

Нанофармакология: биохимические ОСНОВЫ, достижения и перспективы.

СТРУКТУРА УЧЕБНОГО СОДЕРЖАНИЯ

1. Определение
2. Общие принципы направленной доставки лекарственных препаратов
3. Направленная доставка в миокард
4. Наночастицы кремнезема
 - 4.1. Влияние наночастиц кремнезема на гемодинамические и биохимические параметры
 - 4.2. Биораспределение наночастиц кремнезема
 - 4.3. Вопросы безопасности наночастиц кремнезема
5. Направленная доставка в миокард с помощью наночастиц кремнезема
6. Направленная доставка с помощью магнитных наночастиц
8. Дилемма направленной доставки препаратов



ОПРЕДЕЛЕНИЕ



Определение

Нанофармакология - раздел фармакологии, изучающий механизмы действия, биологические эффекты и фармакокинетику нанолекарств

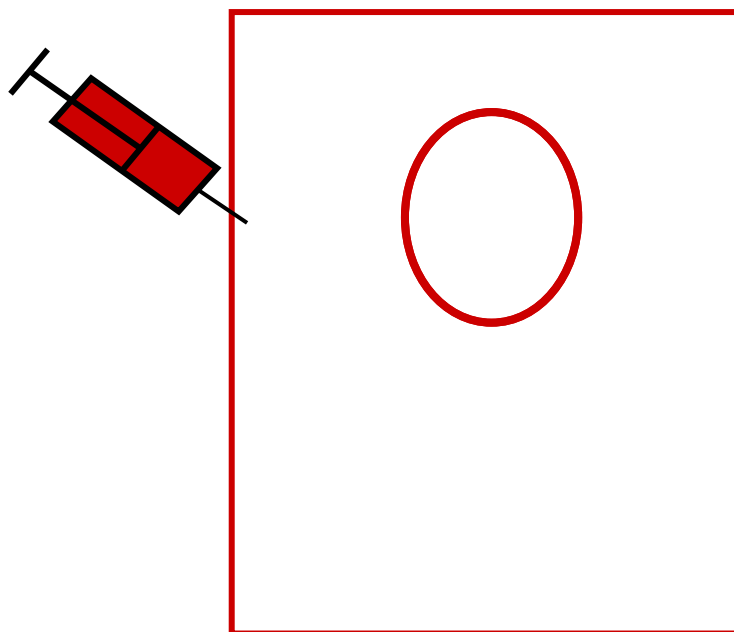


ОБЩИЕ ПРИНЦИПЫ НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ



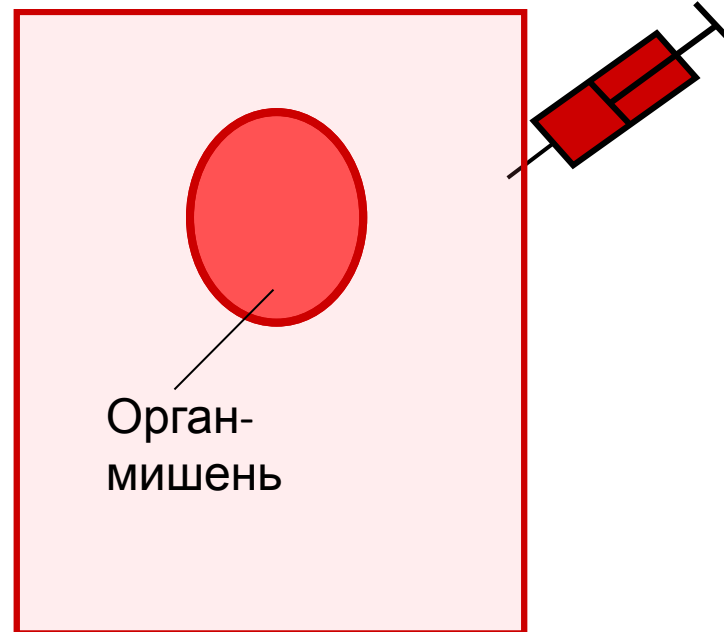
Эффект направленной доставки

**Системное введение
лекарственного препарата**



Большой объем
распределения лекарства
↓
воздействие на системные
механизмы заболевания

**Направленная доставка
лекарственного препарата**



Уменьшение объема
распределения лекарства
↓
направленная доставка

Преимущества направленной доставки

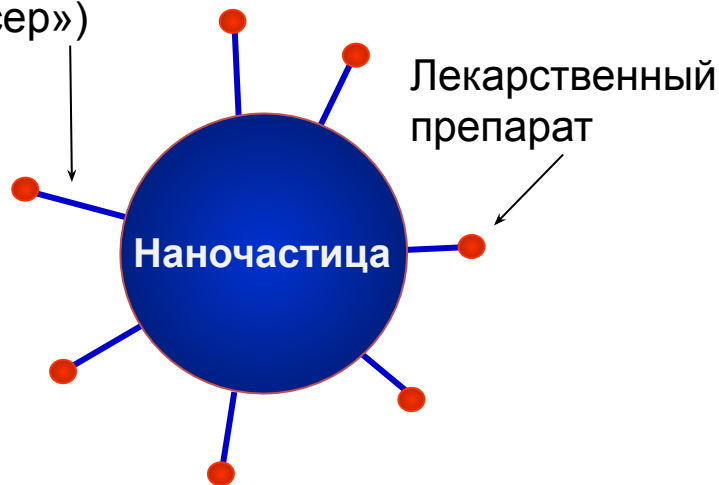
Направленная доставка лекарственных препаратов с помощью наночастиц имеет целый ряд существенных преимуществ:

- ✓ Уменьшение объема распределения препаратов;
- ✓ Снижение системной токсичности препаратов;
- ✓ Повышение растворимости гидрофобных препаратов;
- ✓ Повышение стабильности препаратов (белки, пептиды, олигонуклеотиды);
- ✓ Улучшение биосовместимости.

Пассивный и активный механизмы направленной доставки

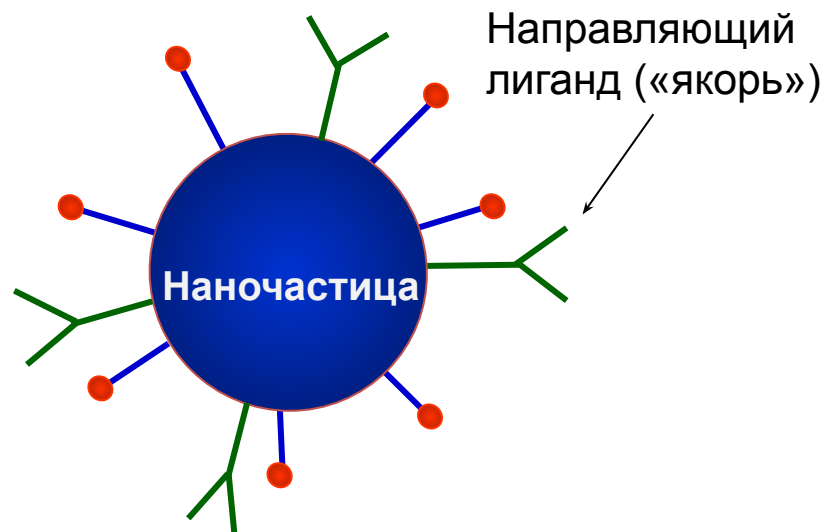
Пассивный механизм

Молекула-вставка
(«спейсер»)



Наночастицы с лекарством выходят за пределы сосудистого русла преимущественно в зонах повышенной проницаемости сосудов

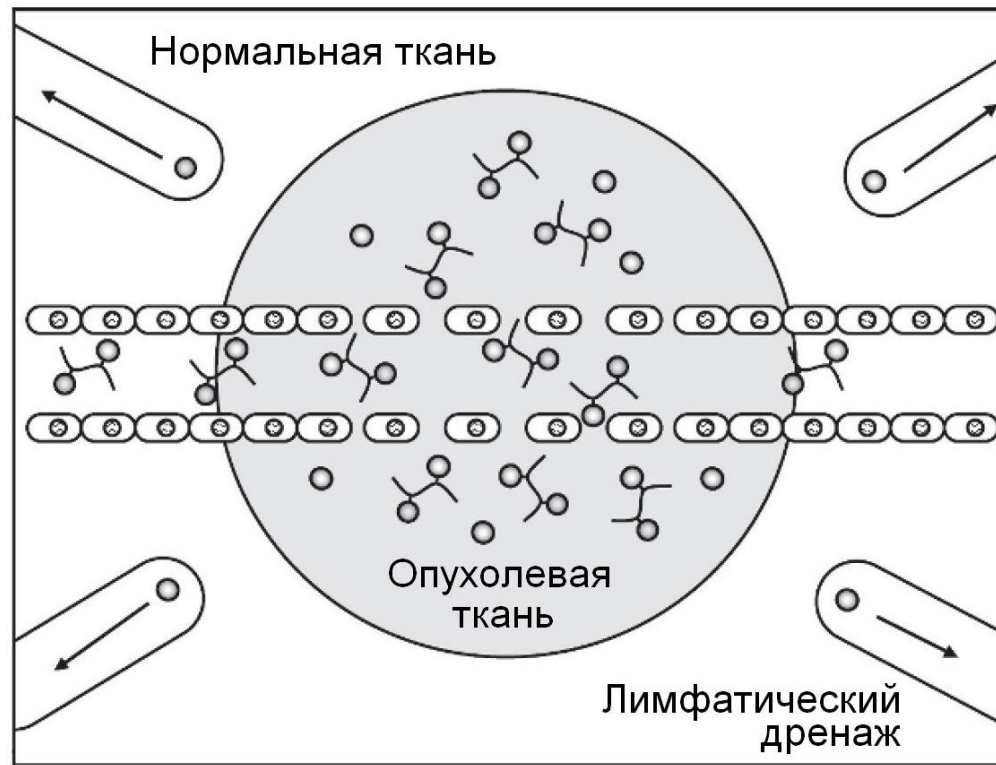
Активный (таргетный) механизм



Накопление наночастиц с лекарством в зоне интереса за счет специфического связывания лиганда и маркера повреждения

Пассивная направленная доставка

Ключевую роль в пассивной направленной доставке лекарственных препаратов играет повышенная проницаемость микрососудов (Matsumura Y., Maeda H., 1986), например, опухолевых.



Основные типы направляющих лигандов для таргетной доставки лекарств

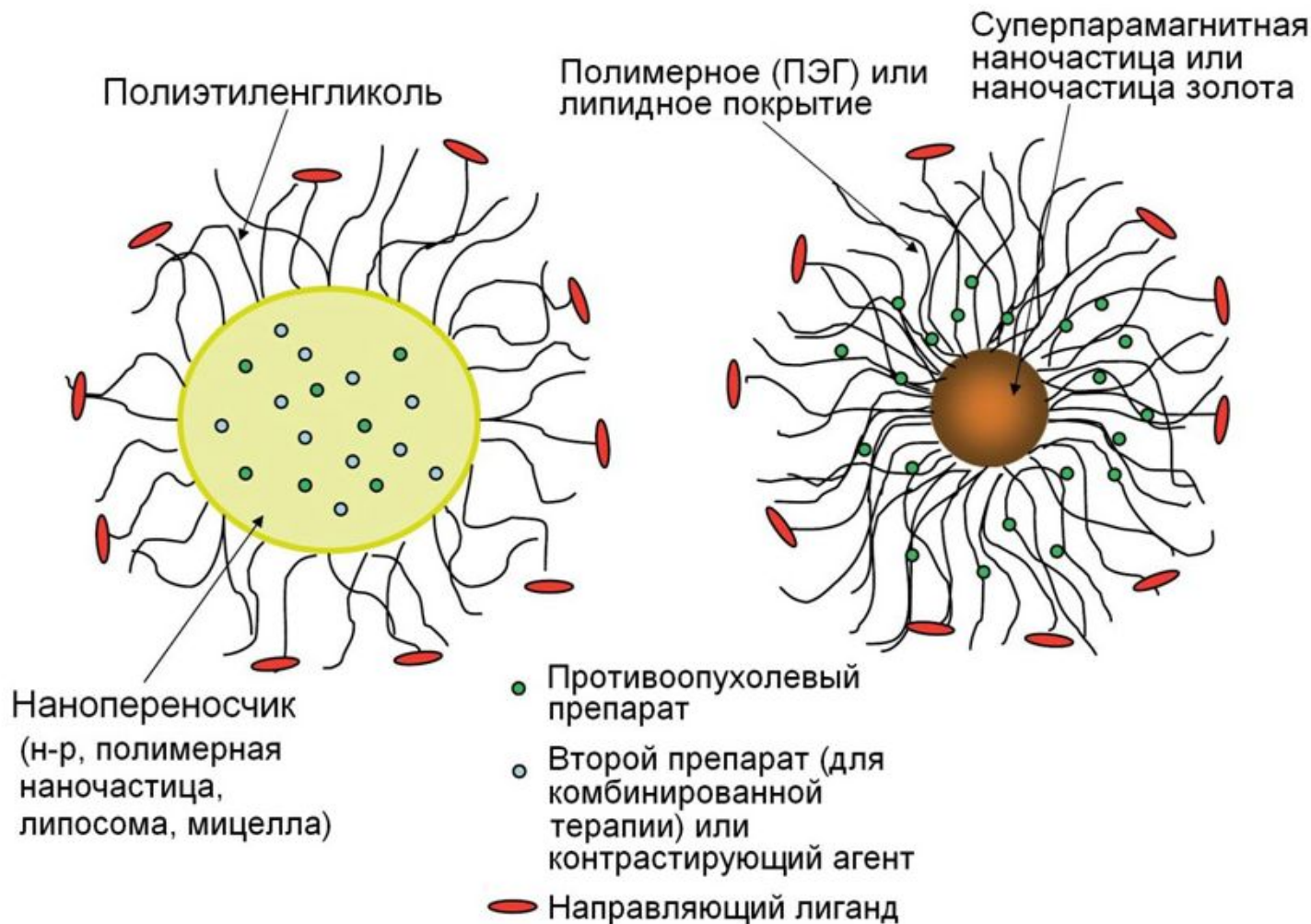
- Моноклональные антитела
- Антиген-распознающие фрагменты антител (Fab-фрагменты, одноцепочечные вариабельные фрагменты, наносомы)
- Аптамеры (олигонуклеотиды)
- Пептиды
- Низкомолекулярные соединения (фолиевая кислота)



Примеры активной направленной доставки

- Доставка упакованного в липосомы сосудистого эндотелиального фактора роста (VEGF) за счет присоединения к поверхности липосом моноклональных антител против P-селектина
- Доставка в миокард АТФ с помощью липосом, имеющих на своей поверхности моноклональные антитела против миозина

Примеры бифункциональных наночастиц для диагностики и терапии опухолей



Направленная доставка в онкологии: текущие клинические исследования

Соединение	Название	Показания	Статус
Липосомальный цисплатин	SPI-77	Рак легкого	Фаза II
Термочувствительный липосомальный доксорубицин	ThermoDox	Рак молочной железы, рак печени	Фаза I
Цисплатин-содержащие полимерные мицеллы	Nanoplatin	Различные злокачественные опухоли	Фаза I
Доксорубицин-содержащие полимерные мицеллы	NK911	Различные злокачественные опухоли	Фаза I
Конъюгаты полиглутамата и паклитаксела	Xyotax	Рак легкого, рак яичника	Фаза III
Альбумин-метотрексат	MTX-HSA	Рак почки	Фаза II

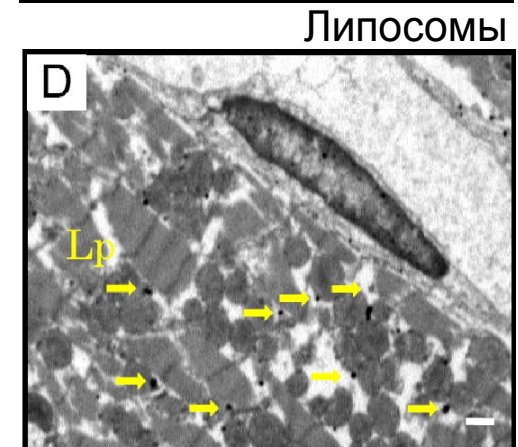
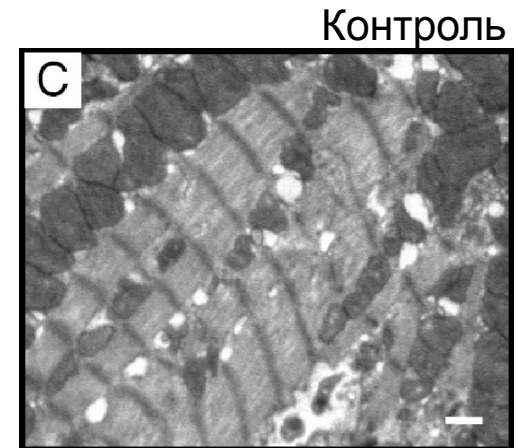
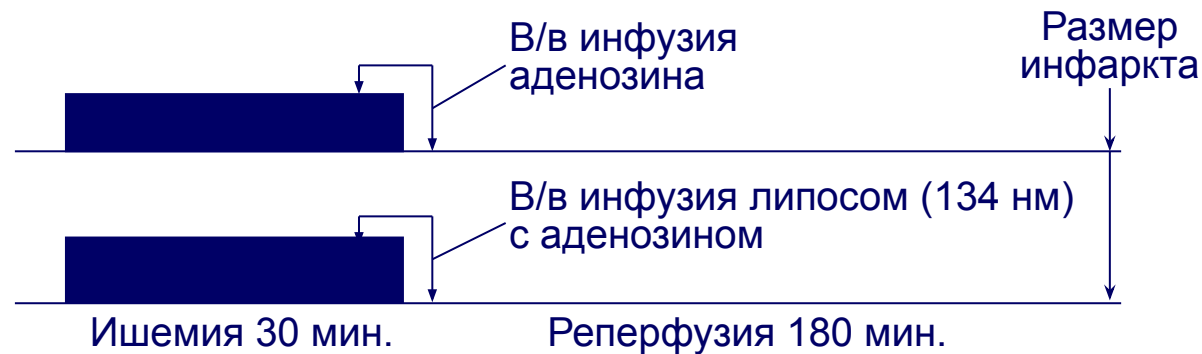


НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА В МИОКАРД



Пассивная направленная доставка в поврежденный миокард

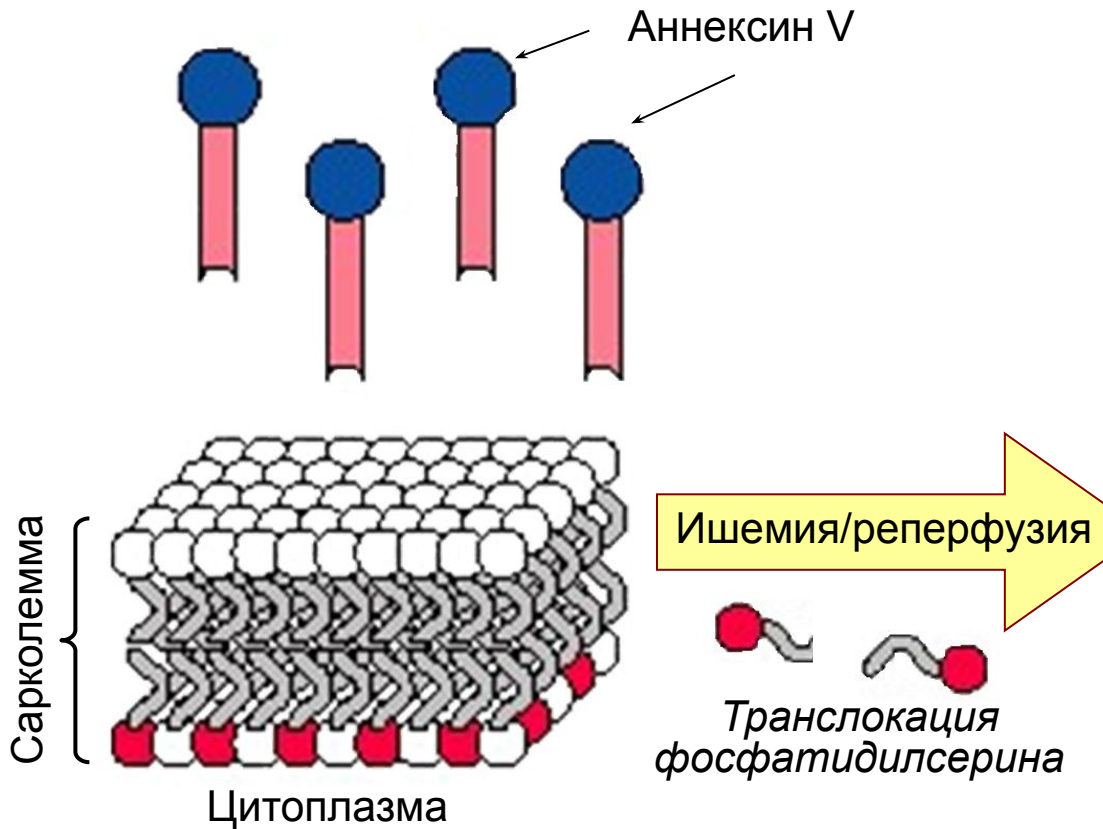
Протокол и результаты первого опубликованного исследования пассивной направленной доставки в миокард после ишемии (*Takahama H. et al., 2009*)



- Введение липосомального аденозина сопровождалось:
- ✓ Накоплением липосом в зоне риска (область некроза и пограничная зона);
 - ✓ Менее выраженными побочными гемодинамическими эффектами;
 - ✓ Более выраженным инфаркт-лимитирующим эффектом

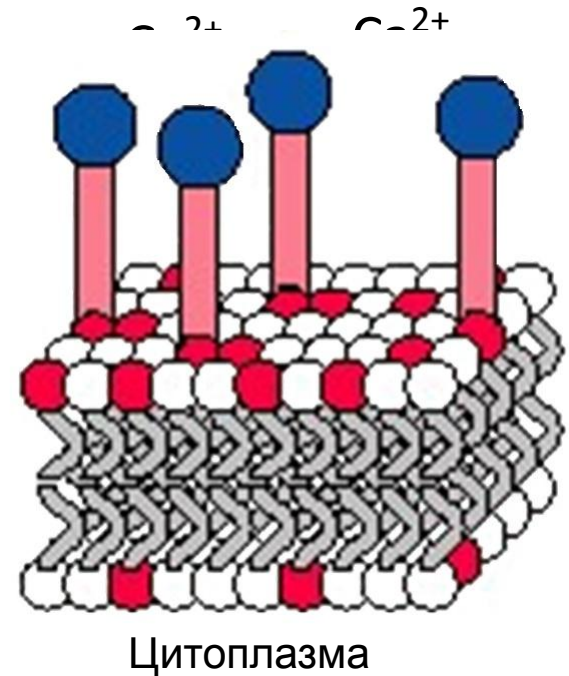
Патологические изменения в ишемизированном миокарде

Норма



Обратимое повреждение

Специфическое связывание аннексина V с сарколеммой

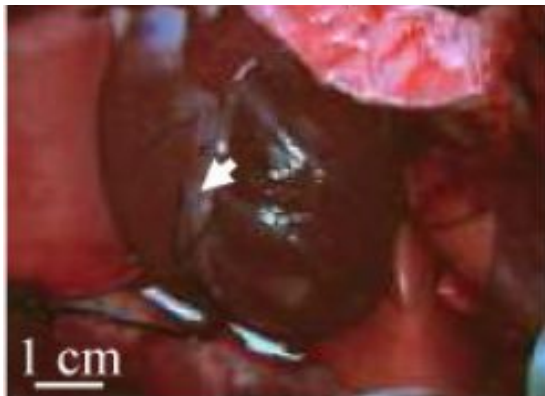
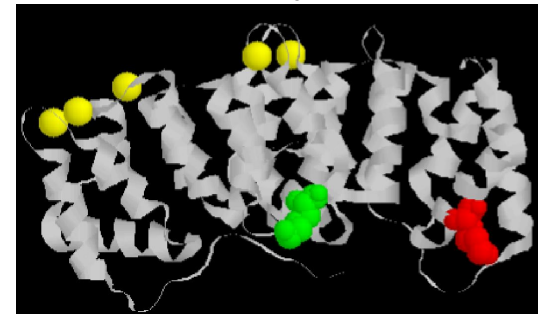


Предпосылки к активной направленной доставки в ишемизированный миокард

В исследовании *Ohnishi S. et al., 2006*:

- ✓ Был синтезирован конъюгат аннексина V с молекулой-флуорофором
- ✓ Была разработана модель регионарной ишемии/реперфузии миокарда у собак
- ✓ Флуоресценция конъюгата аннексина V была оценена спустя 30 минут после его внутривенного введения животным

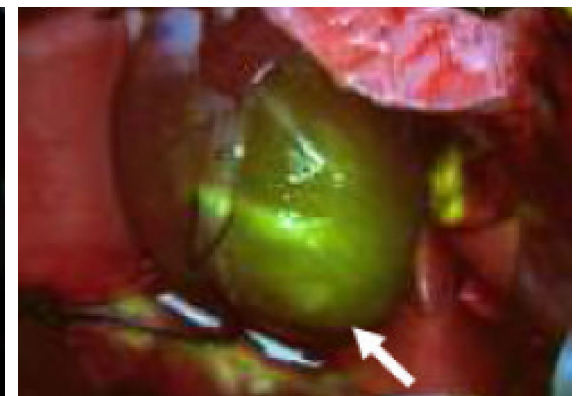
Конъюгат аннексина V с флуорофором



Видимый свет

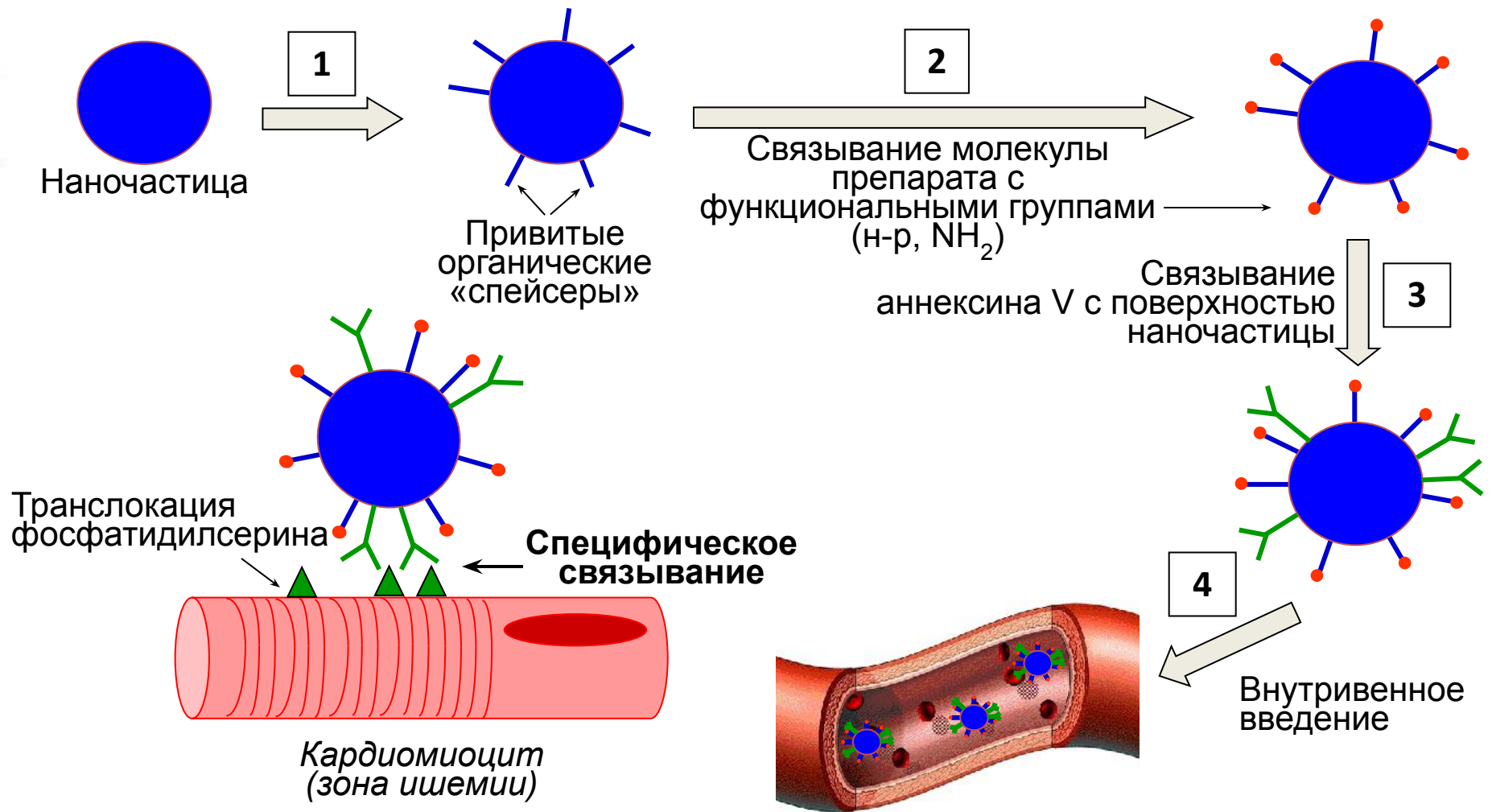


ИК излучение (800 нм)



Совмещение

Алгоритм активной направленной доставки препаратов в миокард

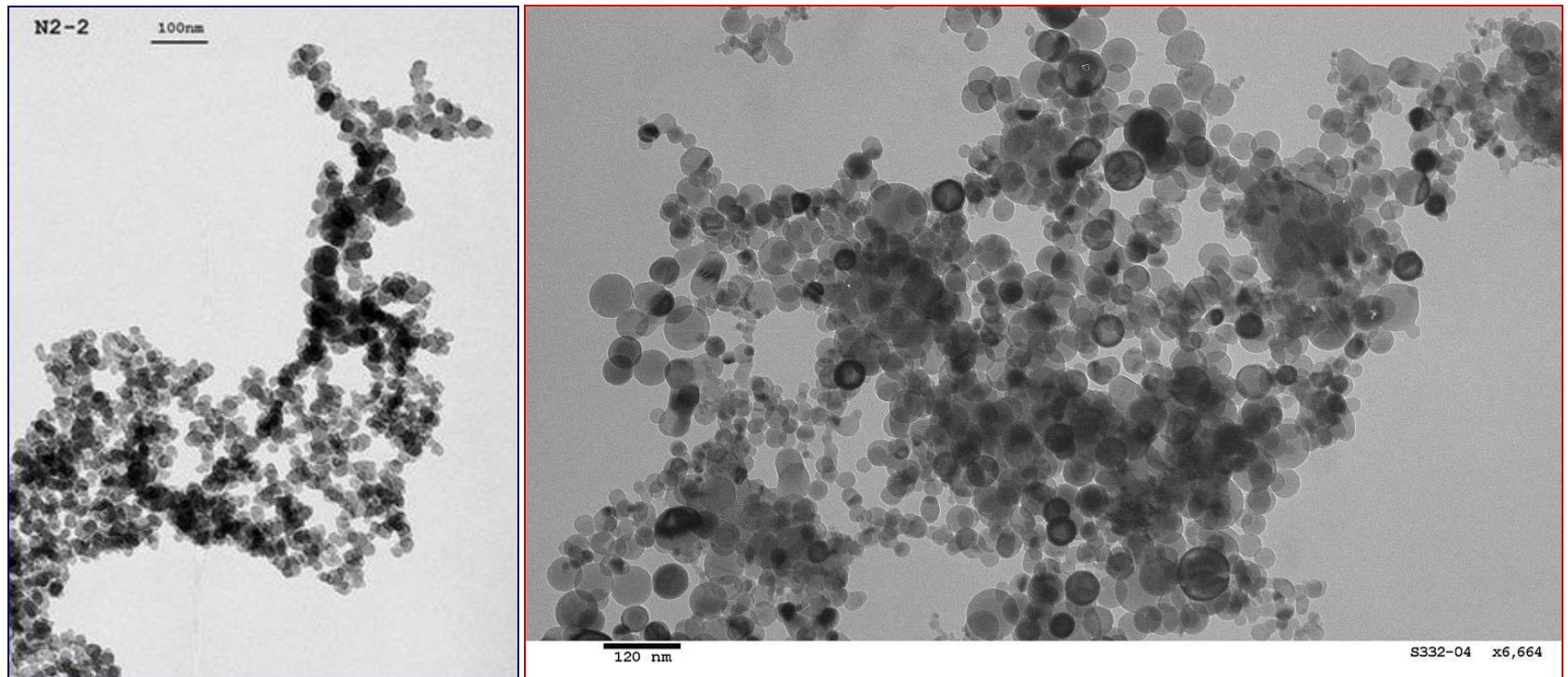


НАНОЧАСТИЦЫ КРЕМНЕЗЕМА



Наночастицы кремнезема

Морфологию наночастиц кремнезема (НЧК) можно исследовать с помощью просвечивающей электронной микроскопии:



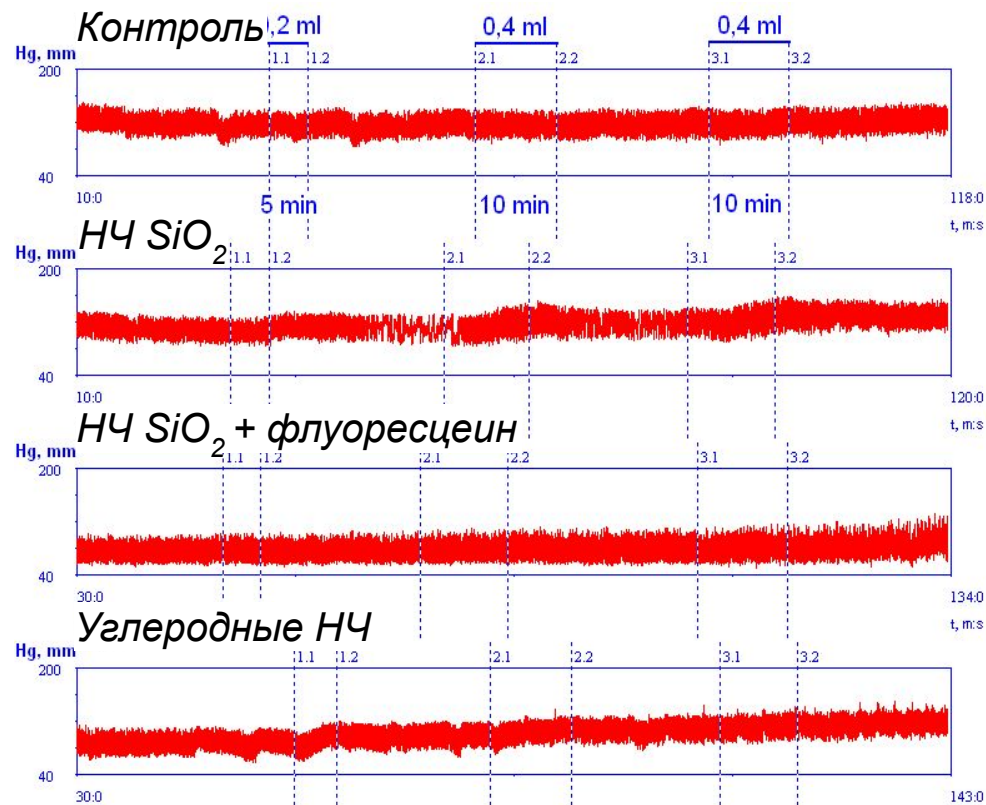
- ✓ удельная поверхность наночастиц кремнезема - $600-700 \text{ м}^2/\text{г}$
- ✓ диаметр наночастиц кремнезема - $7-20 \text{ нм}$

1. Влияние наночастиц кремнезема на гемодинамические и биохимические параметры



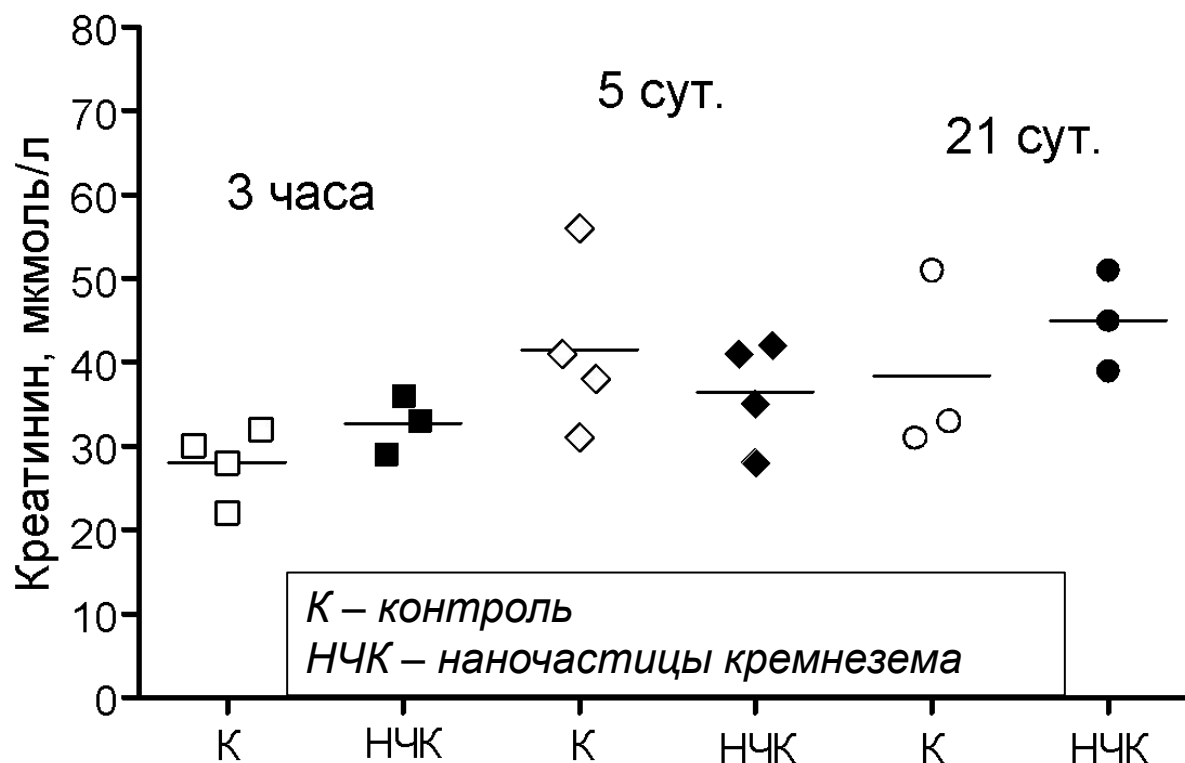
Влияние наночастиц кремнезема на артериальное давление

В исследовании *Galagudza M. et al., 2010* установлено, что внутривенное введение суспензий углеродных и кремнеземных наночастиц животным не оказывает существенного влияния на гемодинамические показатели, что косвенно свидетельствует о хорошей биосовместимости использованных носителей.



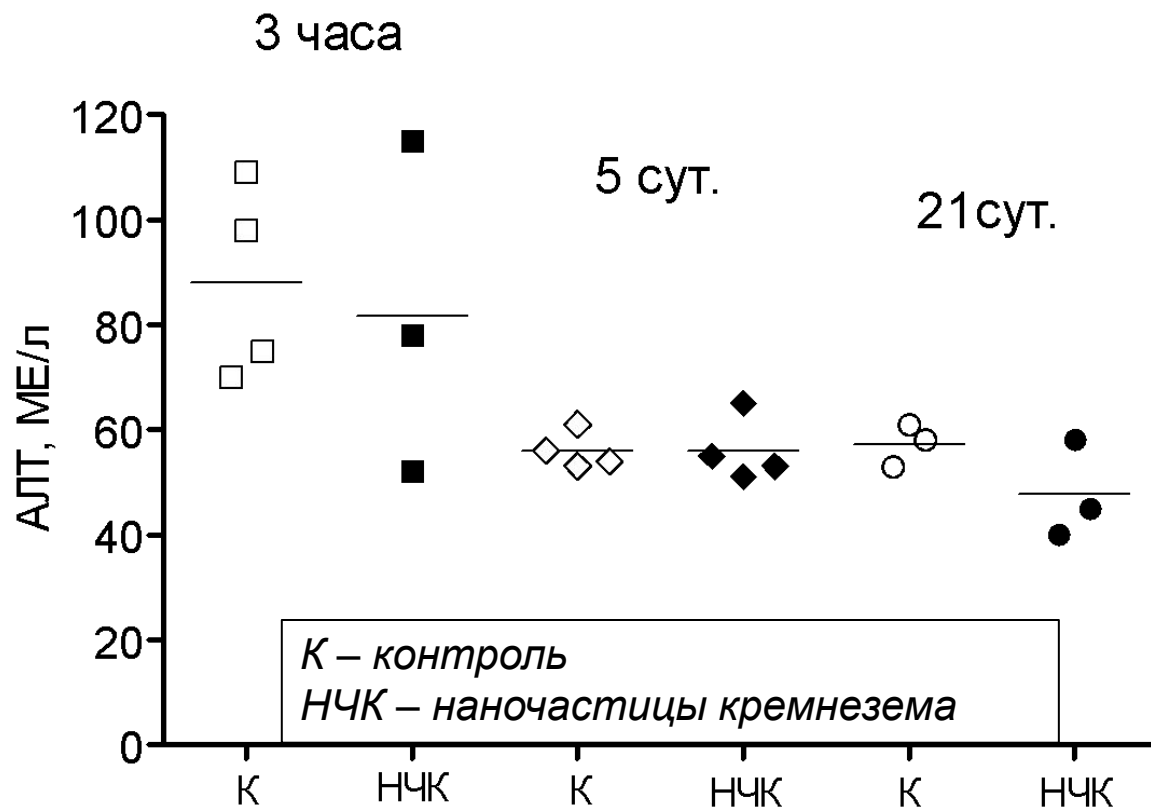
Влияние наночастиц кремнезема на уровень креатинина

Результаты оценки влияния внутривенной инфузии наночастиц кремнезема на уровень креатинина в плазме крови животных:



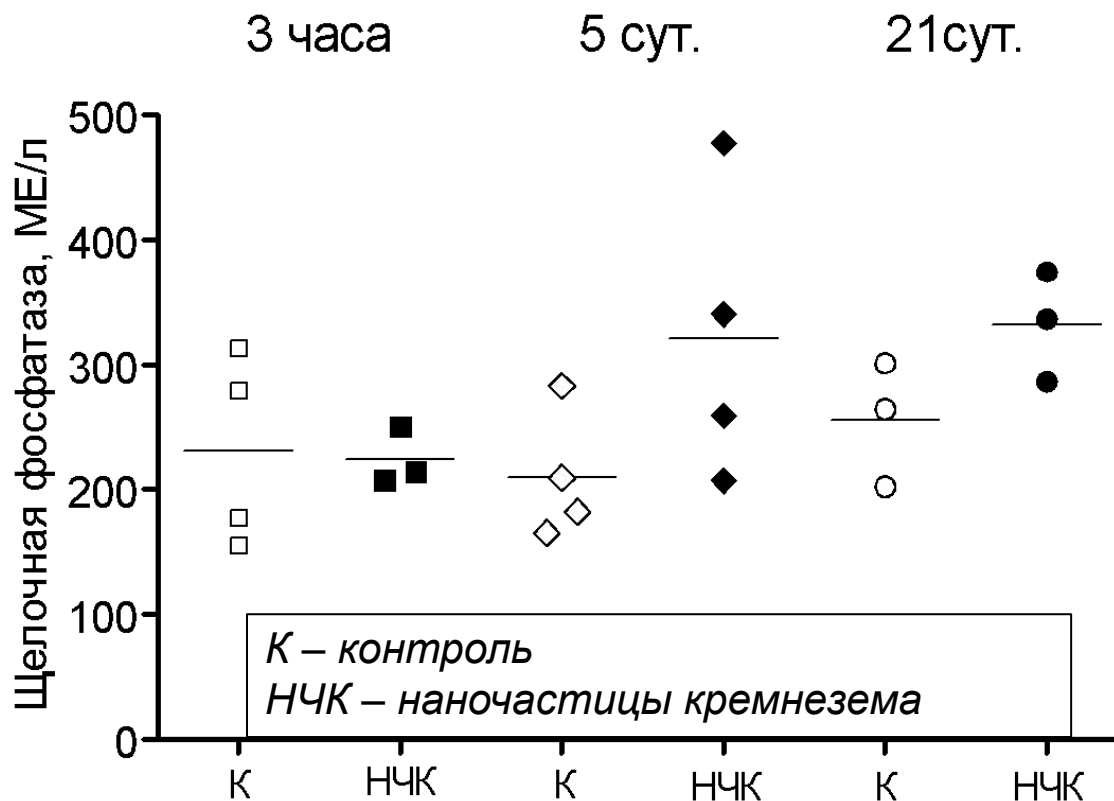
Влияние наночастиц кремнезема на уровень аланинаминотрансферазы

Результаты оценки влияния внутривенной инфузии наночастиц кремнезема на уровень аланинаминотрансферазы в плазме крови животных:



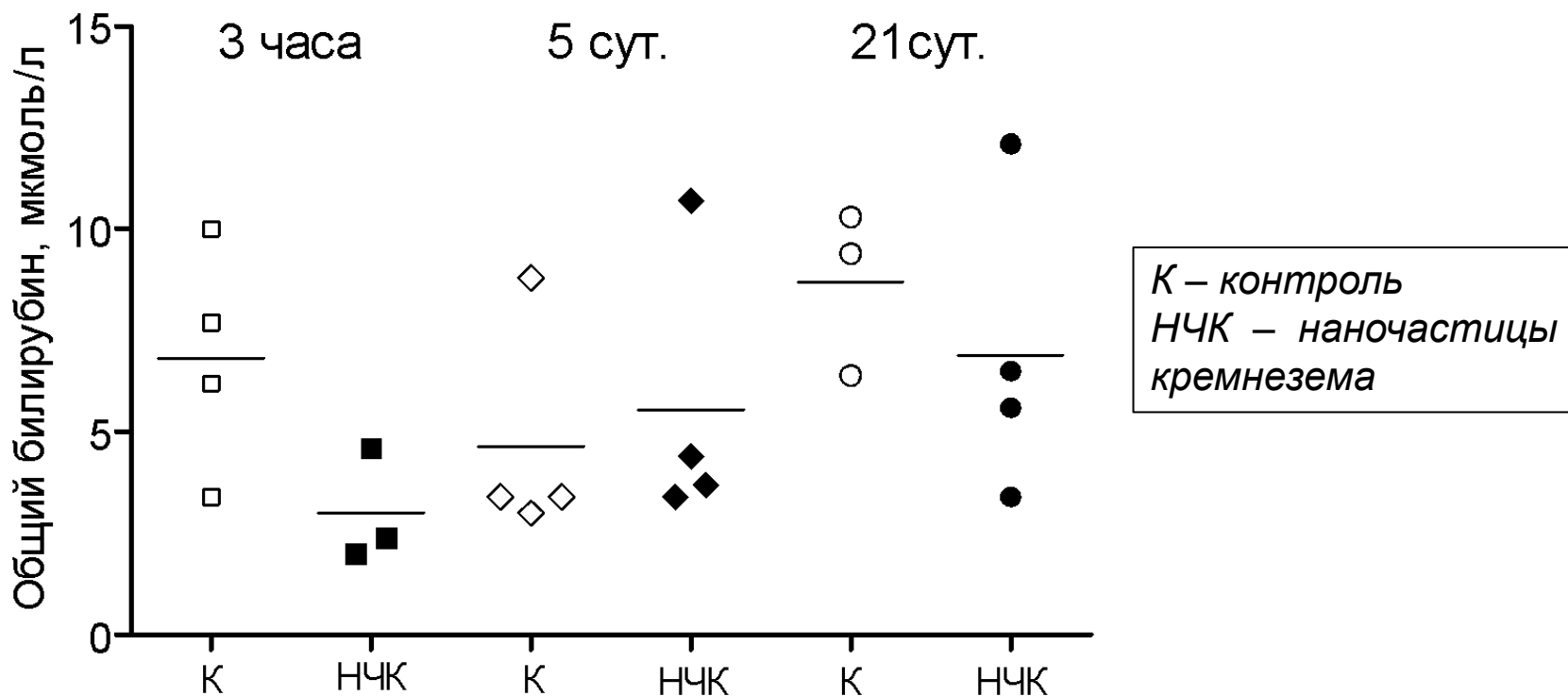
Влияние наночастиц кремнезема на уровень щелочной фосфатазы

Результаты оценки влияния внутривенной инфузии наночастиц кремнезема на уровень щелочной фосфатазы в плазме крови животных:



Влияние наночастиц кремнезема на уровень общего билирубина

Результаты оценки влияния внутривенной инфузии наночастиц кремнезема на уровень общего билирубина в плазме крови животных:

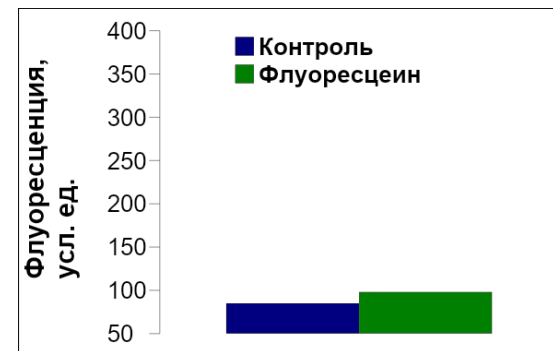
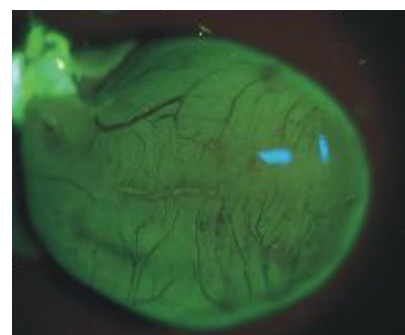
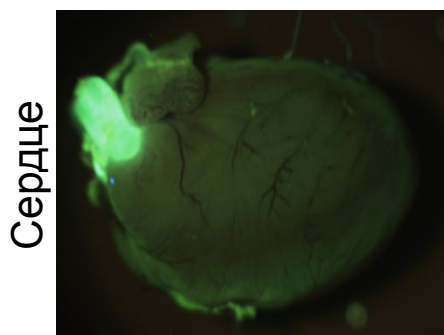
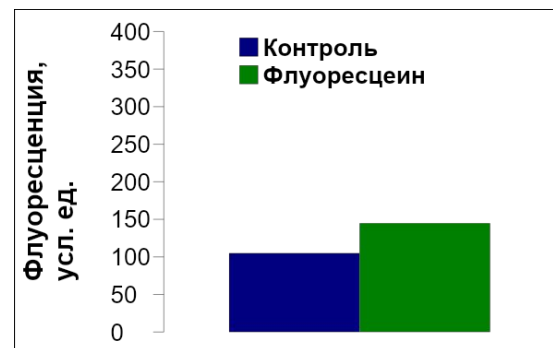
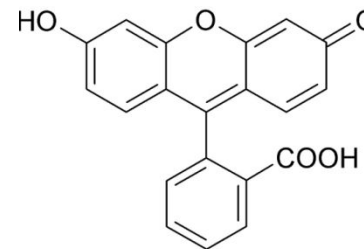


2. Биораспределение наночастиц кремнезема



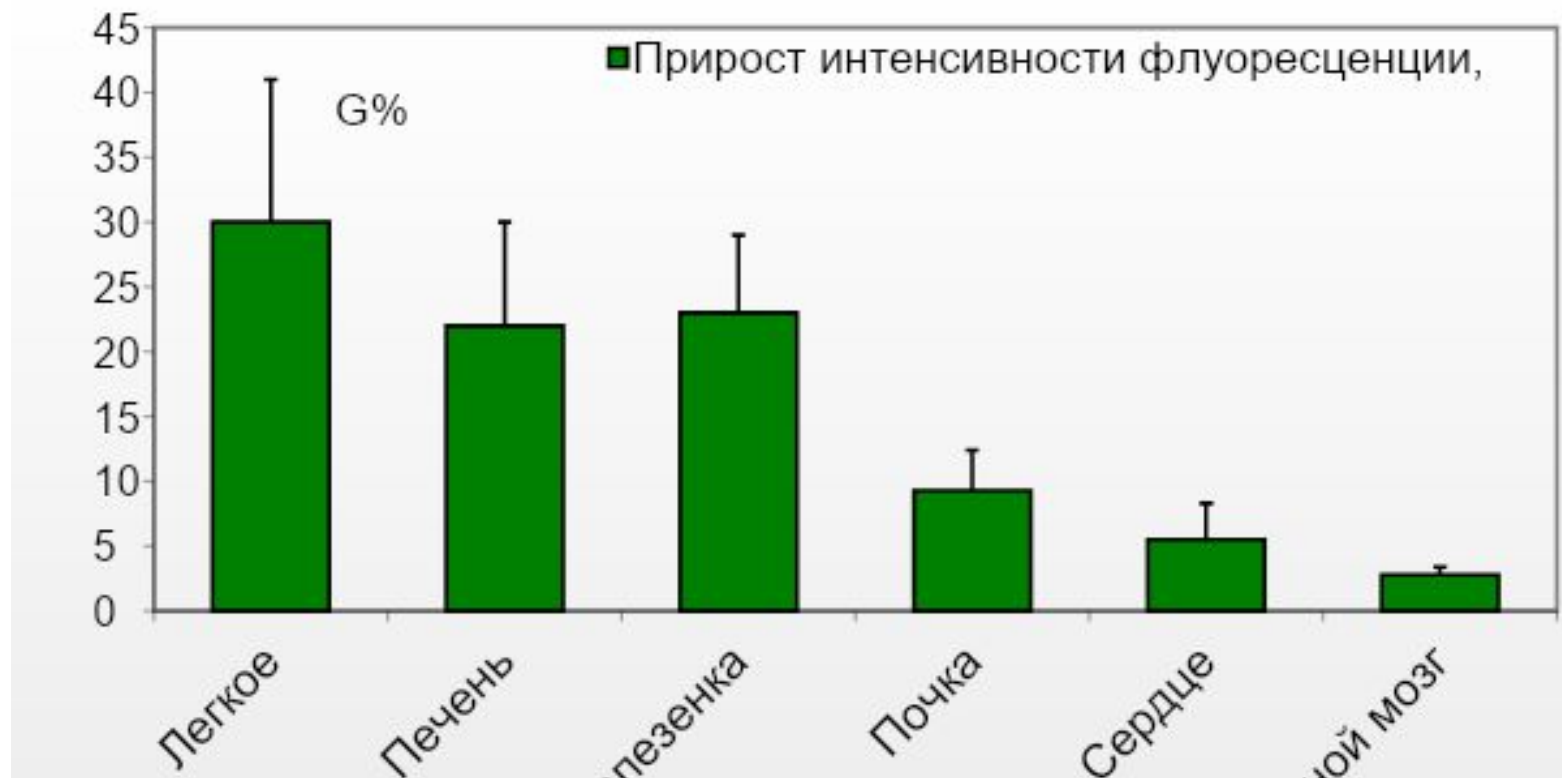
Биораспределение наночастиц кремнезема

Для оценки биораспределения наночастицы кремнезема конъюгировались с флуоресцентным красителем флуоресцеином ($\lambda_{\text{max адсорбции}} = 494 \text{ нм}$)



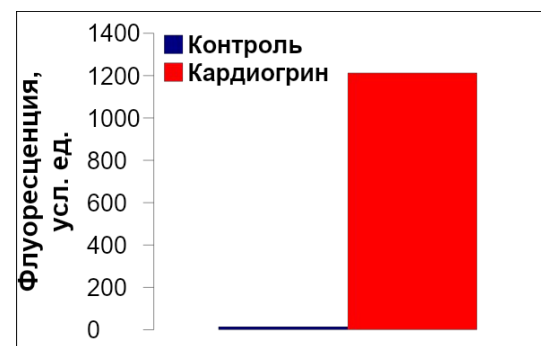
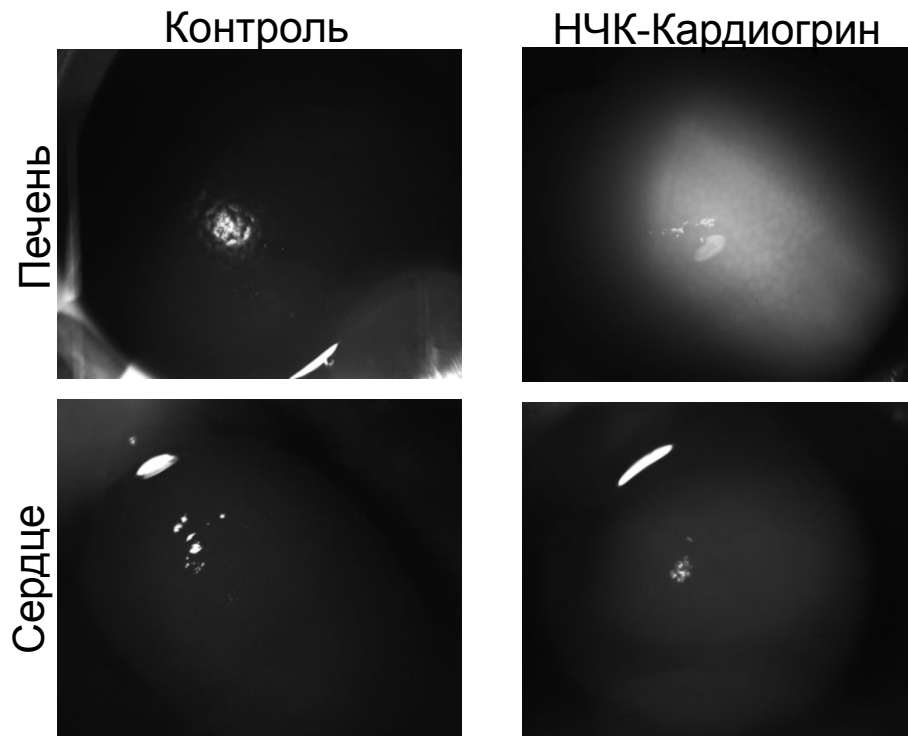
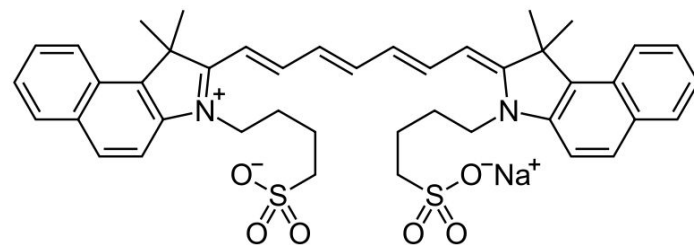
Биораспределение наночастиц кремнезема с флуоресцеином

Естественное биораспределение наночастиц кремнезема, модифицированных кремнеземом через 30 минут после внутривенного введения оценивалось методом оптической флуоресценции:



Биораспределение наночастиц кремнезема с кардиогрином

Для оценки биораспределения наночастицы кремния конъюгировались с флуоресцентным красителем кардиогрином ($\lambda_{\text{max адсорбции}} = 780 \text{ нм}$)



3. Вопросы безопасности наночастиц кремнезема



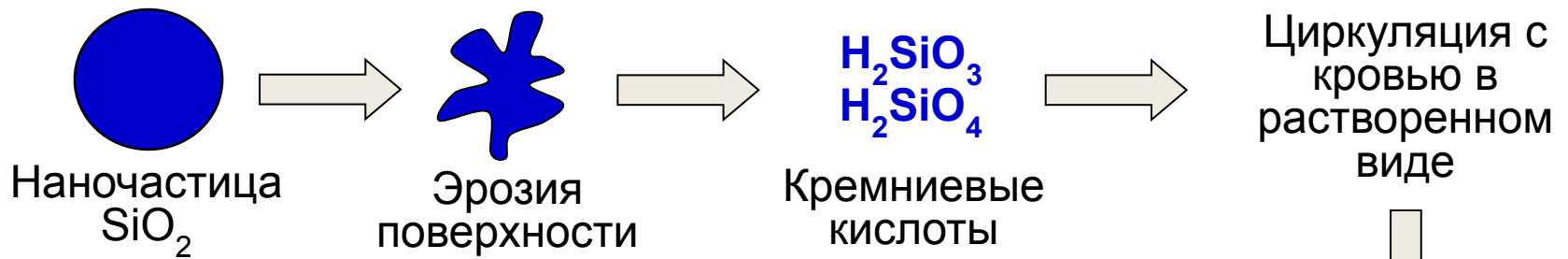
Вопросы безопасности наночастиц кремнезема

□ Так как экспериментальные исследования показали, что наночастицы кремнезема способны неселективно накапливаться в различных органах, необходимо было выяснить:

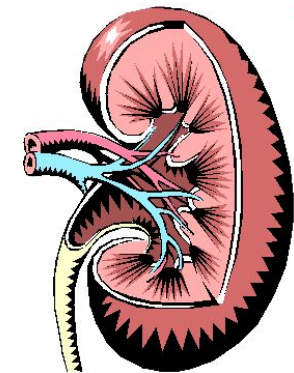
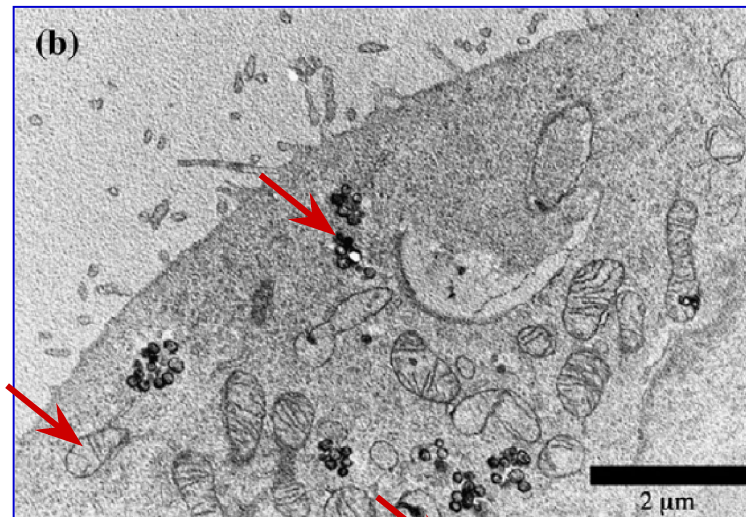
- ✓ не может ли накопление наночастиц кремнезема вызывать какие-либо побочные эффекты
- ✓ способны ли наночастицы кремнезема деградировать в организме и выводиться из него

□ Иными словами был поставлен вопрос о биосовместимости и биodeградируемости наночастиц кремнезема.

Схема распада наночастиц кремнезема в организме



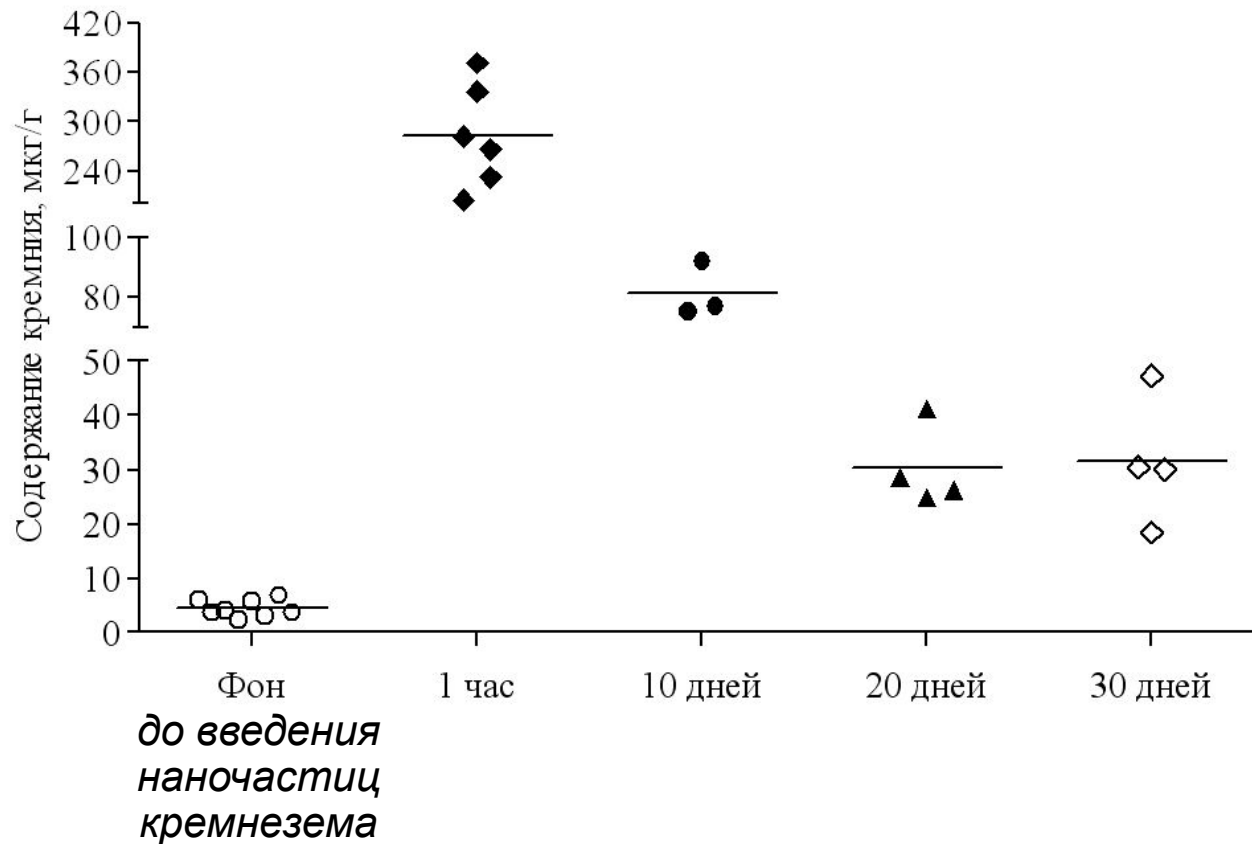
Эндоцитоз наночастиц кремнезема SiO_2 клетками линии HeLa



Экскреция с мочой

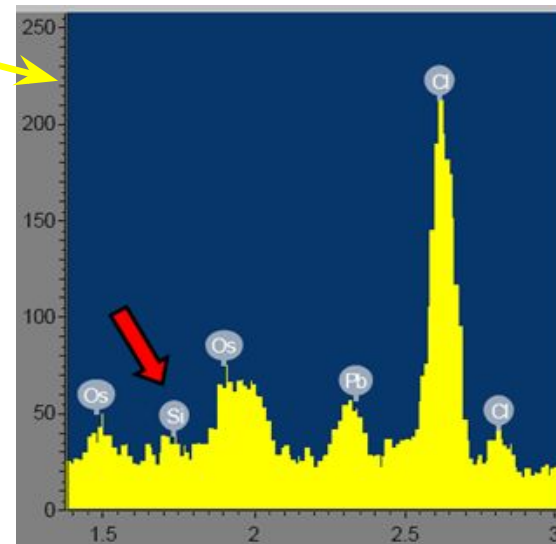
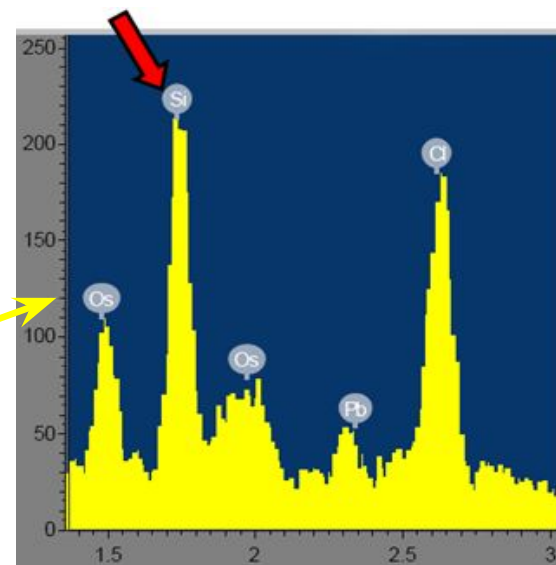
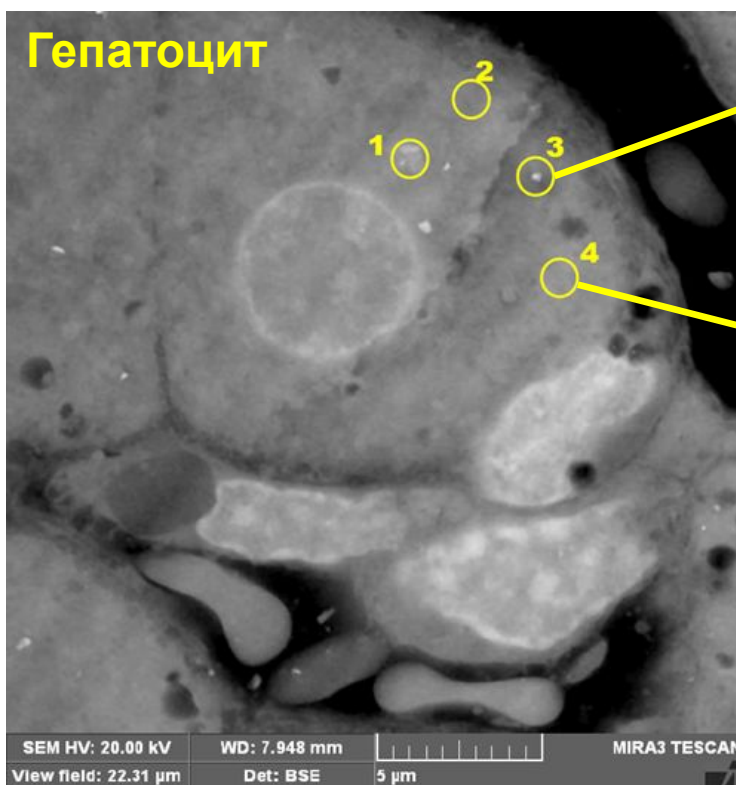
Биодеградация наночастиц кремнезема

Было определено содержание кремния в печени животных в разные сроки после внутривенного введения наночастиц кремнезема

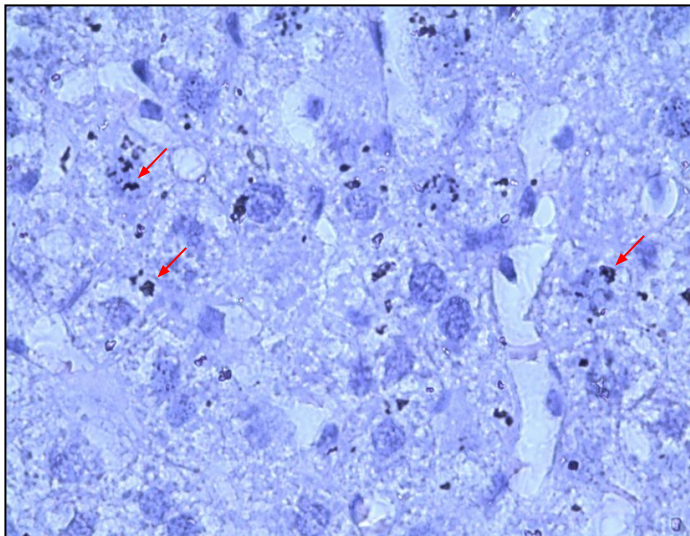


Биораспределение наночастиц кремнезема

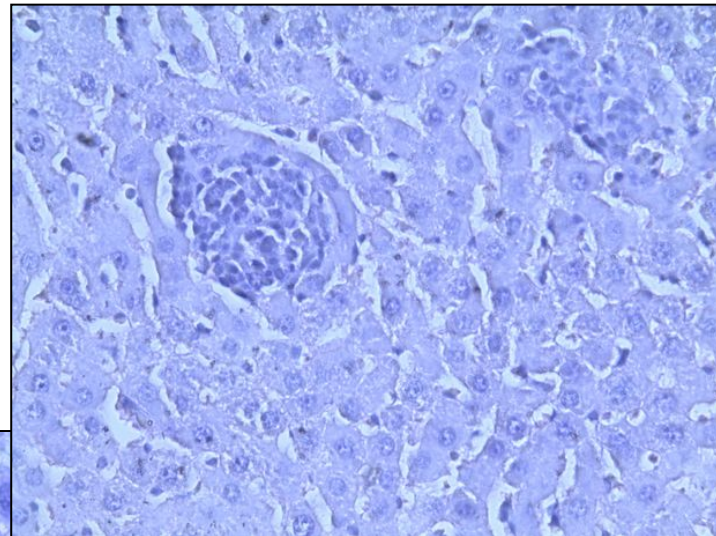
Анализ биораспределения наночастиц кремнезема был проведен с помощью сканирующей электронной микроскопии и энергодисперсионной спектроскопии



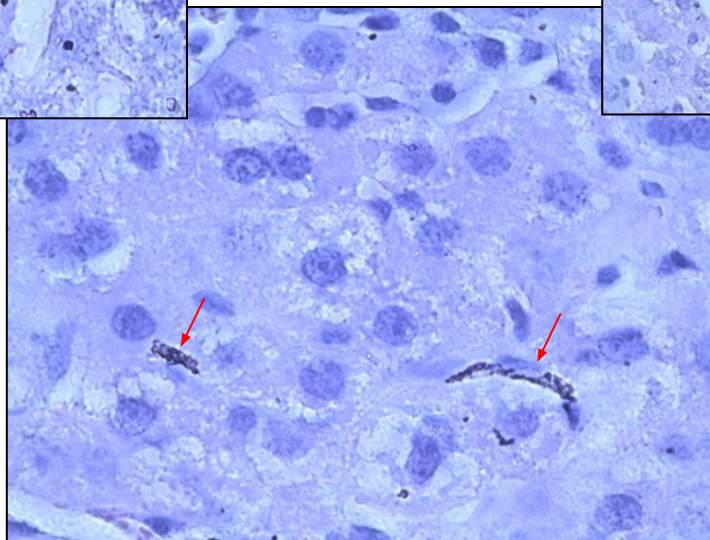
Влияние наночастиц кремнезема на печень



3 ч после введения НЧК. Вне- и внутриклеточная локализация агрегатов НЧК (стрелки).



21 день после введения НЧК. Формирование единичных гранул инородных тел.



21 день после введения НЧК.

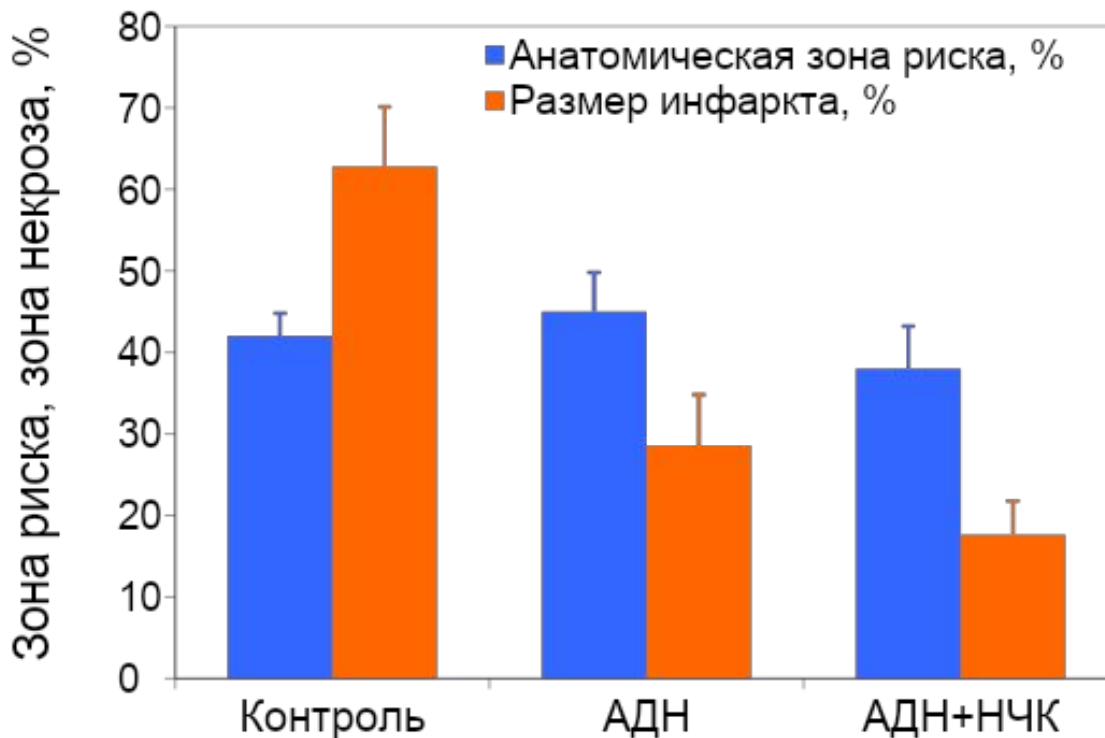
Формирование «слепков» из агрегатов НЧК, предположительно, в желчных ходах (стрелки).

НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА В МИОКАРД С ПОМОЩЬЮ НАНОЧАСТИЦ КРЕМНЕЗЕМА



Эффект иммобилизации аденозина на поверхности наночастиц кремнезема

Было показано, что адсорбционная иммобилизация на поверхности наночастиц кремнезема сопровождается достоверным усилением инфаркт-лимитирующего эффекта аденозина.

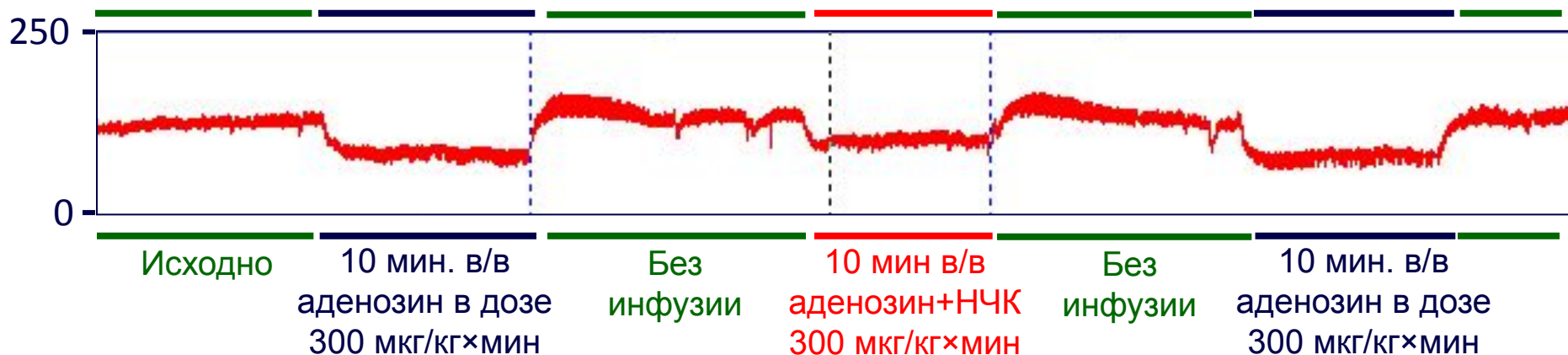


Уменьшение гипотензивного эффекта аденозина при его иммобилизации на НЧК

АД, мм рт. ст.	Исходно	5 мин. инфузии	10 мин. инфузии	5 мин. после	10 мин. после
Аденозин	125±12	82±7	85±9	128±5	119±13
Аденозин+НЧК	131±8	108±14*	113±11*	134±12	130±10

* - $p < 0.05$ в сравнении со свободным аденозином

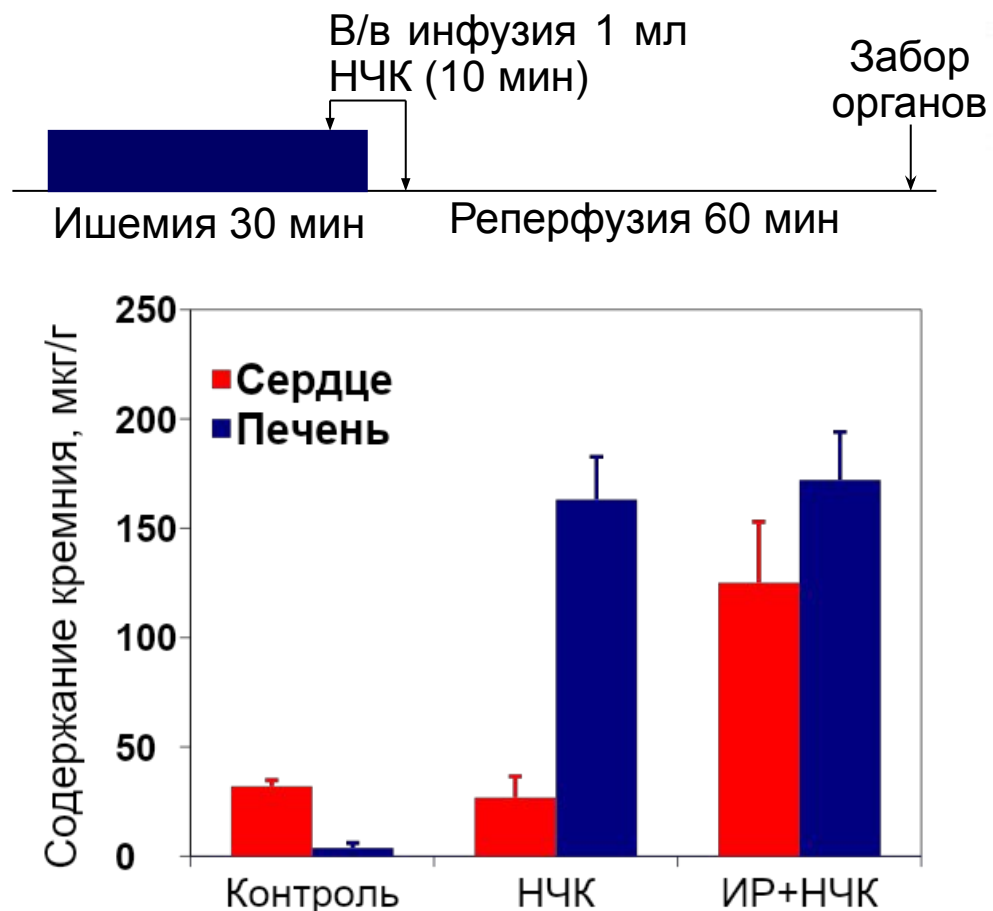
Репрезентативная запись АД, демонстрирующая различный уровень снижения АД под действием свободного и связанного аденозина:



Направленная доставка препаратов в миокард с помощью наночастиц кремнезема

□ Для проверки гипотезы направленной доставки с помощью НЧК оценивалось биораспределение наночастиц у интактных животных и животных с ишемией-реперфузией миокарда.

□ Было показано, что содержание кремния в зоне повреждения миокарда существенно выше, чем в неповрежденном миокарде. Это позволяет говорить о том, что эффект пассивной направленной доставки с помощью наночастиц может быть реализован при ишемии-реперфузии миокарда.



Препараты для доставки в обратимо поврежденный миокард

Для направленной доставки в миокард могут использоваться различные кардиопротективные и ангиогенные препараты: «миметики» прекондиционирования, активаторы тирозинкиназных рецепторов (факторы роста), влияние на сигнальный путь оксида азота.

Точка приложения	Примеры активаторов
G-белок-сопряженные рецепторы	Брадикинин, опиоиды, аденозин или синтетические агонисты соответствующих рецепторов
Тирозинкиназные рецепторы	Инсулин, инсулиноподобный фактор роста-1, трансформирующий фактор роста- β 1, эритропоэтин, сосудистый эндотелиальный фактор роста, ...
Сигнальный путь оксида азота (NO/цГМФ/ПКГ)	Аторвастатин, предсердный натрийуретический пептид, ...
Стимуляция прочих внутриклеточных мишеней	Изофлюран, эстрогены, ...

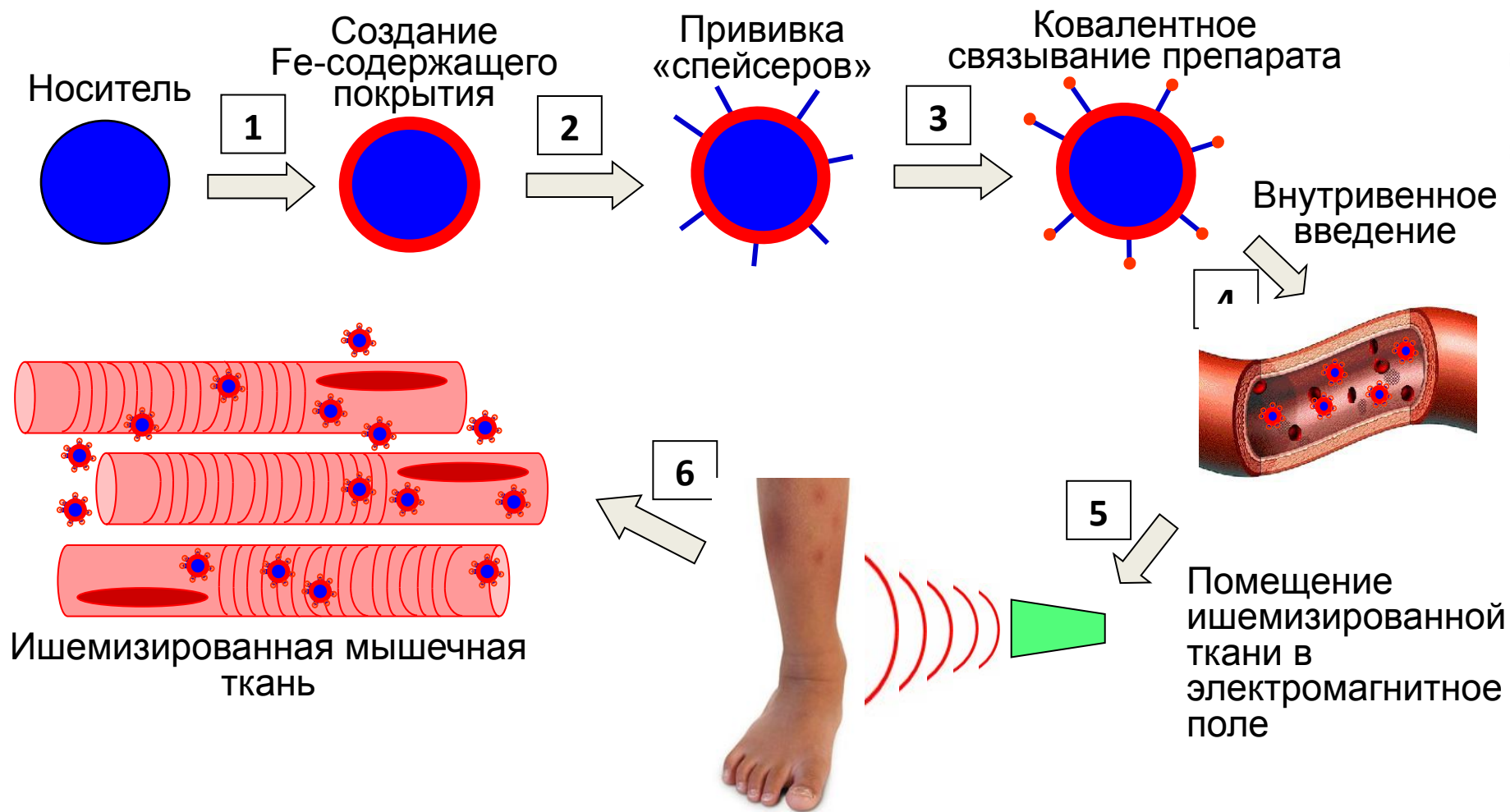
НАПРАВЛЕННАЯ ДОСТАВКА С ПОМОЩЬЮ МАГНИТНЫХ НАНОЧАСТИЦ



Направленная доставка препаратов с помощью магнитных наночастиц

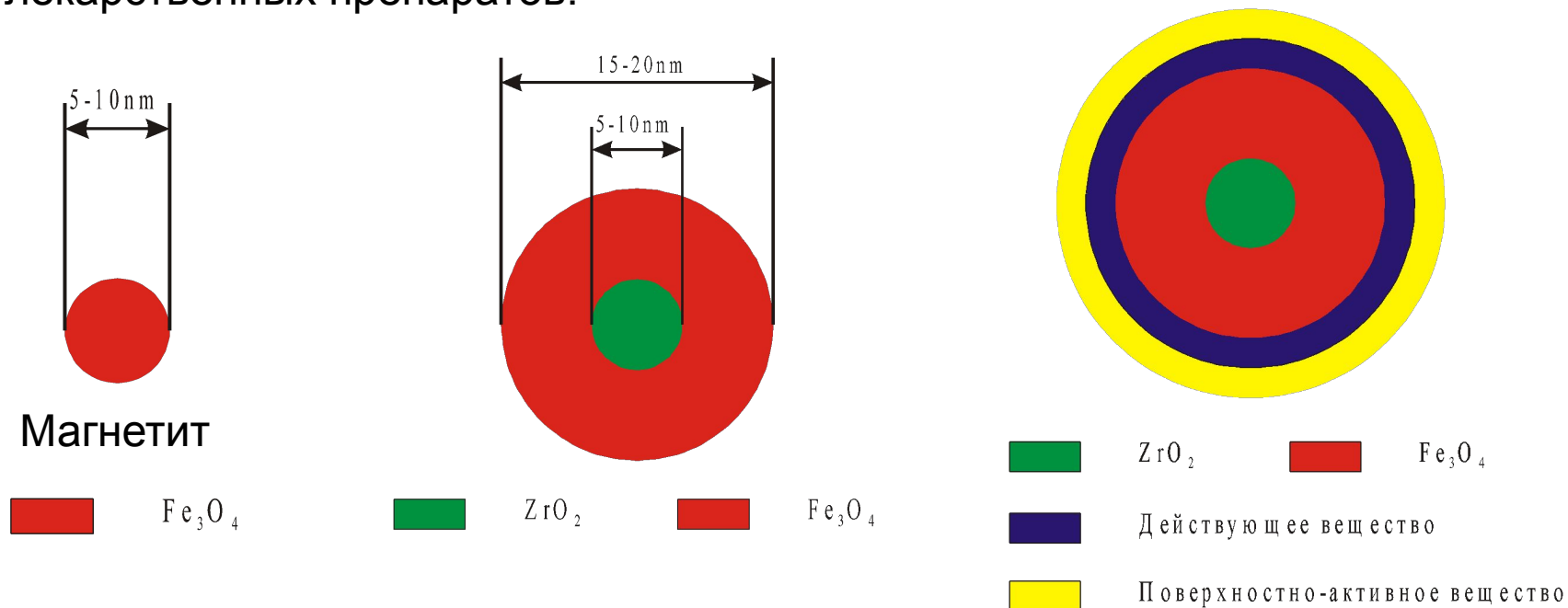
- Проблема адресной доставки лекарственных препаратов с противоишемическим и ангиогенным эффектами при хронической ишемии нижних конечностей может быть решена путем аккумуляции в ишемизированной мышце нанодисперсных железосодержащих матриц под действием внешнего магнитного поля.
- В результате применения такого подхода происходит:
 - ✓ накопление нагруженных препаратом наночастиц в зоне ишемии
 - ✓ высвобождение препарата в ходе биodeградации покрытия частицы

Алгоритм направленной доставки препаратов с помощью магнитных наночастиц



Примеры структур магнитных наночастиц

Наночастицы магнетита (оксида железа) – простейший пример из класса МНЧ. Возможно синтезировать биоксидные наночастицы, состоящие из ядра, представленного оксидом циркония, и оболочки из магнетита. Дальнейшая адсорбция лекарственного препарата на поверхности такой частицы, и добавление поверхностно-активного вещества позволяют обеспечить направленную доставку лекарственных препаратов.



ДИЛЕММА НАПРАВЛЕННОЙ ДОСТАВКИ ПРЕПАРАТОВ



Дилемма направленной доставки препаратов

Одной из главных дилемм при разработке систем направленной доставки лекарственных препаратов внутрь клетки является выбор химической природы наночастиц: гидрофильной или гидрофобной.

