированной ее гибели (апоптоз). Клетки «тканевого депо» со стабильной длиной теломер являются единственным типом нормальных клеток, где обнаруживается теломеразная активность.

При критическом укорочении теломер соматической клетки по достижении лимита Хейфлика в норме наступает запрограммированная гибель клетки - апоптоз. Однако в случае значительных изменений генетического аппарата и активации теломеразы клетка преодолевает лимит в 60 делений и приобретает способность к неограниченному делению. Данный процесс носит название иммортализации и является одной из стадий возникновения злокачественной опухоли. Т.к. критическое укорочение теломер всегда сопряжено с модификацией и перестройкой ДНК – разрывами, слияниями хромосом, а также повышенной частотой мутаций, то получающаяся в результате активации теломеразы иммортализованная клетка теряет способность отвечать на регуляторные воздействия со стороны организма и изменяет свой фенотип, т.е., фактически, образуется клетка злокачественной опухоли.

Теломеразная активность обнаружена в абсолютном большинстве злокачественных опухолей человеческого организма. Это открывает возможности по применению теломеразы в клинической практике, как в качестве диагностического (дифференциальная диагностика доброкачественных и злокачественных новообразований), так и терапевтического инструмента (использование препаратов, ингибирующих теломеразу, с целью подавления роста и деления клеток злокачественных опухолей).

# НАНОТЕХНОЛОГИИ И ГЕНЕТИЧЕСКАЯ БЕЗОПАСНОСТЬ

**С.Т. ЗАХИДОВ**

д.б.н., профессор,  
Московский государственный университет  
им. М.В. Ломоносова, Москва

Развитие нанотехнологий обещает продолжить глубокие перемены в структуре окружающего мира. Нельзя исключить, что природная среда пополнится новым обширным классом специфических раздражителей, обладающих мутагенной активностью, т.е. способностью повреждать структуру генов и хромосом. Встреча биологических систем с наноматериалами не исключает катастрофических изменений первых. В этой связи глобальный нанотехнологический проект должен предусмотреть такие опасности и поставить под тотальный контроль генотоксикологическую оценку продуктов, создаваемых на базе манипуляций с атомами, молекулами, молекулярными системами. Другими словами, специалисты, занимающиеся проблемами нанотехнологии, должны добиваться строгого изучения эффектов наночастиц на генетические и биологические системы. С точки зрения фундаментальной мутационной генетики, нанотехнологии, сохраняя верность принципу междисциплинарности, будут обязаны изучить вопрос о том, какие варианты развития возможны после того, как наночастицы достигнут аппарата наследственности. Очень может быть, что в случае интеграции наночастиц в хромосомные матрицы их влияние на процессы мутагенеза может оказаться катастрофическими. В арсенале исследователей уже имеются данные, свидетельствующие о том, что нанокорпускулы (например, фуллерены и наночастицы золота) способны взаимодействовать с молекулой ДНК, возмущать ее структуру. В целом же результаты исследований структурно-функциональных последствий действия наночастиц на гены, хромосомы, белки, ферменты и органеллы в клетке, а также интерпретация и теоретический анализ этих результатов откроют новую страницу в биологии и генетике, станут самостоятельным тематическим разделом в нанонауке и синергетике, разделом очень важным и интересным.

ИЗУЧЕНИЕ ВЛИЯНИЯ ТЕХНОЛОГИЧЕСКИХ  
ПАРАМЕТРОВ СИНТЕЗА  
НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА  
НАНОЧАСТИЦ, ПОЛУЧАЕМЫХ НА ОСНОВЕ  
БИОДЕГРАДИРУЕМЫХ ПОЛИМЕРОВ

**О.В. КЛИМОВА**

аспирант кафедры биологической химии  
ГОУ ВПО Московская медицинская академия  
им. И.М. Сеченова Росздрава

**Е.А. ВОРОНЦОВ**

к.х.н, зав. лабораторией органического синтеза  
Центра Медико- биологических и экологических проблем РАЕН

## ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день является очень актуальным вопрос создания новых лекарственных форм, способных увеличить терапевтическую эффективность уже известных лекарственных веществ (ЛВ), снизить выраженность побочных эффектов за счет их направленной доставки к тканям- и органам - мишеням, увеличить комфортность лечения для пациента. Одним из перспективных направлений в этой области, способным решить поставленные задачи, представляется использование полимерных наночастиц (НЧ). Данный метод позволяет обеспечить направленный транспорт лекарственного вещества в пораженный орган или ткань, что существенно уменьшит общее токсическое воздействие на организм и, как следствие, снизит выраженность побочных эффектов, сделает возможным контролирование высвобождения лекарственного вещества, что поможет, во-первых, создавать на их основе пролонгированные лекарственные формы, во-вторых, обеспечивать внутриклеточную концентрацию на оптимально высоком уровне. Для получения НЧ используются различные полимеры. Особый интерес среди них представляют сополимеры молочной и гликолевой кислот (PLGA). НЧ из данного вида полимеров эффективно сорбируют различные ЛВ, способны к биодegradации и высвобождению ЛВ, обладают относительно низкой токсичностью и полностью выводятся из организма. Они также способны образовывать устойчивые коллоидные системы, пригодные для перорального и внутривенного введения. Таким образом, НЧ из сополимеров молочной и гликолевой кислот являются перспективными носителями для создания коллоидных систем доставки ЛВ. В качестве лекарственного вещества для данного исследования был выбран ломефлоксацин, т. к. он является одним из наиболее активных современных антибактериальных препаратов с широким спектром действия группы фторхинолонов. Следует отметить, что включение такого рода веществ в НЧ позволит решить проблему резистентности, возникающей в результате длительного лечения.

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Изучить влияние технологических параметров синтеза на физико-химические свойства НЧ с ломефлоксацином, получаемых на основе PLGA.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Частицы были получены с использованием следующих методов:

1) метод одинарных эмульсий, 2) метод двойных эмульсий, 3) метод приципитации.

В качестве растворителя для PLGA использовали хлороформ, ацетонитрил, для ломефлоксацина - дистиллированную воду и 0,01 М раствор хлороводородной кислоты. В качестве ПАВ были использованы поливиниловый спирт, альбумин, TWIN-80 и др.

Полученные НЧ оценивались по размеру и степени включения ЛВ (ломефлоксацина). Размер наночастиц определяли методом фотонной корреляционной спектроскопии. Степень включения ломефлоксацина определяли с помощью ВЭЖХ после растворения отмытых от свободного препарата частиц в диметилсульфоксиде (ДМСО). Также с помощью спектрофотометрии устанавливали содержание ломефлоксацина в супернатанте после отмывки НЧ.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

НЧ с наиболее оптимальными свойствами (размер и степень включения ЛВ) были получены при использовании метода двойных эмульсий.

На свойства получаемых НЧ было обнаружено и исследовано влияние следующих параметров синтеза: выбор ПАВ, соотношение водной и органической фаз, соотношение между количествами вводимых в полимеризационную среду полимером и ЛВ ( PLGA: ломефлоксацин), режима центрифугирования при отмывке частиц от несвязанного ломефлоксацина. Планируется проведение испытаний на бактериальную активность на культурах клеток, в частности М. Tuberculosis штамма H37Rv, а также испытания на животных.

# МЕТОДЫ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ГЕНЕТИКИ В МЕДИЦИНЕ

**А.В. ЛАВРОВ**

Медико-генетический научный центр РАМН, Москва

После изобретения в 1983 году Кари Маллисом полимеразной цепной реакции (ПЦР) молекулярная генетика стала быстро переключаться из научных лабораторий в диагностические. ПЦР лежит в основе практически всех генетических методов, широко используемых в медицинской практике, и по сей день. Пожалуй, самое широкое распространение эти методы получили после того, как стали рутинными в диагностике многих инфекций, прежде всего заболеваний, передающихся половым путём. Скорость анализа и его точность позволил отказаться от сложных и длительных иммунологических и культуральных анализов. Модификация ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ), позволяющая количественно оценивать инфекционную нагрузку, даёт возможность наблюдать за течением и реакцией на лечение многих болезней на этапах, когда клинические проявления не позволяют однозначно охарактеризовать патологический процесс. Развитие самостоятельного направления медицины – клинической генетики также немыслимо без методов молекулярной генетики. И в данной области находят широкое применение не только рутинная ПЦР, но и более старые и трудоёмкие методы, такие как гибридизация на гелях. В поисках новых мутаций и причин заболевания многими наследственными болезнями используют немало методов прямой и косвенной диагностики и, безусловно, золотой стандарт молекулярной генетики – секвенирование. Интенсивные поисковые работы, направленные на разработку более чувствительных и точных ферментов, усовершенствование методических подходов позволяют активно проводить диагностику на отдельных клетках, что широко используется при проведении ЭКО, особенно в семьях с отягощённым наследственным анамнезом. В настоящее время благодаря стремительному развитию биоинформационных технологий и грандиозным усилиям крупнейших биотехнологических фирм заняли своё место в диагностике микрочиповые технологии. Но их уже замещают технологии параллельного секвенирования, основанные на т.н. секвенаторах нового поколения. В 5-летней перспективе ожидается, что секвенирование генома человека будет стоить 1000 долларов и это приведёт к лавинообразному накоплению данных о причинах не только наследственных и инфекционных заболеваний, но и заболеваний с наследственной предрасположенностью, к которым относятся лидеры по заболеваемости, инвалидизации и смертности – сердечно-сосудистые болезни и онкологические. Трудно переоценить значение

молекулярно-генетической диагностики в современной медицине. От врача требуется не только знание основ и возможностей этих методов, как других распространённых параклинических методов, но и представлять перспективы развития данной области, потому что научные разработки в течение нескольких лет транслируются в практическое здравоохранение.

ИССЛЕДОВАНИЯ МАРКЕРОВ ОНКОГЕНЕЗА  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
НАНОБИОТЕХНОЛОГИЙ

**П.Г. СВЕШНИКОВ**

**В.И. КИСЕЛЕВ**

**М.А. ПАЛЬЦЕВ**

НИИ молекулярной медицины  
ГОУ ВПО Московская медицинская академия  
им. И.М.Сеченова

Установлено, что рак шейки матки (РШМ) является ВПЧ (вирус папилломы человека) – ассоциированным заболеванием. В этой связи нами была поставлена задача выяснить экспериментальным путем с использованием нанобиотехнологий, какие из вирус-специфических белков ВПЧ могут быть ранними маркерами РШМ, а также потенциальными мишенями для создания терапевтической противоопухолевой вакцины.

С этой целью проведено клонирование, экспрессия в *E. coli* и очистка белков E7 из ВПЧ типов 6, 11, 16 и 18, а также их генетических фьюзов с полноразмерным белком теплового шока 70 из *M. tuberculosis* (Hsp70) с общей структурой N-His6-E7-Hsp70-C. Получены и охарактеризованы моноклональные антитела (МоАт) против всех структурных элементов химерных белков, на основе которых разработана сверхчувствительная ИФА тест-система для количественного определения онкобелков E7 ВПЧ типов 16 и 18 в цервикальных пробах (предел детекции 50 пг/мл).

Проведено комплексное исследование цервикальных проб (цитология, ПЦР и ИФА) от 1500 пациентов с различным клиническим диагнозом (здоровые, CIN 1-3, карцинома in situ, инвазивный РШМ), которое показало, что онкобелок E7 не детектируется ИФА в цервикальных пробах от здоровых пациентов, повышается до концентрации 5-10 нг/мл в группах CIN 1-3 и не зависит от стадии РШМ. Наблюдается корреляция между результатом ПЦР и ИФА в ходе лечения, причем сохранение или повышение уровня E7 в цервикальных пробах является фактором неблагоприятного прогноза. Проведено доклиническое исследование вагинальных суппозиторий, содержащих смесь химерных белков E716- Hsp70 и E718- Hsp70 с хитозаном на лабораторных животных, которое показало низкую токсичность препаратов и индукцию сильного антительного и клеточного ответа, специфически направленного против онкобелков E7 ВПЧ типов 16 и 18.

СОЗДАНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ  
НАНОРАЗМЕРНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ФОРМ  
ДЛЯ АНКСИОЛИТИКОВ  
ПЕПТИДНОЙ СТРУКТУРЫ

**В.В. ТАРАСОВ**

аспирант кафедры технологии лекарственных форм  
ММА им. И.М. Сеченова

**Л.А. ПАВЛОВА**

к.ф.н., доцент,  
зав. лабораторией биологически-активных соединений  
НИИ Молекулярной медицины  
ММА им. И.М. Сеченова

**И.И. КРАСНЮК**

д.ф.н., профессор  
зав. кафедрой технологии лекарственных форм  
ММА им. И.М. Сеченова

**Р.Н. АЛЮТДИН**

д.м.н., профессор,  
зав. кафедрой фармакологии  
ММА им. И.М. Сеченова

## ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

В настоящее время для лечения психических расстройств, в частности фобий, широко применяются препараты бензодиазепинового ряда, такие как феназепам, диазепам, нозепам и др. Бензодиазепины, являясь препаратами выбора, обладают выраженным анксиолитическим действием, однако, длительное их применение связано с проявлением таких негативных эффектов, как седация и миорелаксация, нарушение структуры сна. При длительном приеме бензодиазепинов наблюдается токсическое действие на организм, возможно развитие психической зависимости. Альтернативой бензодиазепинам могут служить пептиды, обладающие анксиолитическим действием. Исследования в области технологии их получения ведутся в различных научных центрах, однако, до сего момента не удалось добиться продолжительности действия, что связано с их разрушением протеазами крови, и стабильности во внешней среде. Для защиты пептидов возможно применение наноразмерных носителей.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Синтез проводили на пептидном синтезаторе фирмы Applied biosystems ABI 433A фирмы Applied Biosystems с использованием Fmoc стратегии. Для синтеза использовались преднагруженные смолы, которые несли на себе присоединенную С-концевую аминокислоту пептидной последовательности, что обеспечивало получение пептида с кислотным остатком на С-конце. В случае использования амидных смол получали пептид с амидированным С-концом. Изменение параметров и фиксация результатов синтеза осуществлялось при использовании программного обеспечения SynthAssist. Конечным продуктом синтеза являлся лиофилизированный пептид.

Наночастицы получали при помощи модифицированной методики анионной полимеризации в водной среде. Биodeградируемые полимеры: бутилцианоакрилат и сульфакрилат диспергировали в водной среде, добавляли рассчитанное количество 0,1 М раствора натрия гидроксида, получая частицы, размером 100 – 150 нм ( ) Полученные наночастицы лиофилизировали, затем к лиофилизату добавляли изотонический раствор и перемешивали до получения суспензии молочного цвета. К суспензии добавляли полученный пептид,

растворенный также в изотоническом растворе. Полученные смеси инкубировали с ПС-80 в течение 1,5 часов при пониженной температуре.

Анализ структуры и чистоты пептидов, а также идентификацию их в наночастицах проводили методом жидкостной хроматографии с масс-спектрометрическим детектором на аналитической колонке путем измерения времени задержки для главного пика, которое затем сравнивалось с расчетным, на приборе Mass Spec Model LCQ/LCQ Advantage. Пробы растворяли в смеси ацетонитрил: тетрагидрофуран:вода в соотношении 40:40:20 и анализировали методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием. полученных средств поводили методом

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В ходе исследований была разработана технологическая схема получения наносомальных лекарственных форм пептидов анксиолитического действия, на основе полимеров бутилцианоакрилата и сульфакрилата. Размер бутилцианоакрилатных частиц с сорбированным пептидом составляет  $230 \pm 23$  нм, размер сульфакрилатных частиц с сорбированным пептидом составляет  $310 \pm 17$  нм.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены наносомальные лекарственные формы пептидов анксиолитического действия.

# ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ НАНОФАРМАКОЛОГИИ

**Н.Л. ШИМАНОВСКИЙ**

Кафедра молекулярной фармакологии и радиобиологии  
Российского государственного медицинского университета

В последние годы стало популярным представление о том, что в ближайшем будущем будет создана новая медицина, основанная на использовании наночастиц в качестве лекарственных средств. Однако сегодняшний интерес к нанотехнологиям в фармакологии связан не столько с геометрическими размерами, сколько с новыми способами получения и использования лекарственных средств с помощью методов нанотехнологии. При этом эти методы могут носить как прикладной характер, например методы получения липосомальных лекарственных форм или нанонизированных лекарственных форм, так и поисковый характер, что гораздо интереснее, поскольку находится в области пока еще неапробированных междисциплинарных методов создания потенциальных лекарственных средств с принципиально новыми видами биологической активности. С нашей точки зрения в фармакологии такие поисковые работы могут дать наиболее быстрые результаты в таких классах наночастиц как фуллерены и металлы.

Повышенный интерес исследователей к наночастицам оксида железа вызван обнаружением у них необычных физико-химических и электромагнитных свойств, связанных с проявлением квантово-размерных эффектов и возрастающей ролью поверхностных атомов. Эти свойства обусловлены соизмеримостью геометрического размера наночастицы с величиной магнитного домена, а также с длинами де-бройлевских волн распространяющихся в них электронов, фононов или экситонов.

Магнитные свойства наночастиц определяются многими факторами, среди которых химический состав, тип и структура кристаллической решетки, размер и форма частиц, взаимодействие частиц с окружающей матрицей и друг с другом. Изменяя размеры, форму, состав и строение наночастиц, можно в определенных пределах управлять магнитными характеристиками наноматериалов.

Основным преимуществом оксидов железа - это высокая стабильность коллоидного раствора, высокоэффективная поверхность наночастицы, которая позволяет связывать различные лиганды. Движением таких наночастиц можно управлять посредством наложения внешнего магнитного поля и локализовать их в необходимой области или органе. Это касается как процесса доведения, лекарственного препарата до определенного органа, так и удержания его в этом органе. Магнитные оксиды железа магнетит  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  и маггемит гамма-

$\text{Fe}_2\text{O}_3$  представляют интерес в качестве контрастных средств для магнитно-резонансной томографии, доставки лекарств и сепарации биологических материалов. В зависимости от размера наночастицы оксида железа разделяют на 2 основные группы:

1) Суперпарамагнитные частицы оксиды железа (СЧОЖ), имеющие гидродинамический размер (включающий материал, покрывающий оксид железа) больше 50 нм. Эти частицы поглощаются системой мононуклеарных фагоцитов. Такие частицы содержат препараты Эндорем® и Резовист® , которые применяют в качестве МРКС для внутривенного введения с целью контрастирования опухолей и метастазов в печени.

2) Ультрамаленькие суперпарамагнитные частицы оксида железа (УСЧОЖ), имеющие гидродинамический размер (включающий материал, покрывающий оксид железа) меньше 50 нм. После внутривенного введения они длительно циркулируют в кровеносном русле, так как устойчивы к процессу интернализации. УСЧОЖ состоят из ядра оксида железа с размером менее 10 нм. Ферумоксатран-10 имеет маленький гидродинамический диаметр (15–30 нм), что позволяет проникнуть УСЧОЖ до макрофагов, находящихся в глубине тканей, таких как лимфатические узлы, почки, головной мозг, суставы. Другие УСЧОЖ, такие как ферукарботран (очень маленькие суперпарамагнитные частицы оксида железа) в большей степени поглощаются печенью, имеют высокий кровяной клиренс и с трудом проникают в более глубокие компартменты. В противоположность этому фуруглоза (Clariscan®) вследствие пегилирования покрывающего оксид железа материала, относится к истинным невидимым наночастицам (“stealth nanoparticles”) и с трудом распознаются макрофагами. Присоединяя к покрывающему материалу специфические лиганды, например, октреотид, можно создавать УСЧОЖ с направленным транспортом к опухолевым клеткам, например к опухолям молочной железы, которые имеют повышенное количество соматостатиновых рецепторов.

Согласно технологии получения наночастиц, дисперсность наночастиц характеризуется наличием двух процессов: образованием новых зародышей наночастиц и ростом размера, ранее образовавшихся частиц, скорость обоих процессов является функцией пересыщения раствора. Этим объясняется тот факт, что в полученных коллоидных растворах наблюдается одновременное существование двух фракций наночастиц по размеру. Для получения устойчивого

коллоидного раствора необходимо, чтобы наночастицы не соединялись друг с другом и имели гидратные оболочки, вводят различные виды стабилизаторов или поверхностно-активных веществ. В качестве стабилизаторов в данной работе использовали лимонную кислоту и декстран. Дисперсный состав наночастиц в полученных растворах изучался при помощи просвечивающего электронного микроскопа высокого разрешения JEOL JEM-1011, а для расчета распределения наночастиц по размеру использовали программу Scan Soft 2000.

Магнитные свойства полученных коллоидных растворов, содержащие наночастицы оксидов железа, изучались методом ЭПР спектроскопии. Для измерения спектров ЭПР использовали спектрометр, типа E-4 фирмы "Varian", в котором при постоянной частоте, условие резонанса достигалось путем изменения напряженности магнитного поля. Электромагнитное излучение сверхвысокой частоты равной 9,4 ГГц, генерируемое клистроном, по волноводам поступает в объемный резонатор, расположенный между полюсами электромагнита. В этот объемный резонатор помещался исследуемый образец, объемом 70 мкл.

Возможности полученных наночастиц оксида железа влиять на относительный контраст тканей определяли с помощью МРТ (Брукер, 7,0 Т) после внутривенного введения крысам препарата в объеме 0,1 мл, при стандартной концентрации.

Концентрацию железа в полученном препарате определяли с помощью рентгенофлуоресцентного анализа на спектрометре S4 EXPLORER (Брукер).

Поскольку магнитный момент наночастиц сильно реагирует на изменение магнитного поля (большая интенсивность спектра ЭПР), то можно сказать, что полученные наночастицы обладают суперпарамагнитными свойствами. С увеличением размера наночастиц происходит уменьшение парамагнитных свойств исследуемых растворов и сдвиг резонансного значения величины индукции магнитного поля в сторону больших значений.

В результате проведенных экспериментов в нашей лаборатории получен стабильный коллоидный раствор на основе суперпарамагнитных частиц оксида железа со средним диаметром наночастиц около 8 нм. Показано, что данные наночастицы оксида железа сохраняют свои магнитные свойства и при разведении 1:1000, позволяя визуализировать сосуды и анатомические особенности внутренних

органов экспериментальных животных при проведении МРТ. Полученные наночастицы рекомендованы для создания лекарственной формы нового магнитно-резонансного контрастного средства.

Нанофармакология, как часть наномедицины, в ближайшие десятилетия, благодаря созданию наночастиц с диагностическими и терапевтическими свойствами, а также наличию адресных молекул, определяющих направленный транспорт, будет во многом определять прогресс диагностики и лечения многих социально значимых заболеваний.

ВСЕРОССИЙСКАЯ НАУЧНАЯ ШКОЛА ДЛЯ МОЛОДЕЖИ

## **НАНОМЕДИЦИНА И НАНОТОКСИКОЛОГИЯ**

(сборник тезисов и статей)



Издательство ООО «МДВ»

Подписано в печать 03.11.2009. Формат 60x90/16

Печать офсетная. Усл. печ. л. 2

Тираж 300 экз.