

БАЛАБАНЬЯН ВАДИМ ЮРЬЕВИЧ

**ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ И ФАРМАЦЕВТИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ
СОЗДАНИЯ НАНОРАЗМЕРНЫХ ФОРМ ФАКТОРОВ РОСТА
НЕРВНОЙ ТКАНИ, ФЕНАЗЕПАМА И ПАКЛИТАКСЕЛА**

14.03.06 Фармакология, клиническая фармакология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

доктора фармацевтических наук

Москва -2015

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательском институте фармакологии имени В.В. Закусова» (ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»)

Научный консультант:

заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук,
профессор

Воронина Татьяна Александровна

Официальные оппоненты:

доктор фармацевтических наук,
доцент, заведующая кафедрой
фармацевтической химии, фармакогнозии
и организации и экономики фармации
факультета фундаментальной медицины
ФГБУ ВПО «Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова»

Каленикова Елена Игоревна

доктор биологических наук,
профессор, ведущий научный сотрудник
отдела нейрофармакологии ФГБНУ
«Научно-исследовательский институт
экспериментальной медицины имени
С.В. Аничкова»

Лебедев Андрей Андреевич

доктор медицинских наук,
профессор, заведующий кафедрой
фармакологии ФГБОУ ВПО
«Военно-медицинская академия имени
С.М. Кирова» Министерства обороны РФ

Шабанов Петр Дмитриевич

Ведущая организация:

ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Минздрава России

Защита состоится «__» _____ 2015 года в ____ часов на заседании диссертационного совета Д. 208.008.02 при ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г.Волгоград, пл. Павших борцов, 1.

С диссертацией можно ознакомиться в фундаментальной библиотеке ГБОУ ВПО «Волгоградский государственный медицинский университет» Минздрава России по адресу: 400131, Россия, г.Волгоград, пл. Павших борцов, 1 и на сайте www.volgmed.ru

Автореферат разослан «__» _____ 2015 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Бугаева Любовь Ивановна

Актуальность исследования. Несмотря на наличие высокоактивных лекарственных средств, медикаментозная коррекция многих патологий остается неудовлетворительной. Среди факторов, снижающих эффективность лекарственной терапии, следует отметить недостаточную селективность действия лекарств: при введении лекарственного вещества в организм происходит его неконтролируемое распределение по органам и тканям, при этом концентрации в очаге патологии зачастую не достигают терапевтического уровня. Причиной неэффективной доставки ЛВ могут быть трудности при проникновении в орган-мишень из-за наличия гистогематических барьеров, например, гематоэнцефалического барьера. Кроме того, многие ЛВ не способны проникать в клетки, ввиду своих физико-химических свойств или особенностей клеточного метаболизма, в частности, наличия мембранных защитных систем при множественной лекарственной устойчивости опухолевых клеток [Аляутдин Р.Н., 2008; Гельперина С.Э., 2009; Сейфулла Р.Д., 2012; Чехонин В.П., 2012; Пиотровский Л.Б., 2013; Begley D.J., 2004; Wohlfart S., 2012; Kreuter J., 2013]. Так же неблагоприятными факторами являются низкая биодоступность ЛВ вследствие их недостаточной растворимости или быстрой инактивации.

Актуальность этой проблемы послужила стимулом для разработки подходов к созданию разнообразных систем направленной доставки ЛВ. Особый интерес среди этих систем представляют полимерные наночастицы, представляющие собой твердые частицы размером от 10 до 1000 нм, сочетающие такие важные для носителей свойства, как стабильность и высокую емкость в отношении широкого спектра ЛВ [Гельперина С.Э., 2010; Kreuter J., 2013].

В работах отечественных и зарубежных ученых показана возможность доставки в мозг ЛВ, не способных преодолевать ГЭБ с помощью полибутилцианоакрилатных наночастиц, поверхность которых модифицирована полисорбатом 80. Используя указанный носитель, были доставлены в мозг гексапептид даларгин [Alyautdin R.N., 1995], четвертичное аммониевое соединение – прозерин [Басел А.А., 2006], а также лоперамид-агонист μ -опиоидных рецепторов, который, являясь субстратом Р-гликопротеина, не способен преодолеть ГЭБ [Alyautdin R.N., 1997]. Применение ПБЦА наночастиц, покрытых ПС 80, позволило преодолеть Р-зависимую резистентность опухолевых клеток [Гельперина С.Э., 2010; Vauthier C., 2003; Chavanpatil M.D., 2006]. Эти результаты послужили основанием для создания концепции о том, что наночастицы могут служить средством доставки ЛВ в органы-мишени.

Степень разработанности. К настоящему времени накоплен значительный опыт по разработке и исследованию наносомальных форм различных ЛВ [Аляутдин Р.Н., 2008; Гельперина С.Э., 2010; Couvreur P., 1999; Vauthier C., 2003; Kreuter J., 2008]. Вместе с тем, нерешенной остается проблема транспорта в мозг веществ белково-пептидной структуры, в частности факторов роста нервной ткани. Актуальной остается проблема преодоления резистентности опухолевых клеток к цитостатикам, решение

которой может быть достигнуто путем создания наносомальных форм противоопухолевых препаратов. Остаются малоизученными вопросы изменения фармакодинамики при создании наноразмерных форм нейрорепаративных препаратов.

Цель работы. Экспериментальное обоснование создания наноразмерных форм фактора роста нервов, низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека, феназепама и паклитаксела.

Для достижения указанной цели необходимо решить следующие **задачи:**

1. Разработать технологию получения наносомальных форм фактора роста нервов, низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека, феназепама и паклитаксела на основе полимерных наночастиц и изучить влияние состава наночастиц на проявление фармакологической активности.
2. Исследовать противопаркинсоническое и антиамнестическое действие наносомальной формы фактора роста нервов при экспериментальном моделировании паркинсонического синдрома и в условиях холинергического дефицита.
3. Изучить фармакологические эффекты наносомальных форм низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека при экспериментальном моделировании геморрагического инсульта.
4. Изучить фармакодинамику наносомальной формы феназепама.
5. Исследовать цитостатическую активность и противоопухолевый эффект наносомальной формы паклитаксела на моделях *in vitro* и *in vivo*.
6. Исследовать проникновение полимерных наночастиц через интактный гематоэнцефалический барьер в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Научная новизна.

Впервые разработана технология получения наносомальной формы ФРН на основе ПБЦА наночастиц и установлено, что ФРН в составе наносомальной формы проникает в мозг и оказывает выраженное противопаркинсоническое и антиамнестическое действие в эксперименте, тогда как субстанция ФРН подобными эффектами не обладает.

Впервые разработана технология получения наносомальных форм нсРЭЧ на основе ПБЦА и ПЛГА НЧ и установлена зависимость физико-химических характеристик НЧ от параметров технологического процесса. Показано, что наносомальные формы обеспечивают проникновение нсРЭЧ в мозг.

Впервые показано протекторное действие наносомальных форм нсРЭЧ на модели экспериментального геморрагического инсульта и выявлена способность нсРЭЧ увеличивать экспрессию мРНК нейротрофинов NGF и BDNF во фронтальной коре и гиппокампе крыс.

Впервые разработана технология получения наносомальной формы феназепама на основе ПБЦА НЧ. Показано, что наносомальная форма феназепама обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и

противосудорожным действием, аналогичным действию феназепама в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции, в терапевтических дозах не обладает седативным и миорелаксирующим действием.

Разработана технология получения наносомальной формы паклитаксела на основе ПЛГА НЧ. Впервые установлено, что наносомальная форма паклитаксела оказывает выраженный цитотоксический эффект *in vitro* в отношении высокорезистентных клеток Т-лимфобластного лейкоза человека Jurkat WT и обладает высокой противоопухолевой активностью в эксперименте *in vivo* в отношении резистентной аденокарциномы молочной железы Ca755 мышей линии C57BL/6 в сравнении со стандартной лекарственной формой паклитаксела.

Методология и методы исследования. В работе использован комплексный подход, включающий разработку методологии конструирования и изучения препаратов различной химической структуры и направленности фармакологического действия на основе полимерных наночастиц. Решение поставленных задач достигается применением нанотехнологических, аналитических, фармакологических и молекулярно-биологических методов, применяемых в мировой практике.

Научно-практическая значимость. Выявленные протекторные свойства наносомальной формы нсРЭЧ открывают перспективу для дальнейших исследований по разработке и доклиническому изучению новой формы нсРЭЧ в качестве препарата для лечения заболеваний, сопровождающихся нейродегенерацией, в частности, инсультов и травм мозга.

На примере наносомальной формы феназепама предложен и реализован подход, позволяющий с помощью ПБЦА НЧ устранить нежелательные побочные эффекты при усилении и/или сохранении основных эффектов.

На основе разработанной наносомальной формы паклитаксела предложен и реализован подход, позволяющий с помощью ПЛГА НЧ с модифицированной поверхностью преодолеть Р-gr-зависимую резистентность опухолевых клеток. Результаты изучения противоопухолевой активности наносомальной формы паклитаксела на основе ПЛГА НЧ позволяют рекомендовать указанную форму для дальнейшего доклинического изучения.

Внедрение результатов диссертации. Результаты диссертации использованы в рамках реализации федеральной целевой программы (ФЦП) «Развитие фармацевтической и медицинской промышленности Российской Федерации на период до 2020 года и дальнейшую перспективу» (постановление Правительства Российской Федерации от 17 февраля 2011 г. № 91):

- по мероприятию 2.1. ФЦП «Доклинические исследования инновационных лекарственных средств» автором подготовлен и представлен в Министерство промышленности и торговли (МПТ) РФ проект «Доклинические исследования инновационного лекарственного препарата

для лечения острых нарушений мозгового кровообращения на основе низкосиалированного эритропоэтина и наноразмерной системы доставки, обеспечивающей направленный транспорт эритропоэтина через гематоэнцефалический барьер» Шифр «2.1. Инсульт 2012», получивший государственное финансирование (протокол заседания научно-координационного совета ФЦП от 26 марта 2012 г. № ДМ-13/2204; государственный контракт МПТ РФ № 12411.1008799.13.107 от 30 июля 2012 года).

- по мероприятию 5.22. ФЦП «Разработка образовательных программ и модулей по направлению развития «Фармацевтическая промышленность» и «Биотехнология» автором разработан и апробирован образовательный курс «Микро- и наночастицы в фармации и медицине» в рамках государственного контракта Министерства образования и науки РФ № 12Р14.11.0001 от 25 июля 2012 года, выполняемого Московским государственным университетом тонких химических технологий имени М.В. Ломоносова.

Результаты, полученные в диссертации, использованы в работе отдела стандартизации и новых технологий ЗАО «Санкт-Петербургский Институт Фармации», отдела фармакологии ЗАО «Институт Экспериментальной Фармакологии» и в научно-исследовательской лаборатории ООО «НПК «Наносистема».

Связь темы исследования с планом научно-исследовательских работ ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Диссертационная работа выполнялась в рамках темы НИР плана ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» - «Изучение механизмов эндо- и экзогенной регуляции функций центральной нервной системы. Разработка оригинальных нейропсихотропных средств» (№ гос. регистрации 01.2011.69129).

Основные положения, выносимые на защиту.

1. Разработана технология, позволяющая с помощью ПБЦА и ПЛГА наночастиц с модифицированной поверхностью создавать терапевтически значимые концентрации ФРН и нсРЭЧ в головном мозге животных при системном введении.
2. Наносомальные формы ФРН и нсРЭЧ на основе ПБЦА и ПЛГА НЧ способны проявлять выраженные протекторные свойства при экспериментальном моделировании нейродегенеративных процессов.
3. Включение феназепама в ПБЦА НЧ с модифицированной ПС 80 поверхностью приводит к качественному и количественному изменению спектра его нейропсихотропных эффектов.
4. Наносомальная форма паклитаксела на основе ПЛГА НЧ обладает выраженным цитостатическим и противоопухолевым эффектом в отношении клеточной линии Jurkat WT и аденокарциномы молочной железы Ca755 в эксперименте.
5. ПБЦА и ПЛГА наночастицы с модифицированной поверхностью способны проникать через интактный гематоэнцефалический барьер в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

Личный вклад автора. Автору принадлежит решающая роль на всех этапах исследования – от выбора направления исследования, планирования и проведения ключевых экспериментов до обсуждения и литературного оформления полученных результатов. При личном участии автора по материалам диссертации подготовлены публикации и патент на изобретение.

Степень достоверности и апробация работы.

Высокая степень достоверности полученных результатов подтверждается достаточным объемом проведенных экспериментальных исследований с использованием высокотехнологичного оборудования, современных молекулярно-биологических и фармакологических методов исследования.

Основные результаты работы представлены на:

II Российском медицинском форуме, Москва, 2007 г.; VII Международном конгрессе «Здоровье и образование в XXI веке; концепции болезней цивилизации», Москва, 2007 г.; Международном медицинском форуме «Индустрия здоровья», Москва, 2008 г.; научно-практической конференции «Высокие технологии в терапии и реабилитации заболеваний нервной системы», Москва, 2008 г.; научно-практической конференции «Вегетативные расстройства в клинике нервных и внутренних болезней», Москва, 2008 г.; Международном форуме по нанотехнологиям «Rusnanotech», Москва, 2008 г.; международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине», Санкт-Петербург, 2010 г.; международной научно-практической конференции «Наука и современность», Новосибирск, 2010 г., X Всероссийской научно-практической конференции с международным участием «Отечественные противоопухолевые препараты», Москва, 2011 г.; 11th European Neuropsychopharmacology Regional Meeting, St. Petersburg, 2011г.; заседании Ученого совета ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» РАМН (протокол № 6 от 06.06.2011); II Международной конференции «Модели инновационного развития фармацевтической и медицинской промышленности на базе университетов, как интеграторов науки и индустрии», г.Долгопрудный, Московская область, 2012 г.; Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии», Москва, 2012 г.; III и IV Съезде Российского Научного общества фармакологов, 2007 и 2013 гг.

Работа апробирована на заседании межлабораторной конференции ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» с представителями научно-исследовательского подразделения ООО «Технология лекарств».

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 50 печатных работ. Основное содержание диссертации отражено в 28 статьях в ведущих рецензируемых научных журналах, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ. По результатам работы получен Евразийский патент.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 248 страницах, содержит 30 таблиц и 77 рисунков и состоит из введения, обзора литературы (глава 1), описания объектов и методов исследования (глава 2), результатов исследования (главы 3-8), обсуждения результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 245 источников, из них 23 отечественных и 222 зарубежных источника.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Препараты и вещества, используемые для получения наносомальных форм. Для получения наночастиц использовали - полилактиды марки Lactel® (Absorbable Polymers, DURECT Corporation, USA): PLA η = 0,34 dl/g; PLA η = 0,68 dl/g; PLGA-COOH 50:50 (с карбоксильными концевыми группами), η = 0,15 - 0,25 dl/g; PLGA 50:50, η = 0,37 dl/g; полилактиды марки Resomer®* (Evonik, Germany): Resomer® 202H, Resomer® 502H, Resomer® 502S, Resomer® 752H, Resomer® 752S; бутилцианоакрилат (Sicomet® 6000, Sichel-Werke, Hannover, Germany); поверхностно-активные вещества (производитель Sigma, USA): поливиниловый спирт 30-70 кДа, полуксамер 188 (Pluronic® F-68), полуксамер 85, человеческий сывороточный альбумин, полисорбат 80, декстран (ММ 70 кДа); остальные реактивы и растворители квалификации не ниже ч.д.а. Красители: (DiI) (1,1'-диоктадецил-3,3,3',3'-тетраметилиндокарбоцианин перхлорат – производитель Sigma (Life Science)); родамин 123 [2-(6-амино-3-имино-3H-ксантен-9-ил)бензойной кислоты метиловый эфир], производитель Sigma (Life Science).

Препараты: ФРН, выделенный из подчелюстных желез мышей (лиофилизированный порошок), 7S Nerve Growth Factor (CALBIOCHEM®, Германия); субстанция человеческого низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина (ООО «Протеиновый контур», Россия); эральфон® (ЗАО «ФармФирма «Сотекс», Россия); субстанция феназепам (Физико-химический институт им. А.В. Богатского, АН Украины); паклитаксел (Calbiochem, США); таксол (концентрат для приготовления раствора для инфузий, Бристол-Майерс, США).

Оборудование, используемое для получения наночастиц. В работе использованы: магнитная мешалка Labtech Daihan (Корея), перемешиватель Vortex (VWR International, Германия), спектрофотометр Helios Zeta UV-VIS (Therma Scientific, США), pH-метр PP-15 (Sartorius, Германия), центрифуга Avanti J-30I (Beckman Coulter, США), гомогенизатор Ultra-Turax T18 basic (IKA, Германия), гомогенизатор Emulsiflex C-5 (Avestin, Канада), ротаторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI, Швейцария), лиофильная сушка Alpha 2-4 LSC (Christ, Германия), хроматографы Shimadzu (Япония), «Спектра-Физикс» (США).

Получение наносомальных форм. Разработка технологии получения наносомальных форм и наработка образцов для проведения фармакологических исследований выполнена в научно-исследовательской лаборатории ООО «НПК «Наносистема» и ООО «Технология лекарств».

НЧ-плацебо на основе полилактидов получали методом гомогенизации под давлением с последующим испарением органической фазы (Ueda M. & Kreuter J., 1997), после чего НЧ лиофильно высушивали. В качестве стабилизаторов НЧ использовали человеческий сывороточный альбумин или поливиниловый спирт с молекулярной массой 15 кДа; криопротектор – маннит.

НЧ-плацебо на основе полибутилцианоакрилата получали методом анионной полимеризации (Couvreur et al., 1979) и лиофильно высушивали в присутствии маннита. В качестве стабилизатора использовали декстран (ММ 70 кДа).

Наносомальную форму ФРН получали путем сорбции ФРН на предварительно полученных ПБЦА НЧ – плацебо. Для модификации поверхности НЧ к суспензии ПБЦА НЧ с сорбированным ФРН прибавляли 1% раствор ПС 80. Для определения степени сорбции ФРН методом ультрацентрифугирования сепарировали свободный ФРН от связанного с наночастицами. Количественное содержание ФРН проводили в образцах, покрытых и не покрытых ПС 80. Методом ИФА определяли концентрацию ФРН в супернатанте. Исследования выполняли с помощью набора реактивов для ИФА «Nerve Growth Factor Sandwich ELISA kit» (ChemiKine, США). Анализ осуществлялся по стандартному протоколу.

Наносомальную форму нсРЭЧ получали путем сорбции нсРЭЧ на предварительно полученных ПБЦА и ПЛГА НЧ - плацебо. Определение концентрации нсРЭЧ проводили методом спектрофотометрии (спектрофотометр Thermo Scientific HELIOS ZETA, Англия). НЧ отделяли от свободного нсРЭЧ центрифугированием (центрифуга Avanti J-30 I, 30 мин при скорости 20000 об/мин, 4-8 °С. Степень десорбции эритропоэтина в присутствии различных ПАВ проводили, добавляя к НЧ с нсРЭЧ, 1 мл воды, либо раствор PBS, 1% - раствор F-68 или 1%-ный раствор F-68 в PBS. После центрифугирования отделяли супернатант и в нем спектрофотометрически определяли концентрацию десорбированного нсРЭЧ. Для оценки агрегационной устойчивости коллоидной системы лиофилизированный образец НЧ ресуспендировали в дистиллированной воде и определяли размеры и полидисперсность НЧ при различной температуре.

Наносомальную форму феназепама получали растворяя субстанцию феназепама в хлористом метилене с последующим добавлением к полученному раствору бутилцианоакрилата. Для полного растворения бутилцианоакрилата осуществляли перемешивание с использованием перемешивателя Vortex и ультразвуковой бани. После чего количественно переносили полученный раствор в водную фазу, содержащую лимонную кислоту и водный раствор полоксамера 188, а затем подвергали ультразвуковой гомогенизации в течение 1 минуты. Суспензию перемешивали на магнитной мешалке в течении 3 часов для удаления органического растворителя, после чего фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» и лиофилизировали. В качестве криопротектора

использовали маннит. Содержание феназепама в НЧ определяли спектрофотометрически.

Наносомальную форму паклитаксела получали растворяя паклитаксел, Resomer 502 Н в метиленхлориде. Полученный раствор смешивали с 1% водным раствором ПВС и гомогенизировали с помощью ультразвукового диспергатора (1 минута, 70 Ватт). Образовавшуюся суспензию перемешивали на магнитной мешалке при комнатной температуре в течение 2 – 3 часов для удаления органического растворителя, после чего суспензию фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» и лиофилизировали. Процент включения паклитаксела в НЧ определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе SP 8000 после обработки образцов метанолом для растворения паклитаксела и разрушения НЧ.

Визуализацию НЧ проводили в Российском научном центре «Курчатовский институт» методами растровой электронной микроскопии на микроскопе FEI Helios NanoLab D435 (FEI Company, США) и атомно-силовой микроскопии на приборе Veeco Multimode V SPM (Veeco, США). Измерения проводили в полуконтактном режиме. Сканирование проводили без напыления при низком значении ускоряющего напряжения электронов (1-5 кВ). Определение размеров, поверхностных зарядов и полидисперсности НЧ проводили методом динамического светорассеяния (Nanosizer NanoZS, Malvern Instruments).

Экспериментальные животные. Исследования проводили на самцах нелинейных белых крыс и крыс линии Вистар массой 180-250 г, самцах нелинейных белых мышей и мышей линии C57/bl6 и Balb/C массой 20-25 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая» Московской области.

В работе использовали 260 беспородных мышей, 230 мышей линии C57/Bl6, 50 мышей линии Balb/C, 300 беспородных крыс и 40 крыс линии Sprague-Dowly. Животных содержали на постоянном доступе к корму и воде. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении Правил лабораторной практики».

Фармакологические методы исследования. Исследования проводили в соответствии с Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ// под. ред. Р.У. Хабриев. второе изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005. – 832 с. и Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с., где дано подробное описание используемых в работе методов.

Паркинсонический синдром моделировали введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин (МФТП) [Воронина Т.А., 2000], острую амнезию условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) создавали введением скополамина [Voronina et. al., 1994]; моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического

инсульта) у крыс осуществляли путем деструкции мозговой ткани в области внутренней капсулы с последующим введением в место повреждения крови, взятой из-под языка животного [Макаренко А.Н. и др., 1999]; неврологический статус у крыс определяли по шкале Stroke-index McGrow в модификации И.В. Ганнушкиной [Ганнушкина И.В., 1977]; динамику развития ГИ в течение 14 дней с регистрацией гибели крыс, показателей поведения и состояния животных исследовали, используя комплекс традиционных для экспериментальной нейropsychофармакологии методов [Воронина Т.А. и др., 2012]; анксиолитическое действие оценивали в конфликтной ситуации [Vogel et al., 1983] и тесте приподнятого крестообразного лабиринта [Lister, 1987], противосудорожное действие оценивали при действии коразола [Swinyard, 1969] и на модели первично-генерализованных судорог, вызванных бемебридом; антиагрессивное действие изучали в тесте немотивированной агрессивности - «драки» на электродном полу в опытах на мышах [Воронина Т.А. и др., 1982]; миорелаксантное действие с помощью теста вращающегося стержня, седативное действие в тесте «открытое поле» [Воронина Т.А. и др., 1982]; цитостатическое действие изучено на высокорезистентной клеточной линии Jurkat WT в МТТ тесте (3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)2,5-дифенил-2-Н-тетразолия бромид).

Морфометрическое исследование объема поврежденной ИПГ зоны мозга проведено совместно с сотрудниками ФГБУ «Научный центр неврологии» РАМН. Крыс с ИПГ декапитировали, извлекали мозг, фиксировали, просветляли и готовили срезы на вибротоме (vibratome series 1000 sectioning system Tecnical Product international inc. USA) с шагом 100 мкм. Каждый второй вибротомный срез фиксировали на предметных стеклах с желатиной, окрашивали 0,2% метиленовым синим, обезживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в балзам. Сканирование проводили на слайд-приставке Epson perfection V100 PHOTO. Площадь измеряли в программе "Image J" в мм². Объем зоны повреждения определяли по формуле: $V = \sum S_n d$, где d - толщина пары срезов; S_n – измеренная площадь серийного среза в мм²; $\sum$ - сумма объемов повреждения на срезах. Защитный эффект тестируемых препаратов рассчитывали с использованием коэффициента эффективности защиты (КЭЗ) по формуле: $KЭЗ = (V_0 - V_v) / V_0 \cdot 100\%$, где V₀ – объем повреждения у контроля с ИПГ, V_v – объем повреждения у группы, получавшей тестируемый препарат.

Противоопухолевая активность изучена на модели аденокарциномы молочной железы Са 755 мышей линии C57BL/6. Опухоли перевивали по стандартной методике половозрелым мышам-самкам линии C57BL6 массой 18-22 г (в каждой группе по 16 животных). Инокуляция опухолевых клеток проводилась подкожно в правую подмышечную область каждой мыши по 50 мг опухолевой взвеси в среде Хенкса в разведении 1:10 (5 x 10⁶ клеток). Введение наносомальной и стандартной форм паклитаксела в трех экспериментальных дозах (15, 10 и 7,5 мг/кг в пересчете на паклитаксел) проводилось на 3, 5 и 7 сутки после прививки опухолевых клеток. Все

тестируемые формы вводились внутривенно. Наблюдение за мышами проводилось в течение 50 дней после введения опухолевых клеток животным.

Оценку эффективности лечения проводили по показателям увеличения продолжительности жизни и торможения роста опухоли [Трещалина Е.М., 2012]. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ, %) леченных животных по сравнению с контролем вычисляли по формуле:

УПЖ % = $(СПЖ_о - СПЖ_к) / СПЖ_к \times 100$, где СПЖ_о и СПЖ_к – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных. Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

ТРО % = $(V_k - V_o) / V_k \times 100$, где V_k и V_o – средний объем опухолей (мм³) в контрольной и опытной группах, который определяли как произведение размеров трех перпендикулярных диаметров опухолевого узла. Измерение объема опухолей проводили на 1, 4, 7 и 14-е сутки после прекращения введения препаратов.

Определение концентрации ФРН проводили в гомогенатах-лизатах ткани головного мозга мышей линии C57Bl/6 методом иммуноферментного анализа по стандартному протоколу с помощью набора реактивов для ИФА «Nerve Growth Factor Sandwich ELISA kit» (ChemiKine, США).

Определение концентрации нсРЭЧ проводили в гомогенатах-лизатах ткани головного мозга белых нелинейных мышей методом иммуноферментного анализа с помощью набора K040 ProCon EPO2 (ООО «Протеиновый контур»), анализатора Stat Fax 2100 (Awareness Technology, США).

Изучение рецепторного связывания феназепама, включенного в ПБЦА НЧ, с бензодиазепиновыми рецепторами мозга в условиях *in vitro* и *ex vivo* проводили с помощью жидкостно-сцинтилляционной спектроскопии.

Оценку уровня экспрессии мРНК BDNF и NGF проводили с использованием количественной ПЦР в реальном времени (real-time quantitative PCR, система Mx3000P, Stratagene, США). Применяли высокоспецифичный dsДНК-связывающий краситель SYBR greenI.

Исследования по изучению проникновения наночастиц через ГЭБ в экспериментах *in vitro* проводились совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «ФМИЦПН»). Моделирование гематоэнцефалического барьера осуществляли путем кокультивирования эндотелиальных клеток и аллогенных астроцитов с использованием вставок Transwell («Corning-Costar», США). Верификацию клеточных культур проводили иммуноцитохимическим методом. Конфлюентность образовавшегося монослоя определяли путем измерения трансэндотелиального сопротивления с периодичностью в два дня, используя систему Epithelial- volt-ohm meter и электродную камеру Endohm-12 («World Precision Instruments», США). Исследовали проницаемость ГЭБ для ПЛГА наночастиц с размером 150 и 300 нм, меченых родамином 123 и

DiI и ПБЦА наночастиц, нагруженных родамином 123. Тестируемые образцы растворяли в четырех видах растворителей: вода для инъекций, 1% водный раствор полоксамера 188, 1% водный раствор плуроника Р85, 1% раствор полисорбата 80 (для ПБЦА наночастиц). В качестве низкомолекулярных трейсеров для оценки параклеточной и трансклеточной проницаемости наночастиц применяли флуоресцеин натрия (Mm 376 Да, «Fluka») и родамин 123 («Sigma», США).

Исследования по изучению проникновения наночастиц через ГЭБ в экспериментах *in vivo* проводились совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Федеральный научно-клинический центр специализированных видов медицинской помощи и медицинских технологий Федерального медико-биологического агентства» МЗ РФ (ФГБУ ФНКЦ ФМБА России). Исследование проницаемости интактного ГЭБ для наночастиц проводили на здоровых половозрелых мышах Balb/c весом 20 г и крысах Вистар весом 150 г. Исследовали НЧ размером 150 нм, меченые DiI, растворенные в фосфатном буфере (pH 7,4) и 1% растворе полоксамера 188 и полоксамера 85. Детекцию флуоресценции органов экспериментальных животных определяли на приборе Ivis Spectrum CT (PerkinElmer) (Ex/Em: 530 -560/580 - 620) по протоколам производителя. Срезы мозга толщиной 50 мкм готовили на вибротоме Microm HM 650V, которые подвергали сканирующей лазерной конфокальной микроскопии для детекции DiI в клетках при соответствующих данным красителям показателям возбуждения и эмиссии. Сканирование производилось с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Nikon A1R MP+. В исследовании использовались лазеры с эмиссией в 405 нм, 488 нм, 561 нм и 638 нм. Используемая оптика: Plan Apo 20x/0,75 Dic N, Apo IR 60x/1,27 WI и Apo TIRF 60x/1,49 oil Dic объективы. Контуры клеток визуализировали с помощью дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии. Ядра клеток докрашивали с помощью красителя Hoechst (Invitrogen).

Для идентификации нейронов и астроцитов на срезах мозга проводили флуоресцентный иммуногистохимический анализ с помощью антител к бета-III-тубулину и глиофибрилярному кислому белку. Применяли стандартный иммунофлуоресцентный протокол. В качестве вторых антител применяли Goat anti-mouse Alexa Fluor 633 и Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

Статистическую обработку результатов проводили с использованием программы «Biostatistics II» с использованием методов Стьюдента, Фишера, χ^2 и непараметрического критерия Манна-Уитни, Вилкоксона, и дисперсионного непараметрического критерия Крускала-Уоллиса.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1. Получение и исследование наносомальной формы фактора роста нервов.

1.1. Получение наносомальной формы ФРН на основе ПБЦА наночастиц.

Наносомальную форму ФРН на основе ПБЦА НЧ получали путем сорбции ФРН на поверхности ПБЦА НЧ с последующей модификацией поверхности частиц ПС 80. Средний размер полученных частиц составил $220,7 \pm 2,32$ нм, степень сорбции ФРН – $95,5 \pm 3,1$ %. Установлено, что присутствие ПС 80 в составе наносомальной формы не приводит к десорбции ФРН с НЧ.

1.2. Количественное определение содержания ФРН в тканях мозга мышей C57BL/6.

Для изучения возможности транспорта ФРН в ЦНС при системном введении измеряли концентрацию ФРН в тканях мозга мышей линии C57Bl/6 после внутривенного введения ФРН в различных сочетаниях. В контрольных группах мышей, получавших 0,9 % раствор натрия хлорида и ПБЦА НЧ плацебо, отмечались значения концентрации ФРН равные эндогенной концентрации ФРН, что согласуется с данными литературы [Fernandez S.M., Frick K. M., 1997; Takei N. et al. 1998; Liao G.S. 2001]. При введении субстанции ФРН было отмечено повышение концентрации ФРН в тканях мозга на 45 минуте и через 24 часа относительно контрольной группы (рис.1).

При введении ФРН ПБЦА НЧ, модифицированных ПС 80, концентрация ФРН в гомогенатах тканей мозга у мышей линии C57Bl/6 в разные промежутки времени постепенно повышалась, достигая максимума на 45 минуте, сохранялась на высоком уровне в течение 90 мин, затем постепенно снижалась. Полученные результаты свидетельствуют о способности ПБЦА НЧ, покрытых ПС 80, обеспечивать транспорт ФРН через ГЭБ при внутривенном введении.

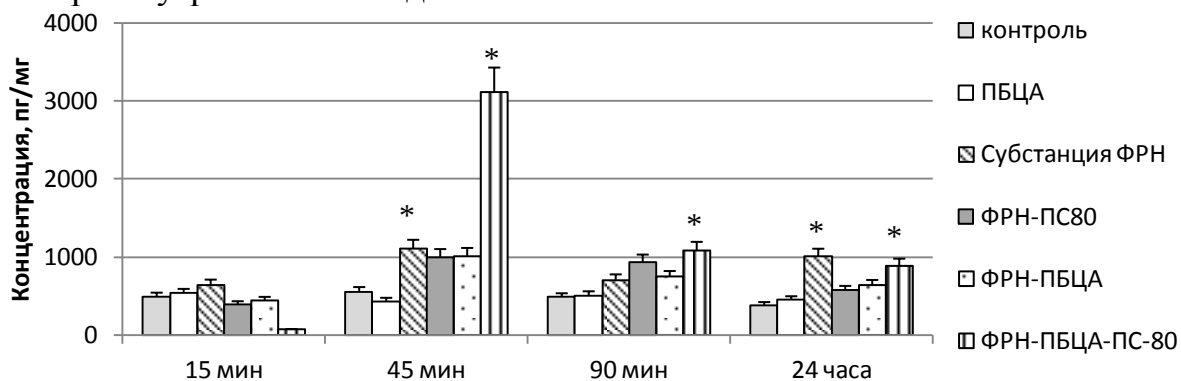


Рис.1. Концентрация ФРН в гомогенатах тканей мозга мышей C57Bl/6 в различные промежутки времени после внутривенного введения ФРН (0,25 мг/кг) в тестируемых формах. Примечания: * - различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к группе контроля (t критерий Стьюдента).

1.3. Изучение антиамнестического действия наносомальной формы ФРН в условиях острой амнезии УРПИ, индуцированной скополамином у крыс.

В группе интактного контроля ЛП реакции избегания составил 180 с. Введение скополамина привело к уменьшению ЛП входа в темную камеру

($62,0 \pm 17,9$ с), что свидетельствовало о развитии острой амнезии у крыс (рис. 2). На фоне введения раствора субстанции ФРН ЛП составил $78,8 \pm 16,9$ с. ЛП входа в темную камеру на фоне введения субстанции ФРН в 1 % растворе ПС 80 составил $113,7 \pm 24,9$ с, тогда как для ФРН, сорбированного на ПБЦА НЧ – $109,0 \pm 19,1$ с. Значение ЛП при введении наносомальной формы ФРН в растворе 1% ПС составило $172,9 \pm 26,8$ с, что достоверно отличается от группы контроля амнезии и других групп сравнения.

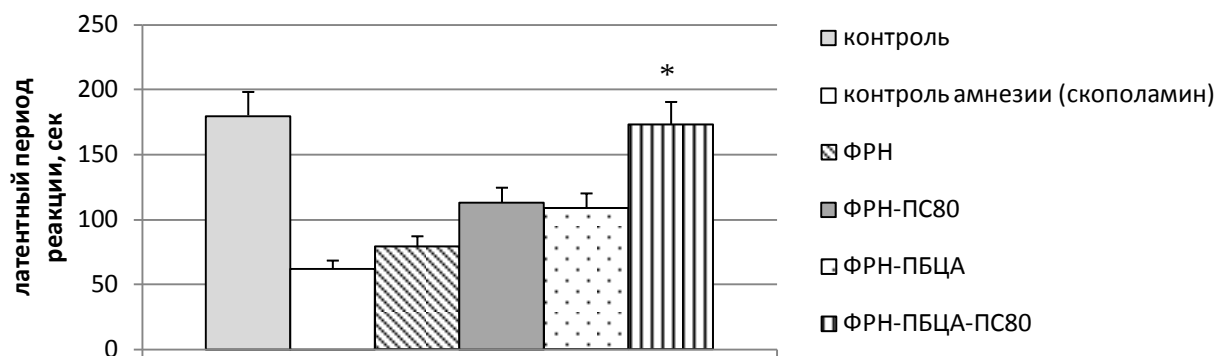


Рис.2. Влияние ФРН в тестируемых формах на латентный период УРПИ у крыс.

Примечания: * - различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к группе амнезии (t критерий Стьюдента).

Таким образом, установлено, что ФРН в субстанции и в других тестируемых формах не вызывал устранение амнезии, вызванной введением скополамина. В отличие от субстанции, наносомальная форма ФРН с поверхностью, модифицированной ПС 80, оказала выраженное антиамнестическое действие.

1.4. Изучение противопаркинсонического действия наносомальной формы ФРН на модели МФТП-вызванного паркинсонического синдрома у мышей C57BL/6.

Однократное введение МФТП (30 мг/кг, в/б) мышам C57Bl/6 вызывает у животных выраженную олигокинезию, которая проявляется достоверным уменьшением горизонтальной и вертикальной двигательной активности в тесте «открытое поле». Достоверное снижение горизонтальных и вертикальных перемещений сохраняется через 24 часа и на 7 и 21 сутки после введения МФТП (рис. 3). Субстанция ФРН, ФРН-ПБЦА-НЧ, ФРН-ПС 80 и ПБЦА НЧ плацебо при внутривенном введении мышам линии C57Bl/6 после МФТП не вызывают достоверного увеличения двигательной активности, сниженной МФТП в тесте «открытое поле» (рис. 3).

Сходные результаты получены при исследовании этих веществ на двигательную активность в актометре. ФРН-ПБЦА-ПС 80, введенный в/в после МФТП, существенно и статистически достоверно повышает двигательную активность мышей. Так, в тесте «открытое поле» и через 90 мин после введения ФРН-НЧ-ПС 80 горизонтальная активность

увеличивается в 8,3 раза, а вертикальная активность - в 8,5 раза. Достоверное повышение двигательной активности в открытом поле и в актометре ФРН-ПБЦА-ПС 80 вызывает через 24 часа, на 7 и 21 сутки после моделирования паркинсонического синдрома.

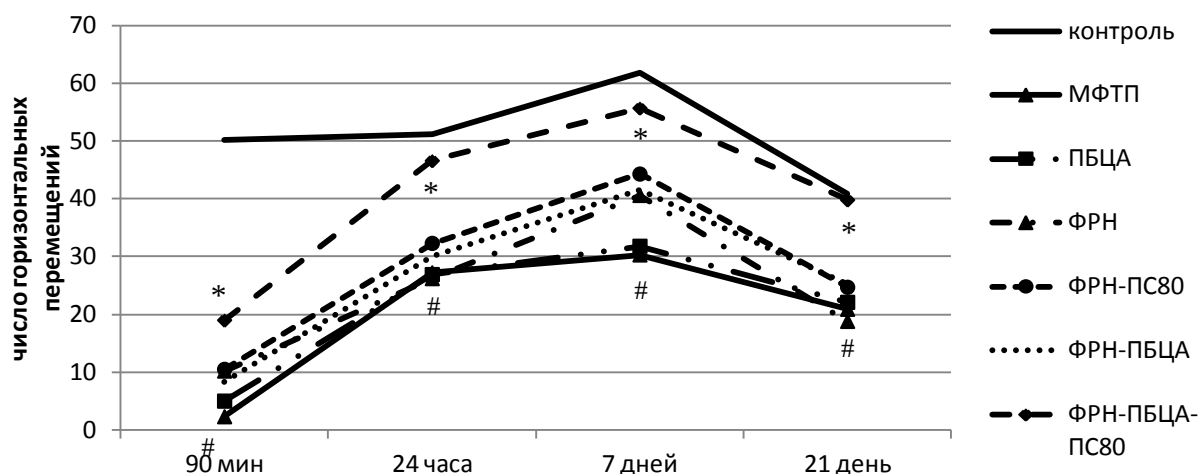


Рис.3. Влияние ФРН в тестируемых формах на олигокинезию в тесте «открытое поле». Примечания: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) * по отношению к: # -группе пассивного контроля; *- группе «МФТП» (t критерий Стьюдента).

Однократное введение МФТП в дозе 30 мг/кг мышам C57Bl/6 через 10 мин после введения вызывает тремор головы и тела животных. ФРН-ПБЦА-ПС 80 (в/в, после МФТП) через 90 мин и сутки после введения достоверно уменьшает количество животных с тремором (в 2 раза), а через 7 дней более чем в 10 раз по сравнению с контролем (МФТП) (рис. 4). Субстанция ФРН, ФРН-ПБЦА, ФРН-ПС 80 и ПБЦА-НЧ достоверно не изменяют выраженность тремора, вызванного МФТП.

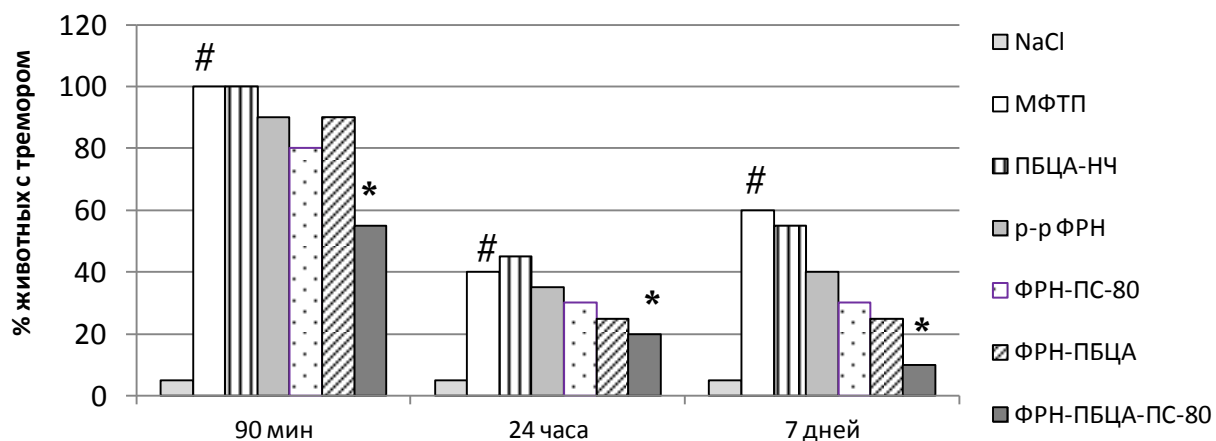


Рис.4. Влияние ФРН в тестируемых формах на тремор, вызванный МФТП. Примечания: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) * по отношению к: # -группе пассивного контроля; *- группе «МФТП» (точный критерий Фишера).

Однократное введение МФТП мышам C57Bl/6 вызывает выраженную ригидность, которая характеризуется скованностью движений и достоверным укорочением длины шага. Субстанция ФРН, ФРН-НЧ, ФРН-ПС 80 и ПБЦА-НЧ достоверно не изменяют показатели ригидности, вызванные МФТП, у

мышей С57В1/6 (рис. 5), тогда как ФРН-ПБЦА-ПС 80, введенный в/в после МФТП, достоверно снижает ригидность у животных.

Таким образом, наносомальная форма ФРН проявляет выраженное противопаркинсоническое действие, существенно уменьшая основные проявления паркинсонического синдрома, что свидетельствует о проникновении ФРН в мозг экспериментальных животных.

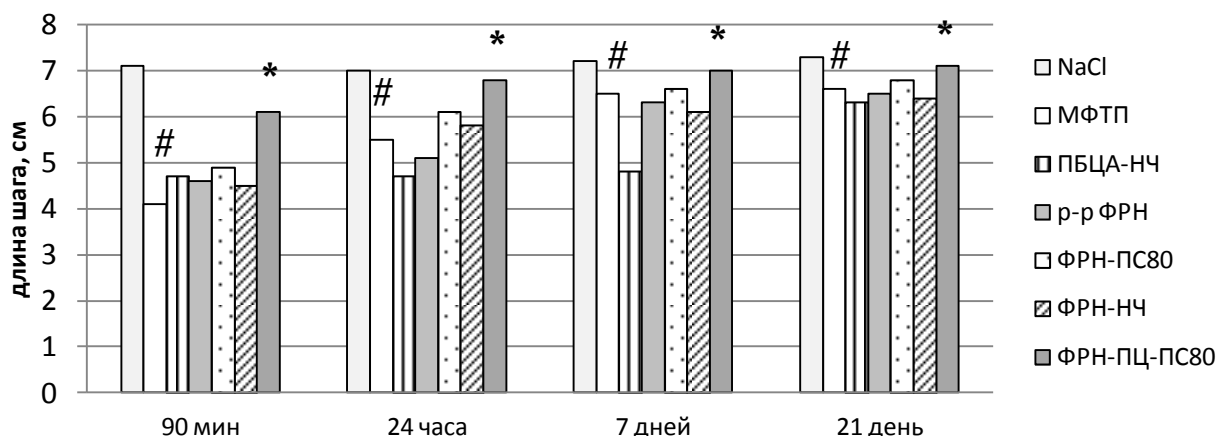


Рис.5. Влияние ФРН в тестируемых формах на ригидность, вызванную МФТП.

Примечания: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к: # -группе пассивного контроля; * - группе «МФТП» (t критерий Стьюдента).

2. Получение и исследование наносомальных форм низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека.

2.1. Получение наносомальных форм нсРЭЧ на основе ПБЦА и ПЛГА наночастиц.

Наносомальную форму получали путем сорбции нсРЭЧ на предварительно полученных и лиофильно высушенных НЧ плацебо. Из всех ПЛГА НЧ наиболее эффективно сорбировали нсРЭЧ НЧ с наивысшим отрицательным поверхностным зарядом (зета-потенциал нсРЭЧ в исходном растворе составляет $+10,5 \pm 1,52$ мВ). Так степень связывания нсРЭЧ частицами на основе Resomer 502Н, полученными в присутствии ЧСА, составляет более 80 % при поверхностном заряде НЧ $-30,1 \pm 1,56$ мВ. НЧ на основе ПБЦА достаточно эффективно сорбировали нсРЭЧ (более 70 % нсРЭЧ связано с НЧ). Физико-химические параметры НЧ, а также степень сорбции нсРЭЧ представлены в Таблице 1.

Из данных, представленных на рис.6 прослеживается очевидная тенденция зависимости эффективности сорбции нсРЭЧ от структуры выбранного полимера и типа стабилизатора. Так, если предварительное отделение НЧ от ПВС позволило существенно повысить эффективность сорбции на них нсРЭЧ, то отмывка НЧ от ЧСА существенно понижала ее.

Визуализацию полимерных наночастиц (Resomer 502Н) осуществляли методами РЭМ и АСМ. На рис. 7 видно, что НЧ имеют правильную

сферическую форму и узкое распределение по размерам. Первая (рис. 7а) микрофотография сделана сразу после приготовления образца. При более длительной выдержке образца на подложке происходит значительное увеличение размеров частиц и образование однородной массы полимера, что можно наблюдать на микрофотографии (рис. 7б), сделанной через 48 часов после приготовления.

Таблица 1 - Физико-химические характеристики НЧ и степень сорбции нсРЭЧ.

Полимер	ПАВ	Средний размер, нм	ξ -потенциал, мВ	Полидисперсность	Степень сорбции, %
ПЛА ($\eta=0,34$ г/л)	ПВС 0,5%	191,9 $\pm$ 2,05	-18,9 $\pm$ 2,05	0,103 $\pm$ 0,02	25,67 $\pm$ 2,6
ПЛА ($\eta=0,68$ г/л)	ПВС 0,5%	203,3 $\pm$ 1,2	-23,8 $\pm$ 2,34	0,086 $\pm$ 0,02	23,4 $\pm$ 2,0
Resomer 502H	ПВС 1%	140,9 $\pm$ 0,47	-5,04 $\pm$ 0,22	0,101 $\pm$ 0,01	69,4 $\pm$ 1,2
Resomer 502H	ЧСА 1%	90,09 $\pm$ 0,46	-30,1 $\pm$ 1,56	0,216 $\pm$ 0,01	81,07 $\pm$ 8,1
Resomer 752 H	ЧСА 1%	93,42 $\pm$ 0,73	-24,4 $\pm$ 2,3	0,196 $\pm$ 0,01	60,18 $\pm$ 6,0
ПБЦА	Д-70 1%	165,5 $\pm$ 1,44	-1,46 $\pm$ 0,27	0,107 $\pm$ 0,023	77,2 $\pm$ 6,0

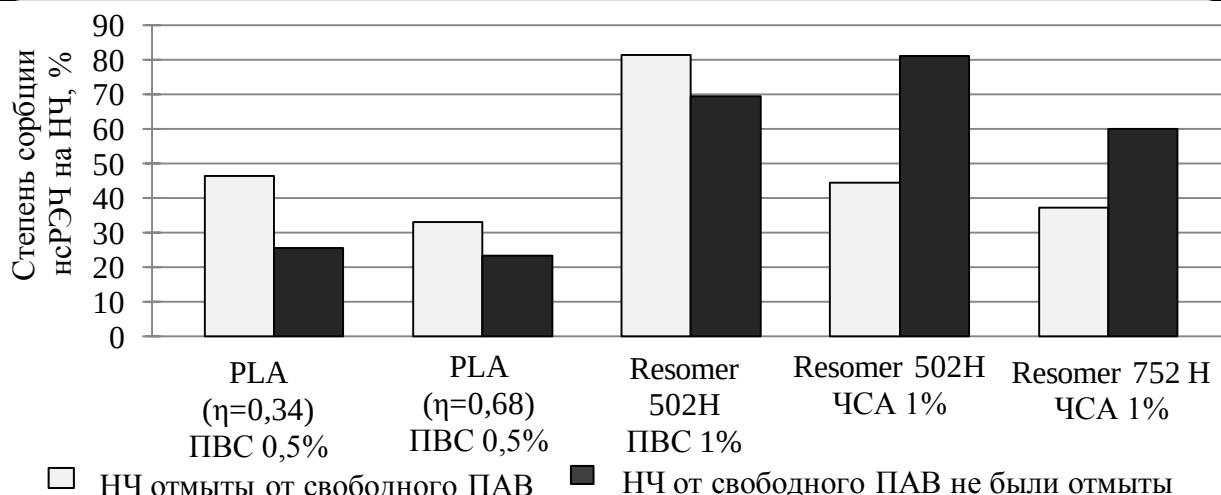


Рис.6. Влияние наличия свободного ПАВ в инкубационной среде на эффективность сорбции нсРЭЧ на различных видах НЧ. Примечание: по вертикали - степень сорбции нсРЭЧ на поверхности НЧ в %; по горизонтали – тип полимера и ПАВ.

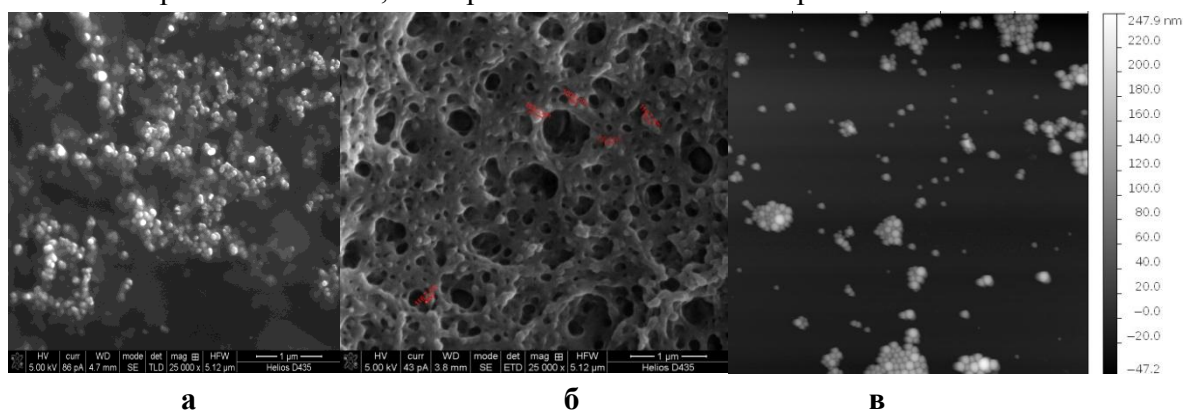


Рис.7. Микрофотографии ПЛГА наночастиц на основе полимера Resomer502H, полученные методом электронной микроскопии сразу после приготовления образца (а) и по прошествии 48 часов с момента приготовления (б); атомно-силовая микроскопия свежеприготовленного образца (в).

2.2. Количественное определение содержания нсРЭЧ в тканях мозга нелинейных мышей.

Для изучения возможности транспорта нсРЭЧ в ЦНС при системном введении измерили концентрацию нсРЭЧ в тканях мозга мышей после внутривенного введения нсРЭЧ в различных сочетаниях. Результаты представлены на рис.8.

Таким образом установлено, что ПБЦА-НЧ, модифицированные ПС 80, обеспечивают доставку нсРЭЧ через неповрежденный ГЭБ при внутривенном введении, достоверно повышая его концентрацию в тканях мозга мышей. Растворы нсРЭЧ и нсРЭЧ-ПС 80 увеличивали концентрацию нсРЭЧ в головном мозге, однако достоверности различий значений концентрации по сравнению с контрольной группой не установлено.

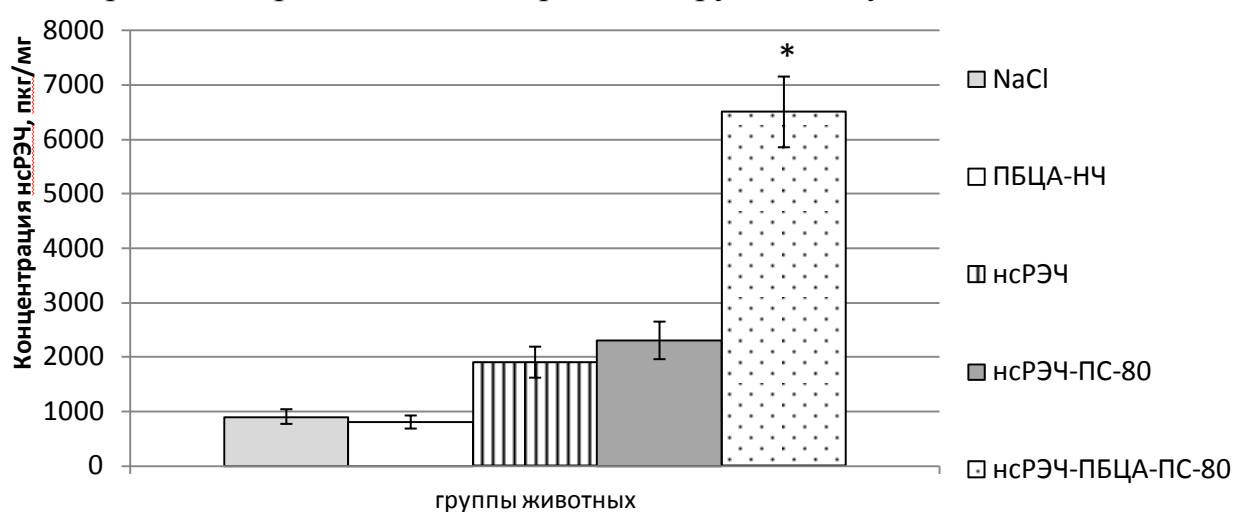


Рис.8. Концентрация нсРЭЧ в гомогенатах мозга мышей на 45 минуте после внутривенного введения нсРЭЧ в различных сочетаниях. Примечания: * - различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к группе контроля (t критерий Стьюдента).

2.3. Исследование влияния наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПБЦА наночастиц на экспрессию мРНК нейротрофических факторов NGF и BDNF в эксперименте in vivo.

Установлено, что нсРЭЧ, включенный в ПБЦА наночастицы в дозе 0,05 мг/кг (в/в) статистически достоверно увеличивал мРНК BDNF и мРНК NGF в гомогенатах тканей фронтальной коры крыс в 3,5 и 1,9 раза соответственно (рис.9 А). При оценке экспрессии генов исследуемых нейротрофинов в гиппокампе мозга крыс показано, что под действием нсРЭЧ, включенного в ПБЦА наночастицы, уровень мРНК BDNF увеличивался в 2,3 раза в сравнении с контролем, а уровень мРНК NGF - в 3,1 раза (рис.9 Б). Можно полагать, что увеличение экспрессии BDNF и NGF под действием нсРЭЧ, включенного в ПБЦА наночастицы, является одним из молекулярных механизмов его нейропротекторного действия.

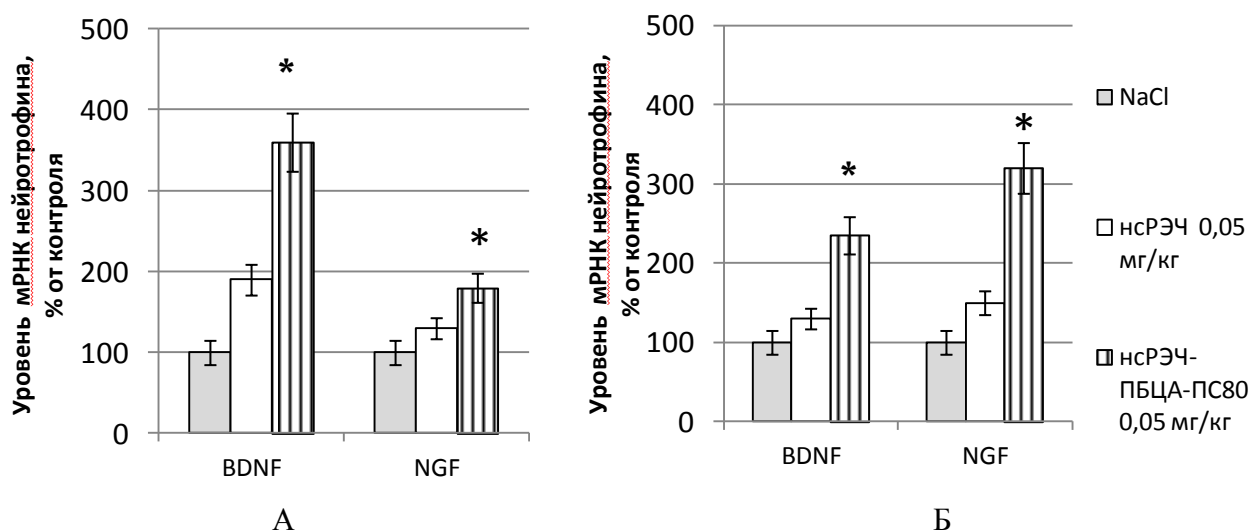


Рис.9. Влияние нсРЭЧ и нсРЭЧ, включенного в ПБЦА НЧ на экспрессию мРНК нейротрофических факторов BDNF и NGF в фронтальной коре (А) и гиппокампе (Б) крыс. Примечания: * - различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к группе нсРЭЧ (точный критерий Фишера)

2.4. Исследование нейропротекторных свойств наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПБЦА наночастиц на модели интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс.

Изучение динамики выживаемости крыс с ИПГ показало, что к 14-му дню наблюдения все ЛО крысы выжили, а в группе крыс с ИПГ выжило только 30% животных. На фоне повторного 3-х дневного введения нсРЭЧ, включенного в ПБЦА НЧ, к концу эксперимента выжило 75% крыс, что на 45% больше, чем в контрольной группе с ИПГ. Сходным, но менее выраженным действием, обладал нативный нсРЭЧ – на его фоне к 14-м суткам выжило 64% крыс (рис. 10).

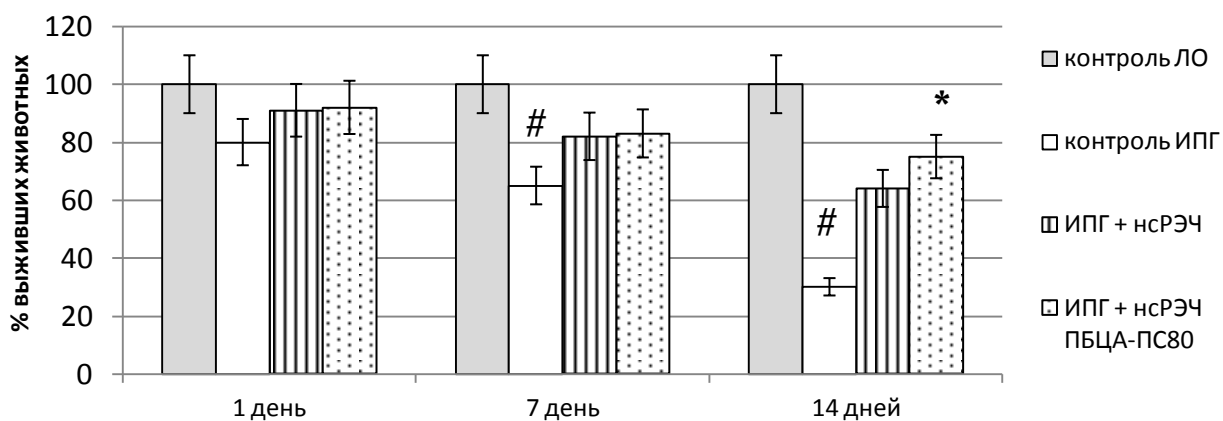


Рис. 10. Влияние нсРЭЧ на выживаемость крыс с ИПГ. Примечание: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к: #-группе ЛО; * - группе ИПГ (точный критерий Фишера).

Изучение динамики неврологических нарушений показало, что у ЛО животных тяжелых неврологических нарушений не наблюдалось. В группе крыс с ИПГ парезы, манежные движения, параличи развивались у 20-40%

крыс. При введении раствора нсРЭЧ наблюдалась лишь тенденция ослабления этих нарушений. нсРЭЧ, включенный в ПБЦА наночастицы, модифицированные ПС 80, достоверно ослаблял тяжелые проявления неврологического дефицита у крыс с ИПГ (рис. 11).

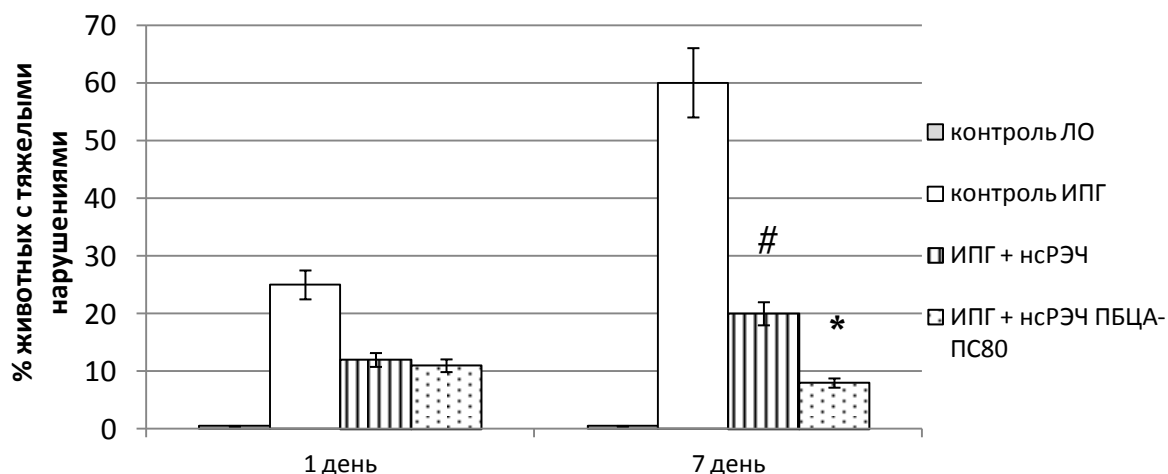


Рис. 11. Влияние нсРЭЧ на развитие тяжелых неврологических нарушений у крыс с ИПГ. Примечание: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к: #-группе ЛО; * - группе ИПГ (точный критерий Фишера).

Изучение влияния веществ на обучение УРПИ у крыс с ИПГ показало, что нсРЭЧ, включенный в ПБЦА наночастицы, предупреждал развитие амнезии УРПИ, увеличивая количество животных, осуществляющих рефлекс до 70%. Раствор нсРЭЧ обладал менее выраженным антиамнестическим действием (рис.12).

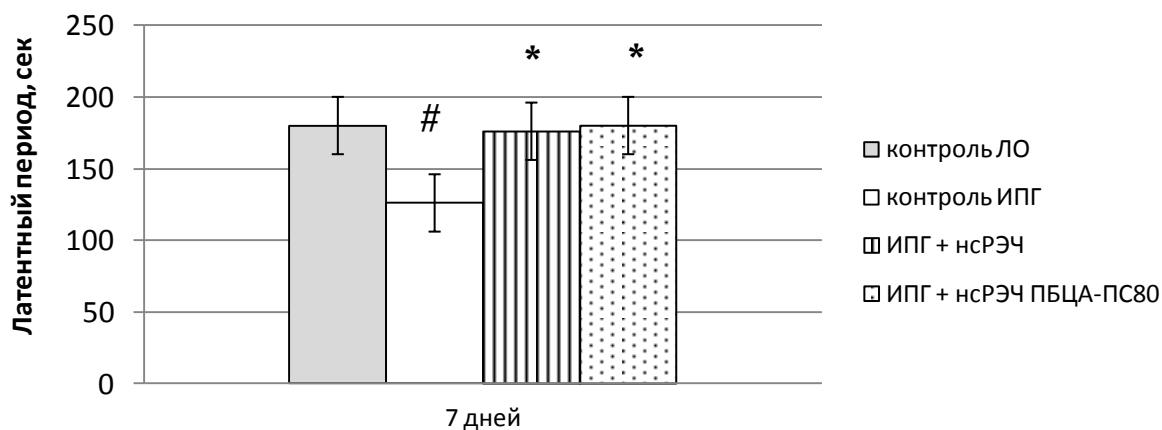


Рис. 12. Влияние веществ на обучение УРПИ крыс с ИПГ. Примечание: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к: #-группе ЛО; * - группе ГИ (t критерий Стьюдента).

2.5. *Исследование нейропротекторных свойств наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПЛГА наночастиц на модели интрацеребральной посттравматической гематомы у крыс.*

Изучение динамики выживаемости крыс с ИПГ показало, что к 7-му дню наблюдения все ЛО крысы выжили, а в группе крыс с ИПГ выжило только

30% животных. На фоне повторного 3-х дневного введения нсРЭЧ, включенного в ПЛГА наночастицы, покрытые Р 188, к концу эксперимента выжило 77,8% крыс, что на 37,8% больше, чем в контрольной группе животных с ИПГ. Полученные данные свидетельствуют о выраженном протекторном эффекте наносомальной формы нсРЭЧ. Менее выраженным эффектом обладал нативный нсРЭЧ – на его фоне к 7-м суткам выжило 52,6% крыс (рис. 13).

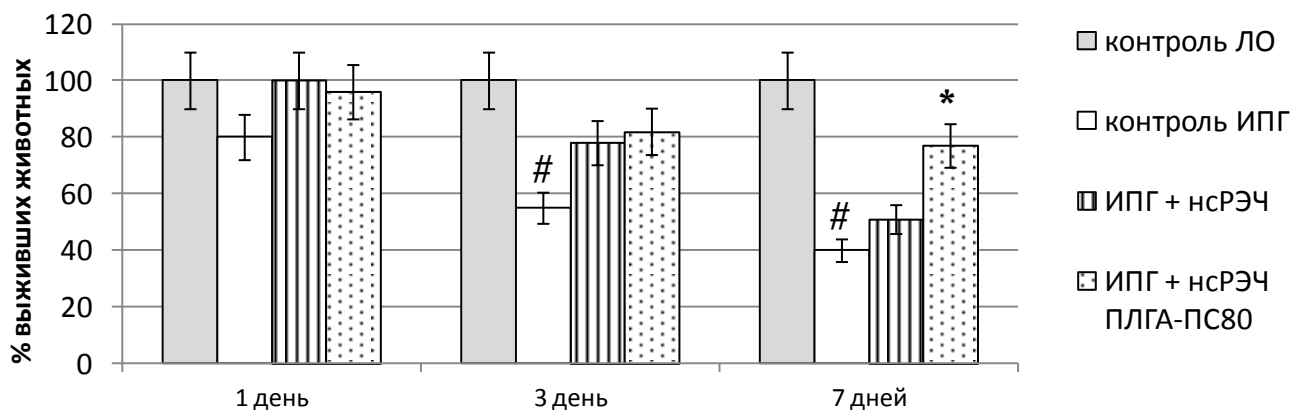


Рис. 13. Влияние нсРЭЧ, сорбированного на ПЛГА НЧ, модифицированных полоксамером 188 на выживаемость крыс с ИПГ. Примечания: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к: #-группе ЛО; * - группе ИПГ (точный критерий Фишера).

Изучение динамики неврологических нарушений показало, что у ЛО животных тяжелых неврологических нарушений не наблюдалось. В группе крыс с ИПГ парезы, манежные движения, параличи развивались у 37,5% животных. При введении раствора нсРЭЧ существенных ослаблений указанных нарушений не наблюдалось. нсРЭЧ, включенный в ПЛГА НЧ, модифицированные Р 188, достоверно уменьшал количество животных с тяжелым неврологическим дефицитом до 7,14% (рис. 14).

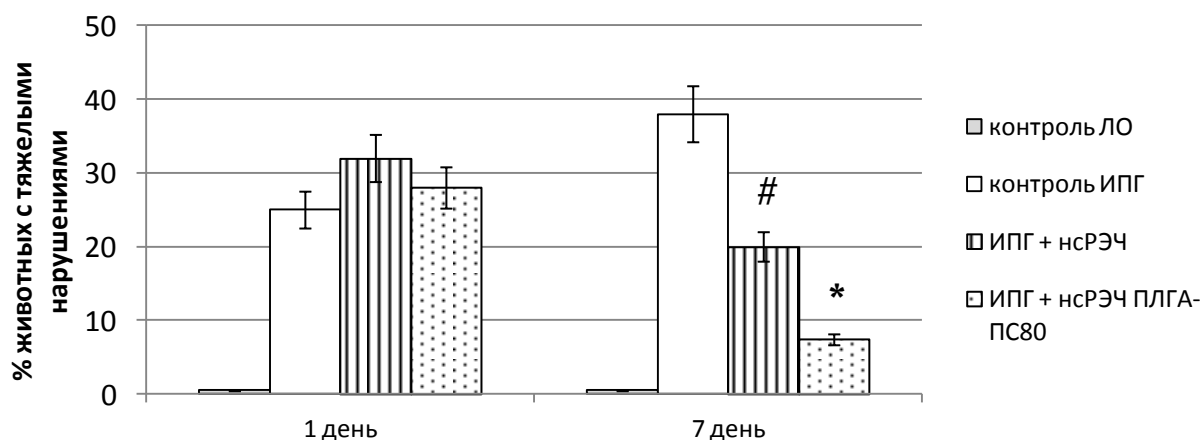


Рис. 14. Влияние нсРЭЧ, сорбированного на ПЛГА НЧ, модифицированных полоксамером 188 на развитие тяжелых неврологических нарушений у крыс с ИПГ. Примечание: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к: #-группе ЛО; * - группе ИПГ (точный критерий Фишера).

Изучение влияния веществ на обучение УРПИ у крыс с ИПГ показало, что при воспроизведении через 7 дней после обучения нсРЭЧ-ПЛГА-Р188 предупреждал развитие амнезии у крыс с ИПГ. В группе животных с ИПГ, получавших нсРЭЧ, отмечалась лишь тенденция к увеличению числа животных, осуществлявших рефлекс по сравнению с контрольной группой (рис. 15).

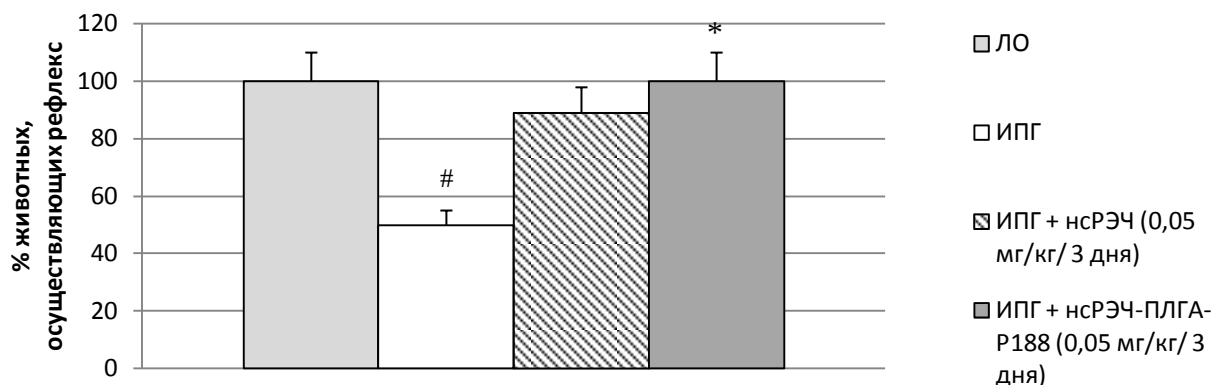


Рис. 15. Влияние нсРЭЧ, сорбированного на ПЛГА НЧ, модифицированных полоксамером 188 на воспроизведение УРПИ у крыс с ИПГ. Примечание: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к: #-группе ЛО; * - группе ИПГ (точный критерий Фишера).

Морфометрические исследования объема повреждений зоны мозга показали, что у контрольной группы крыс с ИПГ наблюдалось значительное повреждение тканей мозга объемом в среднем $17,49 \pm 4,94 \text{ мм}^3$, тогда как у ЛО животных заметных повреждений отмечено не было. В группе крыс, получавших нсРЭЧ ПЛГА НЧ (0,05 мг/кг/3 дня, в/в), объем очага поражения был значительно меньше и составлял $5,01 \pm 1,9 \text{ мм}^3$ ($p < 0,05$). Коэффициент эффективности защиты у крыс с ИПГ, которым вводили нсРЭЧ ПЛГА НЧ составил 71,36%, что свидетельствует о высокой протекторной активности препарата. На рис. 16 представлены срезы головного мозга крыс с ИПГ в области наибольшего повреждения. Видно, что у крыс с ИПГ, получавших наносомальную форму нсРЭЧ (справа), область поражения (темно-синяя окраска) значительно меньше, чем у контрольных крыс с ИПГ (слева).

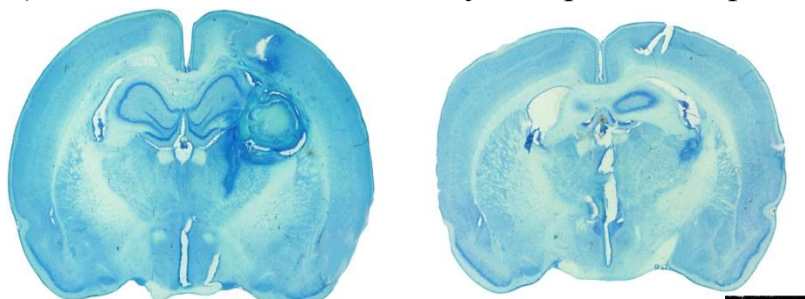


Рис. 16. Сравнение максимальной зоны повреждения у крыс с ИПГ на срезах мозга, окрашенных метиленовым синим, масштаб 3 мм.

2.6. Изучение влияния наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПЛГА наночастиц на эритропоэз.

Подсчет числа ретикулоцитов в крови (рис. 17) показал, что РЭЧ (Эральфон®) статистически достоверно увеличивает гемопоэз при обоих способах введения в дозе 5000 МЕ, тогда как нсРЭЧ на ПЛГА НЧ в эквивалентной дозе не вызывал увеличения числа красных кровяных клеток у крыс. Полученные данные свидетельствуют об отсутствии возможности возникновения эритроцитоза и ассоциированного с ним риска тромбообразования при терапии нсРЭЧ, сорбированным на ПЛГА НЧ.

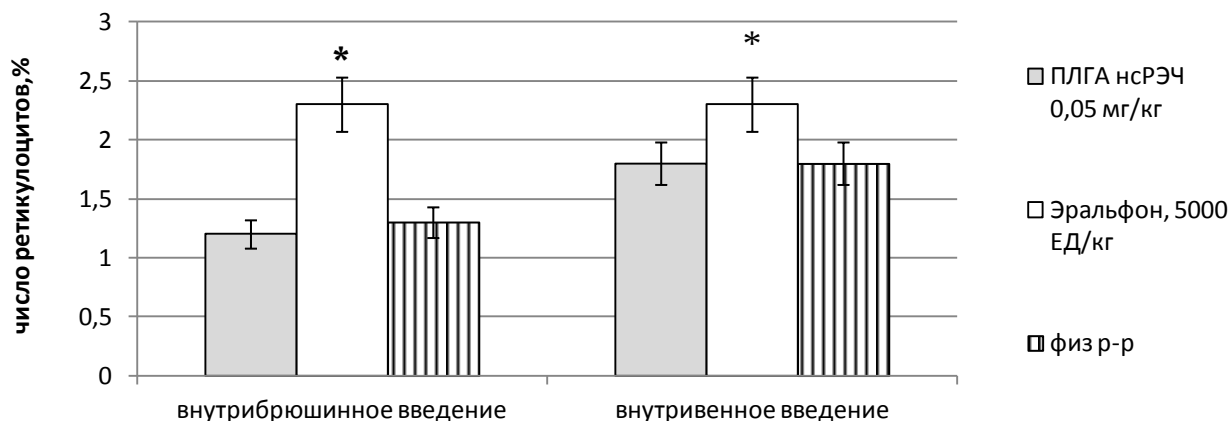


Рис. 17. Влияние РЭЧ и нсРЭЧ ПЛГА НЧ на кроветворение у крыс. Примечания: * - различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к группе, получившей физ.р-р (t критерий Стьюдента).

Таким образом, нсРЭЧ, сорбированный как на ПЛГА, так и ПБЦА НЧ оказал выраженный протекторный эффект при ИПГ, проявляющийся в уменьшении гибели животных, снижении неврологических дефицитов и восстановлении нарушенной памяти.

3. Получение и исследование наносомальной формы феназепама.

3.1. Получение наносомальной формы феназепама на основе ПБЦА наночастиц.

НЧ с феназепамом получали методом кислотной полимеризации в среде, содержащей декстран 70000 в качестве стабилизатора. Установлено, что оптимальная скорость перемешивания при полимеризации составляет 500 об/мин, оптимальным стабилизатором является декстран-70 в концентрации от 0,5% до 2,5%. Выявлена зависимость между значением pH полимеризационной среды и размерами полученных ПБЦА НЧ – размер ПБЦА НЧ возрастает при понижении pH от 3 до 1,9.

Средний размер наночастиц с феназепамом составил $230,9 \pm 3,54$ нм; степень включения феназепама – $65,5 \pm 7,3$ %.

3.2. Изучение фармакологических эффектов наносомальной формы феназепама.

В ходе сравнительного изучения спектра нейropsychотропной активности наносомальной формы феназепама и субстанции выявлено, что наносомальная форма феназепама обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и противосудорожным действием, не уступающим по активности феназепаму в субстанции однако в отличие от феназепама в субстанции в терапевтическом диапазоне доз (0,5-2,0 мг/кг) не обладает седативным и миорелаксирующим действием (рис. 18).

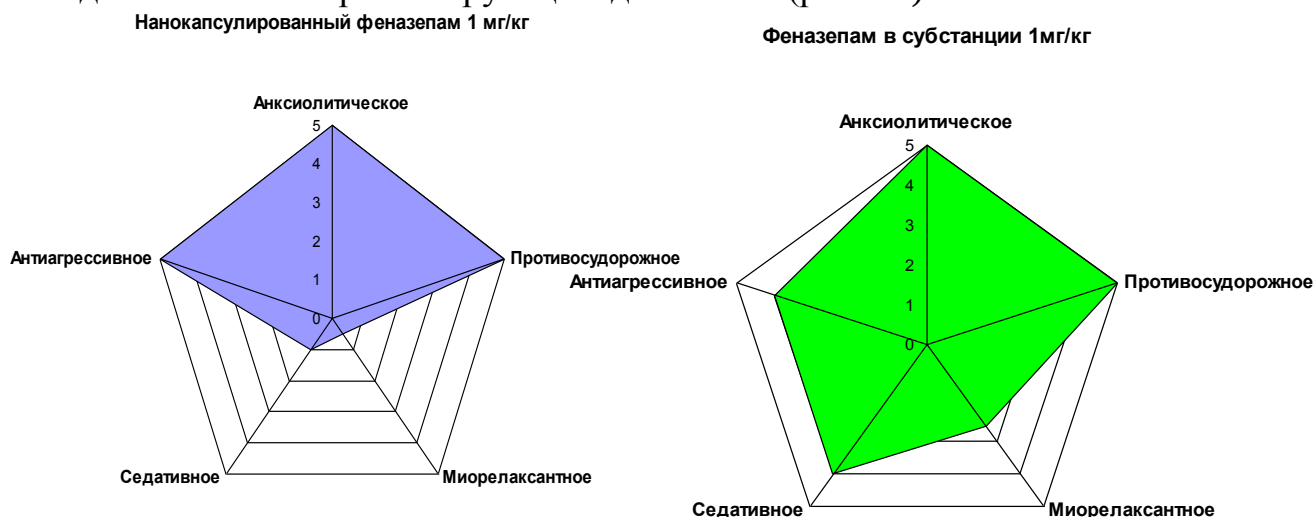


Рис. 18. Сравнительный фармакологический спектр наносомальной (нанокapsулированной) формы феназепама и феназепама в субстанции в дозе 1 мг/кг.

3.3. Изучение рецепторного связывания феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы с бензодиазепиновыми рецепторами мозга в условиях *in vitro* и *ex vivo*.

С целью изучения механизма действия наносомальной формы феназепама исследовали рецепторное связывание ФЕН-ПБЦА-ПС80 с бензодиазепиновыми рецепторами мозга в условиях *in vitro* и *ex vivo*.

Результаты сравнения динамики специфического связывания и величин IC_{50} двух серий экспериментов в условиях *in vitro* представлены на рис.19А. Как ФЕН, так ФЕН-ПБЦА-ПС 80 вмешиваются в процесс связывания [N-метил- 3H]-флунитразепама с рецепторами гиппокампа с близкими величинами 2,8 и 6,6 нмоль/л. Полученные данные свидетельствуют о том, что включение феназепама в ПБЦА наночастицы не изменяет способности феназепама специфически связываться с БДЗ-рецепторами мозга.

Результаты изучения состояния БДЗ-рецепторов после 5-кратного внутривенного введения ФЕН и ФЕН-ПБЦА-ПС 80 представлены на рис.19Б. Эффекты обоих веществ описываются классическим кривыми насыщения, указывающими на монотонное и моноцентрическое связывание лиганда. При этом, обе экспериментальные кривые лежат существенно выше, чем в контрольной группе.

А

Б

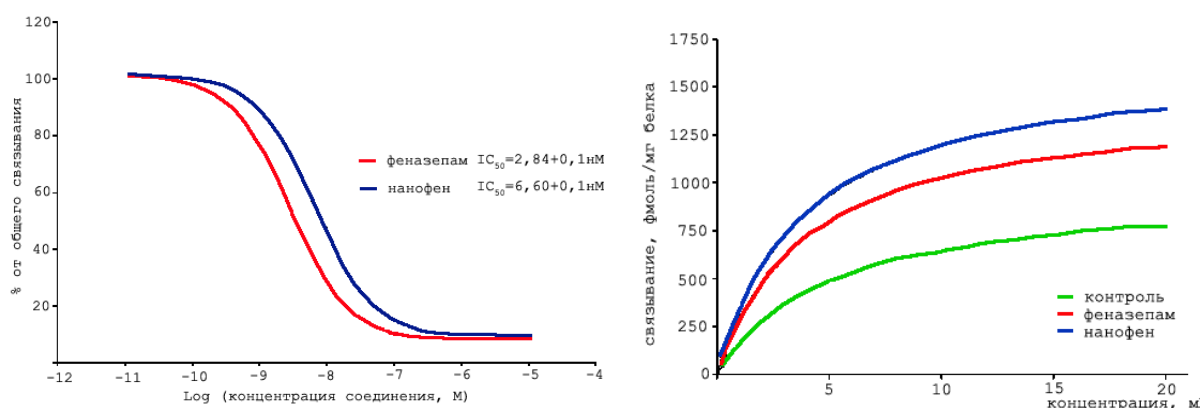


Рис. 19. А. Влияние ФЕН и НаноФен (ФЕН-ПБЦА-ПС80) на связывание [N-метил-³H] флунизтазема мембранами гиппокампа крыс *in vitro*. Б. Влияние субхронического введения ФЕН (1 мг/кг, 5 дней) и НаноФен (ФЕН-ПБЦА-ПС80) (1 мг/кг, 5 дней) на характеристики радиолигандного связывания с мембранами гиппокампа крыс *ex vivo*.

Количественные параметры рецепторного связывания приведены в табл. 2. Из представленных данных следует, что при субхроническом введении феназепама и его наносомальной формы изменениям подвергаются обе константы, описывающие состояние БДЗ-рецепторов: во-первых, величины констант диссоциации K_d уменьшаются в обеих группах на 22% ($p < 0.01$), что интерпретируется как возрастание степени структурного сродства рецептора к лиганду ([N-метил-³H]-флунизтазему); во-вторых, возрастают величины B_{max} , отражающие плотность мест связывания лиганда. Таблица 2 - Характеристики рецепторного связывания ФЕН и ФЕН-ПБЦА-ПС 80 с бензодиазепиновыми рецепторами гиппокампа крыс после субхронического введения (1 мг/кг/день*5) *ex vivo*.

Группы	B_{max}		K_d	
	(фмоль/мг белка)	(% к контролю)	(нмоль/л)	(% к контролю)
Контроль	975±17	100±2%	5,02±0,23	100±5%
ФЕН	1427±28*	146±3%	3,94±0,22*	78±4%
ФЕН-ПБЦА-ПС 80	1662±44*/ #	170±5%	3,92±0,30*	78±6%

Примечания: различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к: # - контрольной группе; * - группе ФЕН (t критерий Стьюдента).

4. Получение и исследование наносомальной формы паклитаксела.

4.1. Получение наносомальной формы паклитаксела на основе ПЛГА наночастиц.

Методом гомогенизации получена наносомальная форма паклитаксела на основе ПЛГА наночастиц (Resomer 502 H, стабилизатор 1% ПВС) со средним размером частиц – $145,6 \pm 2,11$ нм; процентом включения паклитаксела – $95,7 \pm 2,2$ %.

4.2. Исследование накопления наночастиц в высокорезистентных клетках Jurkat WT.

Для изучения возможности проникновения НЧ в высокорезистентные

клетки Jurkat WT было проведено микроскопическое исследование. После инкубации клеток с ПЛГА НЧ, мечеными кумарином-6, наблюдается интенсивная флуоресценция НЧ. Флуоресценция наблюдается как вокруг ядер, так и в самих ядрах (рис. 20), что указывает на захват клетками Jurkat WT меченых наночастиц. При наложении первых двух изображений четко видно расположение наночастиц относительно ядер.

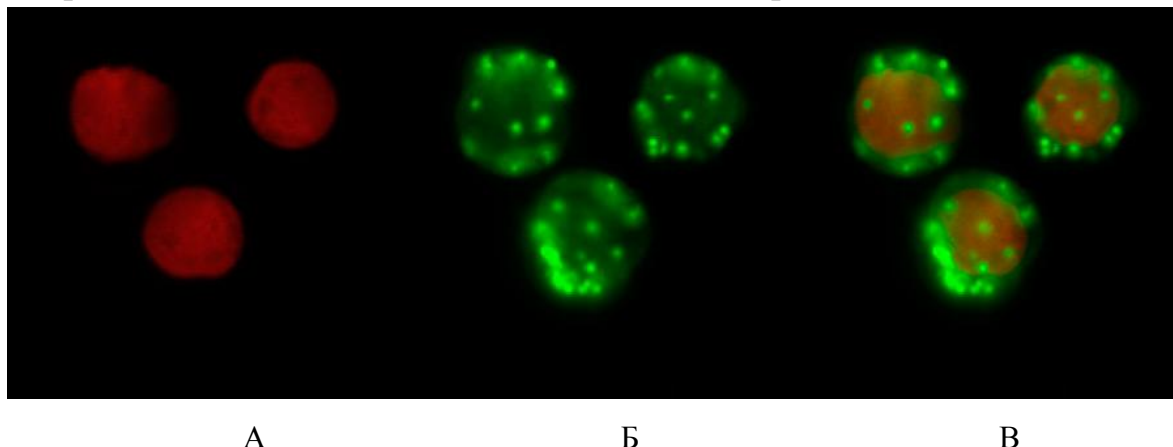


Рис. 20. Флуоресценция ПЛГА наночастиц в клетках Jurkat WT. Клеточные ядра окрашены пропидия йодидом (красного цвета) (А). НЧ с флуоресцентным кумарином-6 зеленого цвета (Б). Наложение первых двух рисунков представленных на рисунке (В). Увеличение 62 раза.

Проведенная сравнительная флуоресцентная микроскопия внутриклеточного распределения ПЛГА НЧ и ПЛГА НЧ с поверхностью, модифицированной Р 188, выявила, что интенсивная флуоресценция НЧ, покрытых Р 188, наблюдается как в цитоплазме, так и в самих ядрах клеток Jurkat WT (рис 21Б), тогда как флуоресценция обычных НЧ наблюдается преимущественно вокруг клеточных ядер (рис. 21А). Полученные результаты свидетельствуют о способности ПЛГА НЧ проникать в клетки Jurkat WT.

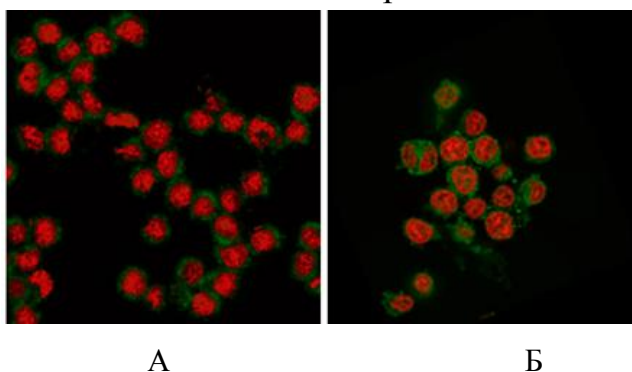


Рис. 21. Внутриклеточное распределение наночастиц в клетках Jurkat WT. Клетки Jurkat WT инкубированы с: (А) ПЛГА НЧ, мечеными кумарином-6; (Б) ПЛГА НЧ, мечеными кумарином-6 с модифицированной Р 188 поверхностью.

4.3. Изучение цитотоксической активности наносомальной формы паклитаксела в МТТ тесте пролиферативной активности клеток Jurkat WT.

Цитотоксическую активность различных форм паклитаксела оценивали в МТТ – тесте пролиферативной активности клеток в диапазоне концентрации от 10^{-6} до 10^{-4} М.

В МТТ тесте раствор паклитаксела в диапазоне концентрации от $1 \cdot 10^{-6}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ М не достигал ИК₅₀ (рис. 22). При этом процент клеток, сохранивших жизнеспособность, превысил 100%, что свидетельствует об отсутствии цитотоксической активности раствора паклитаксела в отношении клеток Jurkat WT. ПЛГА НЧ с паклитакселом достигали ИК₅₀ – процент выживших клеток в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М составил 40 %, а в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М – 34 %. Наиболее выраженную цитотоксическую активность проявили ПЛГА НЧ с паклитакселом, модифицированные Р 188 - процент выживших клеток в концентрации $1 \cdot 10^{-5}$ М составил 35 %, а в концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ М – 25 %.

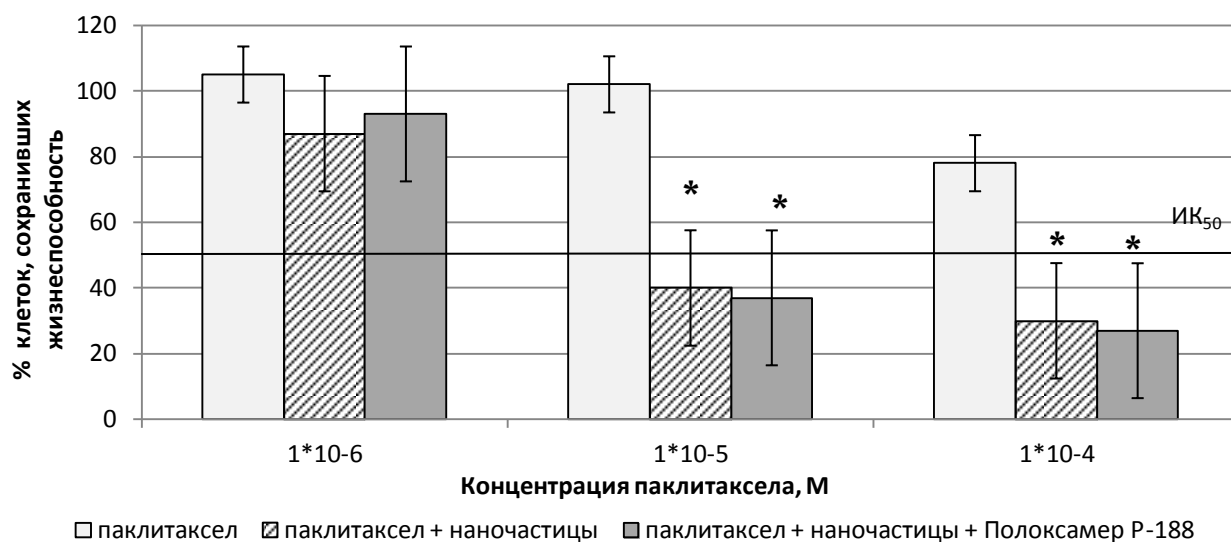


Рис. 22. Цитотоксичность различных форм паклитаксела в МТТ тесте. Примечание: * - различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к группе паклитаксела (точный критерий Фишера).

Цитотоксическая активность считается высокой, если препарат в диапазоне низких концентраций (10^{-5} - 10^{-4} М) подавляет не менее 50% клеточной биомассы [«Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», 2005]. Таким образом, наносомальная форма паклитаксела обладает выраженной цитостатической активностью в отношении высокорезистентных клеток Jurkat WT тогда как как стандартная форма паклитаксела подобного эффекта в низком диапазоне концентраций не оказывает.

4.4. Изучение противоопухолевой активности наносомальной формы паклитаксела на модели аденокарциномы Ca755 у мышей линии C57BL/6.

Результаты определения продолжительности жизни мышей линии C57BL/6 на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 представлены на рис. 23. СПЖ нелеченых животных с опухолью составила 23 дня. Паклитаксел в диапазоне доз от 7,5 мг/кг до 15 мг/кг (трехкратно в хвостовую вену на 3, 5 и 7 день после перевивки опухоли) не оказывал существенного влияния на СПЖ животных. Так, УПЖ животных на фоне введения паклитаксела составило от 0,8 % в дозе 7,5 мг/кг до 7,1 % в дозе 15 мг/кг. Выраженный противоопухолевый эффект был достигнут только в группе животных, леченных наносомальной формой паклитаксела. В указанной группе отмечено статистически значимое увеличение продолжительности жизни как по сравнению с нелеченым контролем (УПЖ от 48,9 % до 71,1 %), так и по сравнению с группой, получавшей эквивалентные дозы паклитаксела.

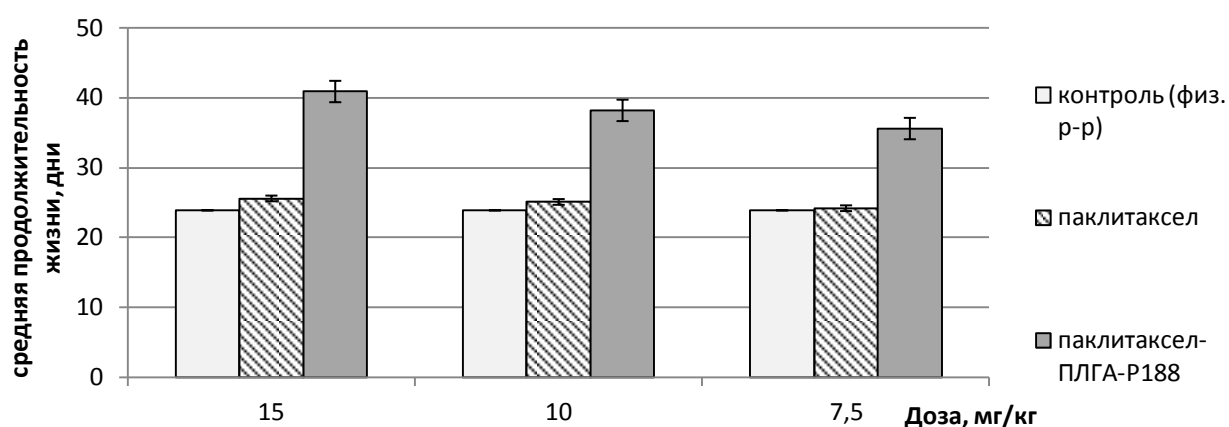


Рис. 23. Влияние наносомальной и стандартной форм паклитаксела на среднюю продолжительность жизни мышей линии C57BL/6 с аденокарциномой молочной железы Ca 755. Примечание: * - различия статистически достоверны ($p \leq 0.05$) по отношению к контрольной группе (t критерий Стьюдента).

Увеличение продолжительности жизни на 25% и более считается показателем терапевтической эффективности тестируемого вещества [«Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», 2012]. На основании этого можно заключить, что наносомальная форма паклитаксела по показателю «увеличение продолжительности жизни» оказала выраженный дозозависимый противоопухолевый эффект в отношении аденокарциномы молочной железы, тогда как стандартная форма подобным эффектом не обладала. Результаты влияния тестируемых форм паклитаксела на рост опухоли представлены на рис. 24.

Активными в противоопухолевом отношении считаются дозы препаратов, вызывающие торможение роста опухоли $\geq 70\%$ продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения [«Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных

средств», 2012]. Анализируя противоопухолевое действие тестируемых форм паклитаксела, можно отметить, что по показателю ТРО наносомальная форма проявила эффективность во всех трех экспериментальных дозах. При этом выраженный эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения, что обусловлено постепенной биodeградацией наночастиц и выходом из них паклитаксела. Стандартная форма паклитаксела тормозила рост опухоли, однако показатель ТРО находился в диапазоне от 40,8 до 4,3 %, тогда как для наносомальной формы этот показатель составил от 94,3 до 75,2 %.

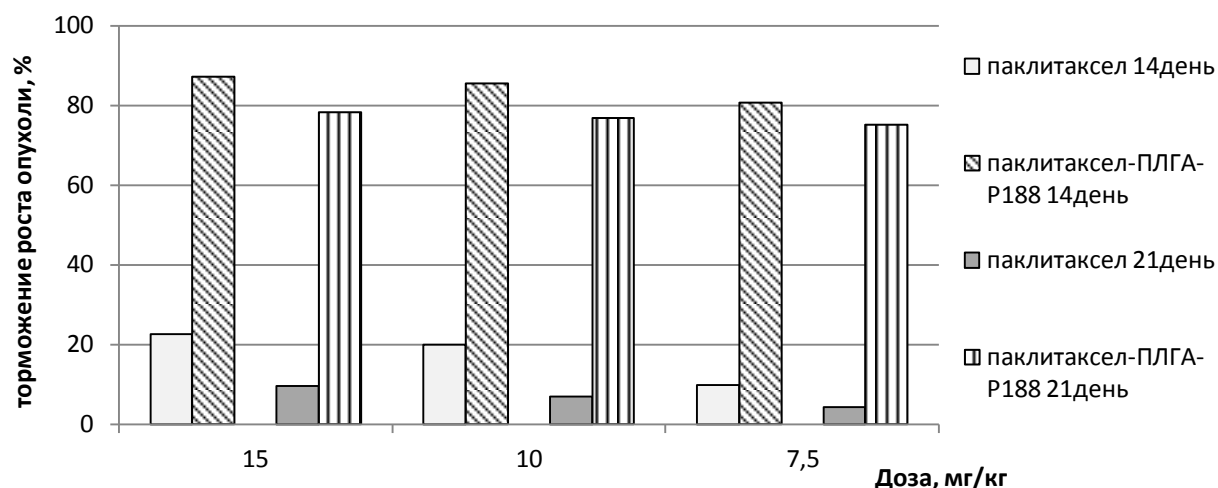


Рис. 24. Влияние наносомальной и стандартной форм паклитаксела на торможение роста аденокарциномы молочной железы Са 755 у мышей линии С57ВL6.

Обобщая экспериментальные данные, можно заключить, что наносомальная форма паклитаксела оказывает выраженный цитостатический и противоопухолевый эффекты в отношении резистентных опухолей. В свою очередь, выявленный эффект является результатом проникновения паклитаксела в опухолевые клетки, экспрессирующие Р-гликопротеин. Существенную роль в этом процессе играет полоксамер 188, применяемый для модификации поверхности наночастиц. Известно, что Р188 и ПС 80 индуцирует конформационные изменения, приводящие к снижению сродства Р-гр к лекарственным веществам и АТФ, а также вызывает внутриклеточное снижение АТФ необходимое для функционирования системы Р- gr [Schmidt et. al., 2003]. Полученные нами результаты коррелируют с данными [Vauthier S., 2008] о способности полибутилцианоакрилатных наночастиц, покрытых ПС 80, обеспечивать транспорт доксорубина в резистентные опухолевые клетки.

5. Изучение проникновения наночастиц через гематоэнцефалический барьер.

5.1. Изучение проникновения наночастиц через ГЭБ в эксперименте *in vitro*.

Моделирование гематоэнцефалического барьера осуществляли

посредством кокультивирования первичной монослойной культуры эндотелиоцитов пупочной вены человека (HUVEC) и аллогенных астроцитов на полупроницаемых вставках Transwell® для индуцирования барьерных функций (рис. 25)

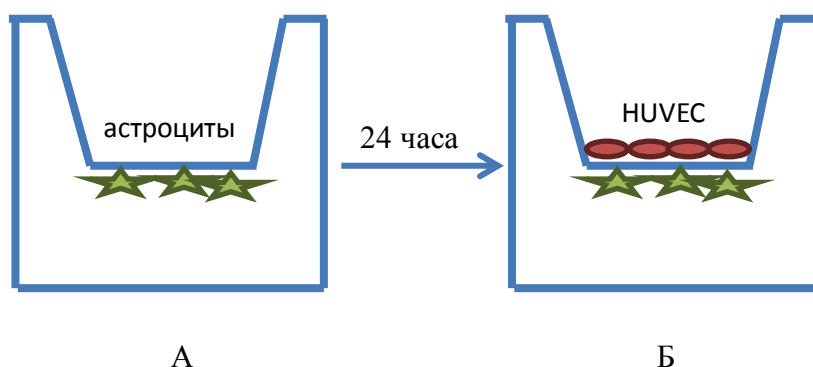


Рис. 25. Схема кокультивирования эндотелиоцитов с астроцитами. (А) На нижнюю поверхность мембраны высаживают астроциты; (Б) Через 24 часа на верхнюю поверхность – эндотелиоциты (HUVEC).

В качестве одного из критериев конфлюентности образовавшегося монослоя измеряли трансэндотелиальное сопротивление, максимальное значение которого у эндотелиоцитов детектировалось на 10-ый день кокультивирования с астроцитами и составило 34 Ом*см². Наряду с измерением трансэндотелиального сопротивления оценивали проницаемость монослоя эндотелия для флуоресцеина натрия – низкомолекулярного гидрофильного трейсера для определения параклеточного транспорта, который характеризуется низкой проницаемостью через ГЭБ [Eigenmann D.E., 2013]. Измеренные показатели проницаемости для флуоресцеина натрия показали, что в условиях культивирования эндотелиальных клеток с аллогенными астроцитами средняя величина проницаемости Papp составляет $4,06894 \pm 0,8392 \times 10^{-6}$ см/сек, что сопоставимо с литературными данными и свидетельствует о качественно сформированной модели ГЭБ [Deli M.A., 2005; Eigenmann D.E., 2013].

Таблица 3 - Коэффициент проницаемости (Papp), рассчитанный для контрольных веществ.

Вещество	Коэффициент проницаемости (Papp) 10 ⁻⁶ см/сек
Родамин 123	2,543±0,6957
Флуоресцеин натрия	4,06894±0,8392

Возможное участие систем обратного очистительного транспорта, в частности Р-gr, оценивали в процессе прохождения исследуемых препаратов через систему клеток HUVEC и астроцитов. С этой целью измеряли транспорт родамина 123, который является субстратом Р-gr [Yang L., 2012; Palmeria A., 2012] через монослой эндотелиальных клеток при совместном

культивировании с аллогенными астроцитами. В таблице 3 представлены коэффициенты проницаемости контрольных веществ.

Изучение способности наночастиц проникать через сформированный ГЭБ выявило, что наибольшим коэффициентом проницаемости обладают ПЛГА наночастицы размером 150 нм, растворенные в 1% растворе Р 85, где P_{app} составил $29,43 \pm 5,278 \times 10^{-6}$ см/сек, что в 7 раз выше проницаемости для натрия флуоресцеина. Также достаточно активно через ГЭБ проникают ПБЦА НЧ размером 190 нм, растворенные в ПС 80, для которых коэффициент проницаемости составил $18,3 \pm 4,37 \times 10^{-6}$ см/сек и ПЛГА наночастицы, растворенные в Р 188 (P_{app} $18,81 \pm 3,740 \times 10^{-6}$ см/сек). Слабой способностью проникать через ГЭБ обладают ПЛГА НЧ, растворенные в воде для инъекций (P_{app} $4,04955 \pm 0,8451 \times 10^{-6}$ см/сек) (рис. 26).

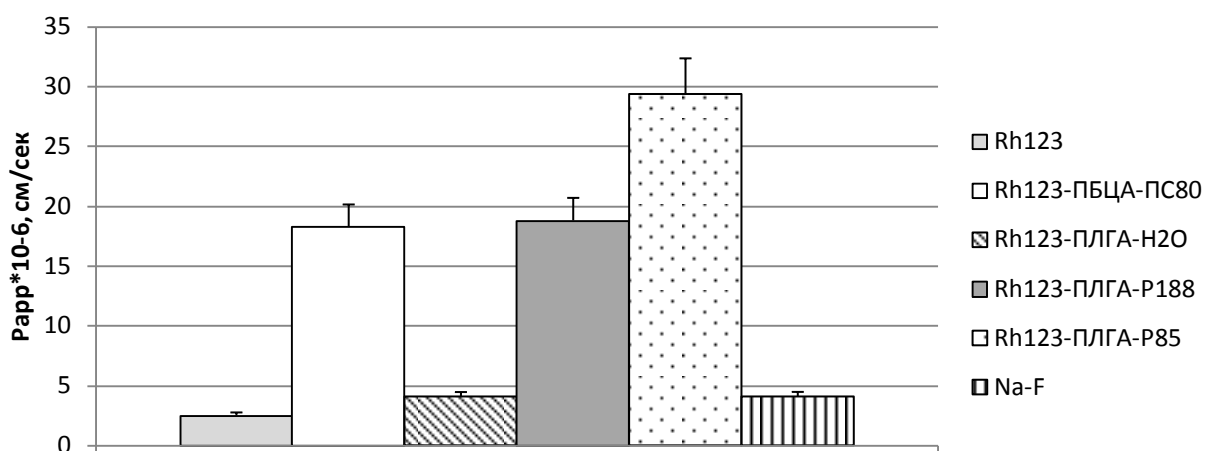


Рис. 26. Сопоставление коэффициентов проницаемости для ПЛГА и ПБЦА наночастиц в различных растворителях, нагруженных родамином 123.

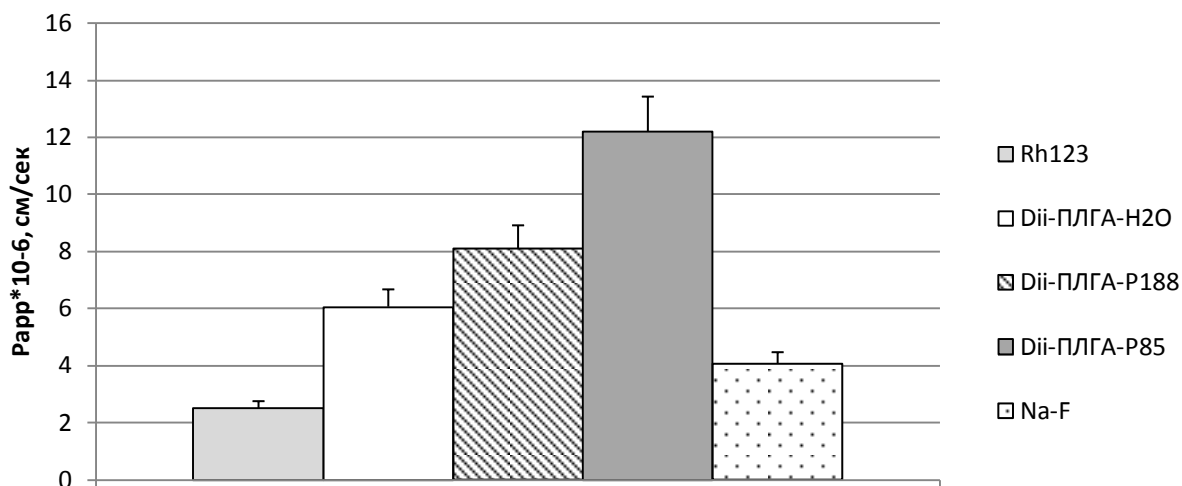


Рис. 27. Сопоставление коэффициентов проницаемости для ПЛГА НЧ с размером 150 нм в различных растворителях, нагруженных красителем Dil.

В группе ПЛГА НЧ с размером 150 нм, нагруженных красителем Dil, наибольшие значения коэффициента проницаемости также наблюдались у

наночастиц, растворенных в 1% растворе Р 85 ($\text{Papp } 12,226 \pm 3,147 \times 10^{-6}$ см/сек). Также следует отметить, что в этой группе отмечалась повышенная проницаемость у частиц, растворенных в 1% растворе Р 188, для которых коэффициент проницаемости составил $8,1013 \pm 1,044 \times 10^{-6}$ см/сек. В обоих случаях значения коэффициента проницаемости были выше по сравнению с НЧ, растворенными в воде для инъекций и контролями (рис. 27).

5.2. Изучение проникновения наночастиц через ГЭБ в эксперименте *in vivo*.

Флюориметрический анализ. Флюориметрия мозга мышей Balb/c через 2 ч после введения ПЛГА наночастиц, меченых DiI в 1% растворе Р 188, показала более интенсивный флуоресцентный сигнал по сравнению с аналогичными частицами, разведенных в PBS (рис. 28).

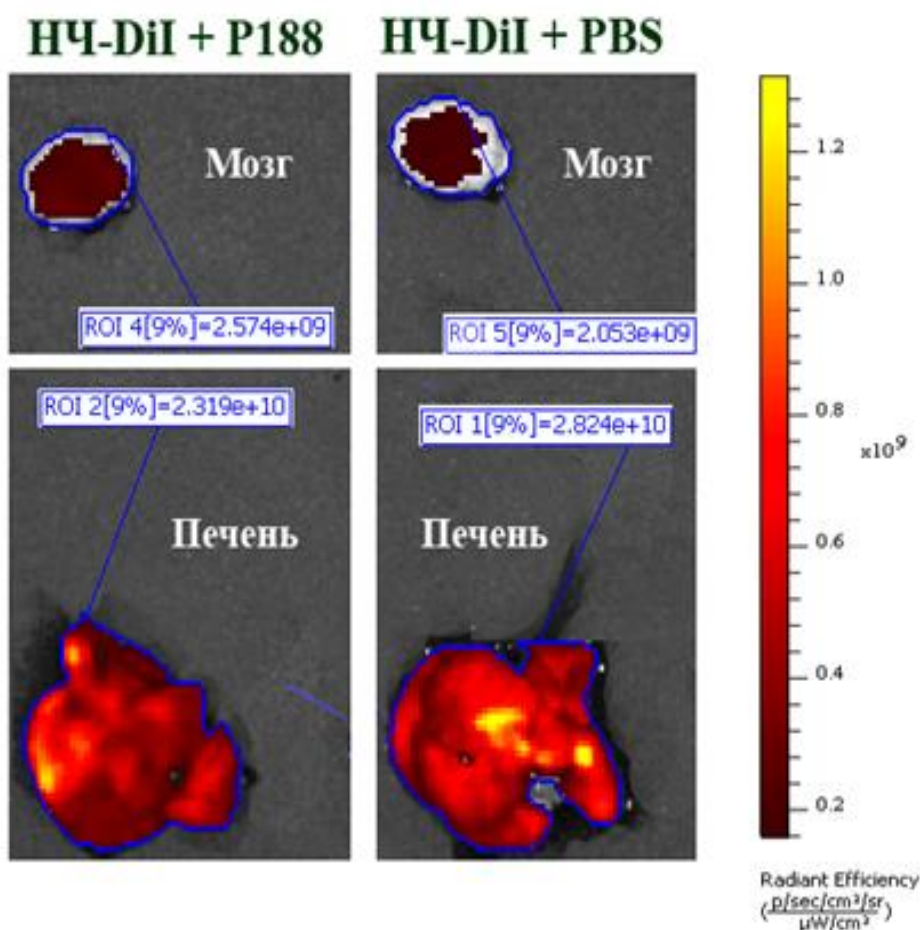


Рис. 28. Флюориметрический анализ мозга и печени мышей Balb/c через 2 ч после внутривенного введения ПЛГА наночастиц, меченых DiI в различных растворителях. Детекция флуоресценции на Ivis Spectrum CT ($E_x = 530$; $E_m = 580$; автоматическая экспозиция). Примечания - обозначения: НЧ-DiI + P188 – ПЛГА НЧ, меченые красителем DiI, растворенные в полуксамере 188; НЧ-DiI + PBS – ПЛГА наночастицы, меченые красителем DiI, растворенные в PBS (фосфатный буфер).

Отношение интенсивности сигнала мозг/печень в случае НЧ, растворенных в Р 188 составило 0,111, тогда как аналогичный показатель

для НЧ, разведенных в PBS был равен 0,072. Таким образом, коэффициент распределения мозг/печень в случае НЧ, разведенных в 1% растворе Р 188, оказался на 35,1% выше (в 1,5 раза выше), чем в случае НЧ, разведенных в PBS. Полученные данные свидетельствуют о преимущественном проникновении НЧ, покрытых Р 188 через интактный ГЭБ.

Статистический анализ данных, полученных на приборе Ivis Spectrum СТ в эксперименте с в/в введением мышам ПЛГА НЧ, меченых DiI, не выявил достоверных различий в значениях флюоресценции в мозге в зависимости от вида растворителя, как в случае анализа общего количества фотонов (рис. 29А), так и при анализе показателя флюоресценции, нормированного на площадь (рис. 29Б).

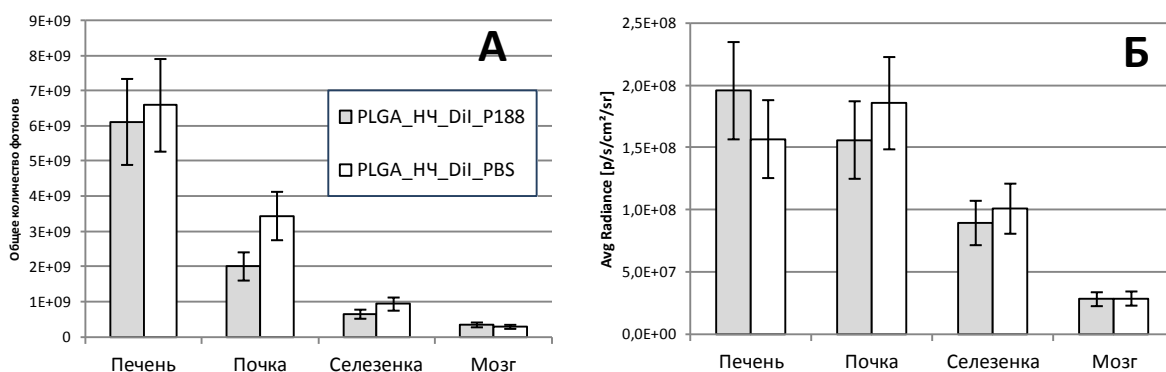


Рис 29. Результаты статистического анализа данных Ivis Spectrum СТ по детекции флюоресценции органов исследованных мышей через 2 часа после внутривенного введения ПЛГА НЧ в различных растворителях. А. Данные по общему количеству фотонов. Б. Показатель флюоресценции, нормированный на площадь (ф/сек/см²).

Вместе с тем, при оценке относительного накопления флюоресцентного сигнала было обнаружено, что у животных, получавших НЧ, растворенные в 1% Р 188, в мозге накапливается 4 % от суммарного значения флюоресценции всех исследуемых органов, тогда как у животных, получивших НЧ, растворенные в PBS, этот показатель составил 2 % (рис. 30).

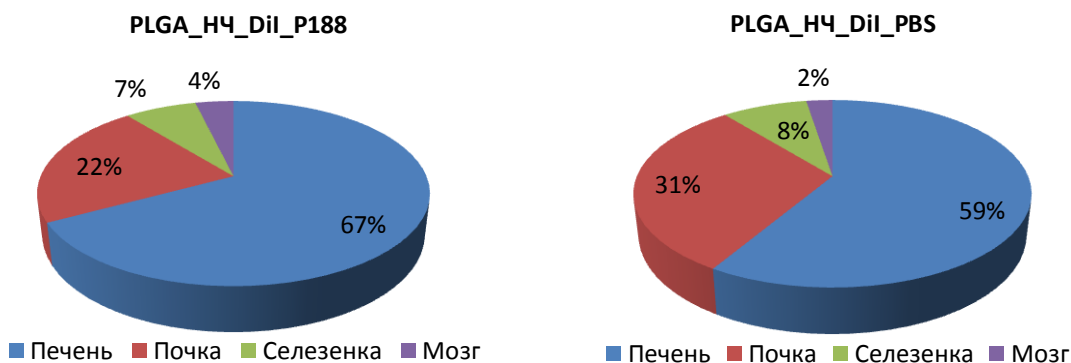


Рис. 30. Распределение флюоресцентного сигнала ПЛГА НЧ по исследуемым органам мышей в зависимости от вида растворителя через 2 часа после в/в введения НЧ.

Высококчувствительная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия позволила визуализировать сигнал от DiI в клетках коры мозга

(нейроны и/или крупные глиальные клетки) как в случае с НЧ, ресуспендированных в Р188, так и в случае НЧ, разведенных в PBS (рис. 31). НЧ, меченые DiI, детектировались в виде внутриклеточных включений среднего размера, предположительно – в эндосомах.

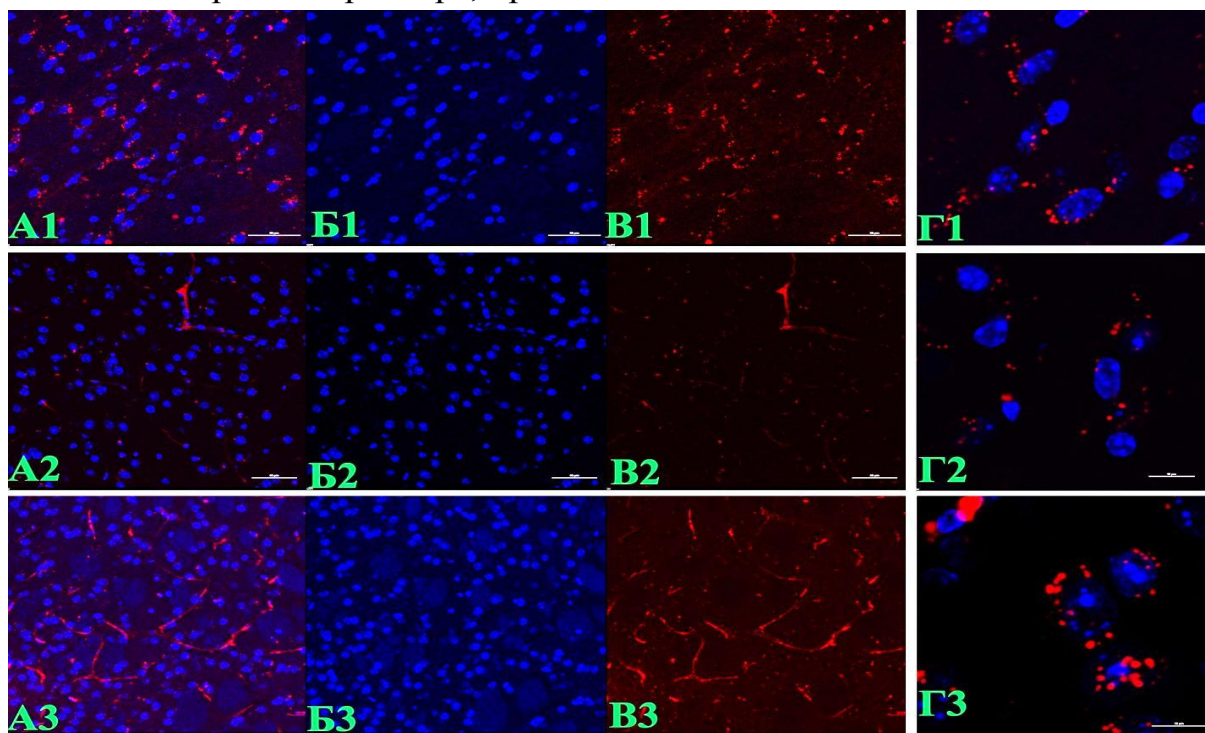


Рис. 31. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия на срезах мозга мышей через 2 часа после в/в введения НЧ: 1. ПЛГА НЧ с красителем DiI, ресуспендированные в 1 % Р 85, детекция флюоресценции DiI. 2. ПЛГА НЧ с красителем DiI, ресуспендированные в PBS, детекция флюоресценции DiI. 3. ПЛГА НЧ с красителем DiI, ресуспендированные в 1% растворе Р 188, детекция флюоресценции DiI. А. – комбинированные изображения. Б. Флюоресценция ядер клеток (Hoechst). В. Флюоресценция DiI (B1-3). Отрезок – 50 мкм. Г. Увеличенные фрагменты изображений. Отрезок – 10 мкм.

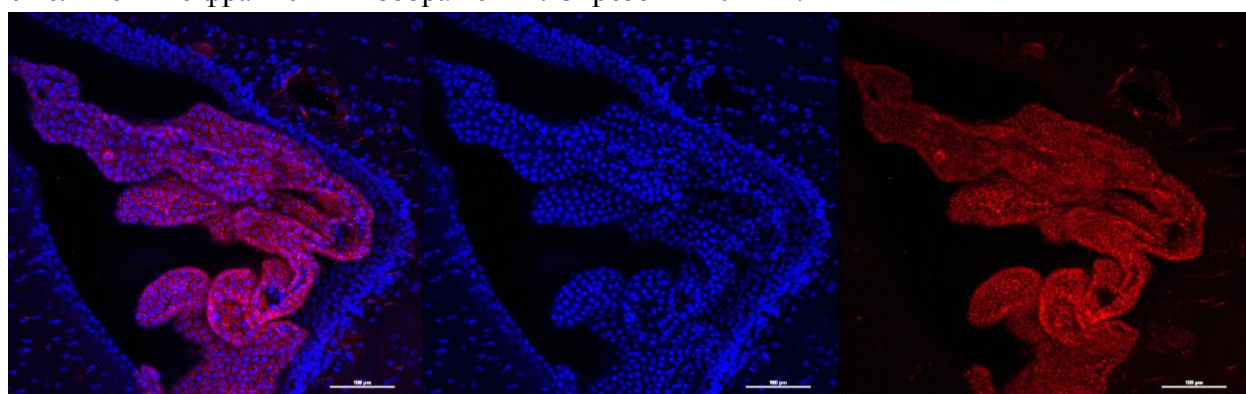


Рис. 32. Накопление ПЛГА НЧ, меченных DiI в хориоидальном сплетении боковых желудочков мозга крысы через 24 часа после в/в введения. Слева – объединенное изображение. В центре – окрашивание ядер с помощью Hoechst. Справа – флюоресценция DiI.

Оценка интенсивности флюоресценции на срезах мозга мышей и крыс через 2 и 24 часа после внутривенного введения ПЛГА НЧ, меченых DiI, показала, что наибольшее количество частиц обнаруживается в

хориоидальных скоплениях боковых желудочков головного мозга через 24 часа после введения (рис. 32).

Анализ суммарных данных по накоплению ПЛГА НЧ, меченых DiI, размером 150 нм в мозге мышей после в/в введения в дозе 100 мкг на животное не выявил достоверных различий в группах мышей, получивших НЧ, растворенные в Р188 и PBS. Однако, как и при анализе данных, полученных на приборе Ivis Spectrum CT, наблюдалась отчётливая тенденция проявления более высоких значений интенсивности флюоресценции в мозге у животных, получивших НЧ, ресуспендированные в 1% Р 188 (рис. 33). Так, средняя интенсивность флюоресценции мозга у животных в этой группе составила $136,3 \pm 7,0$ УЕ, тогда как в группе, где в качестве растворителя использовали PBS средняя интенсивность флюоресценции срезов головного мозга составляла $122,8 \pm 7,9$ УЕ.

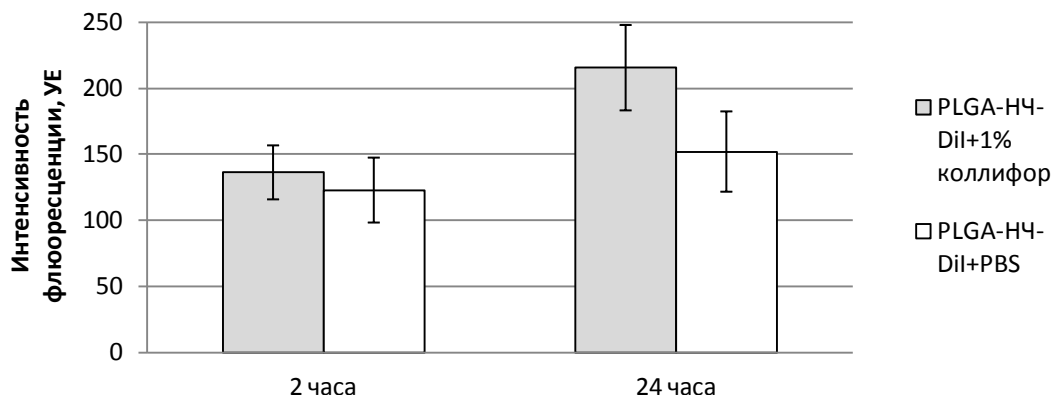


Рис. 33. Количественный анализ данных накопления ПЛГА НЧ, меченых DiI в мозге экспериментальных животных через 2 и 24 часа после в/в введения.

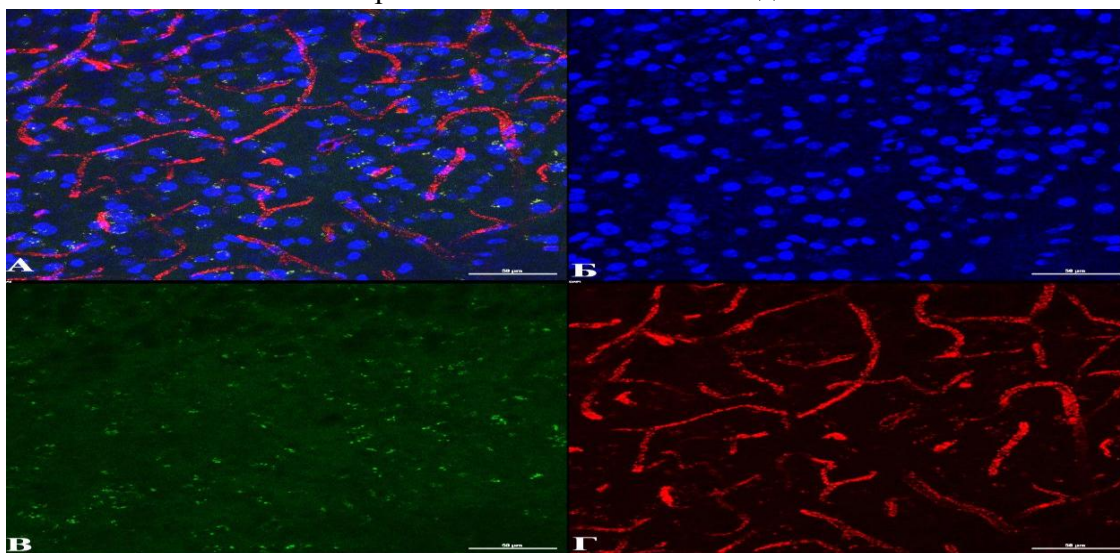


Рис. 34. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия на срезах мозга мышей через 2 часа после внутривенного введения ПЛГА НЧ, меченых DiI, ресуспендированных в 1% Р 188. А. Объединённое изображение. Б. Докрашивание ядер клеток с помощью Hoechst. В. Контроль аутофлюоресценции в зелёном канале. Г. Флюоресценция DiI с пиком эмиссии 560 нм. Отрезок – 50 мкм.

При повторении экспериментов с внутривенным введением ПЛГА НЧ, меченых DiI у мышей и крыс спустя 2 и 24 часа было обнаружено, что селективность накопления НЧ в разных структурах мозга различна. На всех сроках исследования у интактных животных наблюдалась интенсивная флюоресценция эндотелиоцитов церебральных микрососудов вследствие накопления DiI-меченых НЧ (рис. 34).

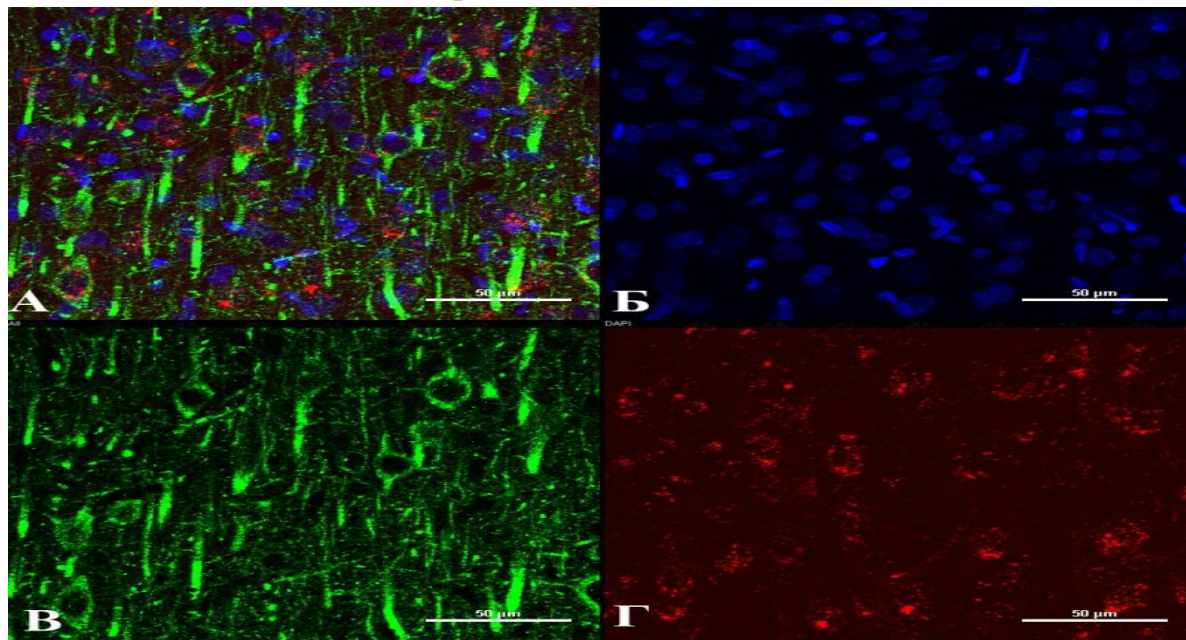


Рис. 35. Визуализация клеток, накапливающих ПЛГА НЧ, меченых DiI, в интактной нервной ткани. А. Объединённое изображение. Б. Ядра клеток, докрашенные Hoechst В. бета-III-тубулин позитивные нейроны коры головного мозга. Г. Флюоресценция DiI. Визуализируется накопление НЧ в конфокальная микроскопия. Отрезок – 50 мкм.

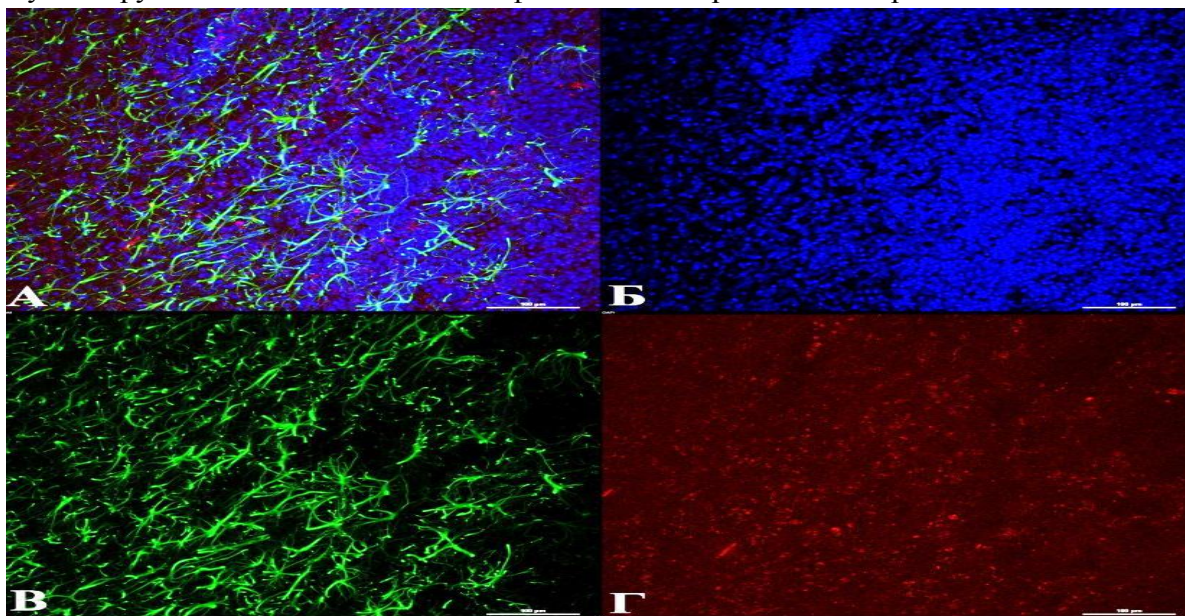


Рис. 36. Визуализация клеток, накапливающих ПЛГА НЧ, меченые DiI, в интактной нервной ткани. А. Объединённое изображение. Б. Ядра клеток, докрашенные Hoechst В. GFAP-позитивные астроциты. Г. Флюоресценция DiI Накопления флюоресценции DiI в астроцитах не наблюдается. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия. Отрезок – 50 мкм.

Иммунофлюоресцентная визуализация нейронов и астроглии с помощью антител к бета-III-тубулину и астроглиальному маркеру GFAP соответственно подтвердила накопление НЧ в отдельных субпопуляциях нейронов (рис. 35). Астроциты, несмотря на описанную их способность к фагоцитозу, НЧ не накапливали (рис.36).

В ходе изучения проницаемости различных НЧ на модели ГЭБ было выявлено, что наибольшей проницаемостью обладают ПЛГА НЧ размером 150 нм с поверхностью, модифицированной Р 188 или Р 85. ПБЦА НЧ размером 190 нм, ресуспендированные в 1 % растворе ПС 80, также способны преодолевать смоделированный ГЭБ. Принципиально важным является тот факт, что и ПЛГА и ПБЦА наночастицы обеспечивают транспорт через ГЭБ субстрата Р-gr-родамина 123.

Результаты флюориметрического анализа и сканирующей лазерной конфокальной микроскопии подтвердили накопление ПЛГА НЧ с модифицированной ПАВ поверхностью в клетках нервной ткани.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты уточняют наши представления о сфере применения НЧ как носителей ЛВ, а также свидетельствуют о высокой практической ценности этой технологии.

Так, на примере ФРН и нсРЭЧ показано, что способность НЧ преодолевать ГЭБ открывает новые возможности для неинвазивной медикаментозной коррекции нейродегенеративных заболеваний, инсультов и травм мозга.

На основе разработанной наносомальной формы паклитаксела предложен и реализован подход, позволяющий с помощью ПЛГА НЧ с модифицированной поверхностью преодолеть Р-gr-зависимую резистентность опухолевых клеток, что предполагает возможность применения этой технологии для химиотерапии резистентных форм злокачественных новообразований.

На примере наносомальной формы феназепама показана принципиальная возможность устранения нежелательных побочных эффектов при усилении и/или сохранении основных эффектов.

Успех будущей наносомальной формы зависит от многих факторов, наиболее важными из которых являются правильная постановка фармакологической задачи и выбор лекарственной субстанции. Понятно, что для включения в НЧ необходимо использовать высокоактивные фармацевтические субстанции, применяемые для лечения острых состояний и заболеваний, таких как инсульт, злокачественные новообразования и т.д. Кроме того, при выборе субстанции необходимо учитывать как ее

фармакологические характеристики (особенности распределения в организме, фармакокинетические параметры, способность проникать в орган-мишень и пр.), так и технологические (устойчивость в условиях образования НЧ, достаточная растворимость, способность к сорбции и пр.). Важную роль играет выбор носителя и модифицирующего агента.

Следует отметить, что создание наносомальных форм позволяет получить качественно новые фармакологические эффекты для хорошо известных активных фармацевтических субстанций.

ВЫВОДЫ

1. Разработана технология получения наносомальных форм фактора роста нервов, низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека, феназепама и паклитаксела на основе полибутилцианоакрилата и сополимера молочной и гликолевой кислот. Установлено, что фармакологическая активность наносомальных форм зависит от типа полимера, размера частиц и природы модифицирующего агента.
2. Установлено, что наносомальная форма фактора роста нервов при системном введении обладает выраженным противопаркинсоническим действием на модели МФТП-вызванного паркинсонического синдрома у мышей C57Bl/6, что проявляется в достоверном уменьшении показателей олигокинезии, ригидности и тремора, а также антиамнестическим действием на модели острой скополаминовой амнезии у крыс, тогда как субстанция фактора роста нервов подобными эффектами не обладает.
3. Показано, что модификация полибутилцианоакрилатных наночастиц полисорбатом 80 позволяет обеспечить доставку в мозг терапевтически значимых концентраций фактора роста нервов и низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека при системном введении.
4. Установлено, что наносомальные формы низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека в отличие от субстанции обладают протекторным действием на модели геморрагического инсульта, уменьшая гибель крыс, ослабляя неврологический дефицит, улучшая обучение и память животных. Выявлен один из аспектов механизма нейропротекторного действия, заключающийся в существенном (в 2,3-3,5 раза) повышении уровня мРНК нейротрофинов BDNF и NGF во фронтальной коре и гиппокампе крыс при системном введении наносомальной формы низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека, сорбированного на полибутилцианоакрилатных наночастицах.
5. Показано, что наносомальная форма феназепама обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и противосудорожным действием, не

- уступающим по активности феназепаму в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции в терапевтическом диапазоне доз (0,5-2,0 мг/кг) не обладает седативным и миорелаксирующим действием.
6. Установлено, что цитостатическая активность наносомальной формы паклитаксела в отношении резистентной клеточной линии Jurkat WT проявляется в диапазоне низких концентраций (от $1 \cdot 10^{-5}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ М), при которых стандартная лекарственная форма малоэффективна.
 7. Показано, что наносомальная форма паклитаксела оказывает выраженное противоопухолевое действие в отношении резистентной аденокарциномы молочной железы Ca755 мышей линии C57Bl/6 в сравнении со стандартной лекарственной формой. Показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ) и торможения роста опухоли (ТРО) при введении наносомальной формы паклитаксела в диапазоне доз от 7,5 мг/кг до 15 мг/кг составляют от 48,9% до 71,1% и от 75,2% до 94,3% соответственно, тогда как для стандартной формы паклитаксела в аналогичном диапазоне доз УПЖ составляет от 0,8 % до 7,1 %, а ТРО – от 4,3 % до 40,8 %.
 8. Выявлено, что наибольшей способностью проходить через смоделированный гематоэнцефалический барьер обладают полилактид-ко-гликолидные наночастицы с размером 150 нм, модифицированные полксамером 188 или полксамером 85, а также полибутилцианоакрилатные наночастицы, модифицированные полисорбатом 80.
 9. Показано, что модификация полилактид-ко-гликолидных наночастиц с размером 150 нм полксамером 188 обеспечивает эффективное прохождение наночастиц через интактный гематоэнцефалический барьер при системном введении.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Предлагается использовать наночастицы на основе полибутилцианоакрилата и сополимера молочной и гликолевой кислот с модифицированной поверхностью в качестве системы доставки в мозг лекарственных веществ.
2. Рекомендуются дальнейшее доклиническое изучение наносомальной формы низкосилированного рекомбинантного эритропоэтина человека в качестве нейропротекторного средства.
3. Рекомендуются расширенное доклиническое изучение наносомальной формы паклитаксела с целью создания лекарственного средства для лечения резистентных злокачественных новообразований.

4. Рекомендуются дальнейшее доклиническое исследование наносомальной формы феназепама для терапии urgentных состояний, сопровождающихся судорожным синдромом в неврологии, нейрореаниматологии и нейрохирургии.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи в журналах и изданиях, рекомендованных ВАК Министерства образования и науки РФ

1. Басел, А.А. Транспорт прозерина в головной мозг при помощи поли(бутил)цианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом- 80 [Текст] / А.А. Басел, В.Е. Петров, **В.Ю. Балабаньян**, С.Э. Гельперина, С.С. Трофимов, Т.А. Воронина, Р.Н. Аляутдин // Российский медицинский журнал. – 2006. – Т.4. – С. 28-32.
2. Курахмаева, К.Б. Антипаркинсоническое действие фактора роста нервов, сорбированного на полибутилцианоакрилатных наночастицах, покрытых полисорбатом-80 [Текст] / К.Б. Курахмаева, Т.А. Воронина, И.Г. Капица, Й. Кройтер, Л.Н. Неробкова, С.Б. Середенин, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2008. – Т. 145.- № 2.– С. 221-224.
3. Курахмаева, К.Б. Нейропротекторное действие фактора роста нервов у животных [Текст] / К.Б. Курахмаева, Т.А. Воронина, И.Г. Капица, Й. Кройтер, Л.Н. Неробкова, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Фармация. – 2008. – № 2. – С. 38-40.
4. Аляутдин, Р.Н. Направленный транспорт лекарственных веществ в мозг с помощью нанотранспортных систем [Текст] / Р.Н. Аляутдин, И.А. Джинджихашвили, К.Б. Курахмаева, **В.Ю. Балабаньян**, В.Е. Петров, Т.А. Воронина // Молекулярная медицина. – 2008. - №3. – С. 17-24.
5. Джинджихашвили, И.А. Оценка возможности доставки ФРН в мозг в эксперименте in vivo [Текст] / И.А. Джинджихашвили, К.Б. Курахмаева, М. Хосравани, О.П. Попова, **В.Ю. Балабаньян**, В.Е. Петров, Р.Н. Аляутдин // Фармация. – 2008. – №5. - С. 51-54.
6. Аляутдин, Р.Н. Направленный транспорт фактора роста нервов через ГЭБ с использованием полибутилцианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом-80 [Текст] //Р.Н. Аляутдин, В.Е. Петров, **В.Ю. Балабаньян**, Т.А. Воронина, С.С. Трофимов, Й. Кройтер, Д. Бегли // Молекулярная медицина. – 2008. - №5. – С. 19-24.
7. Разживина, В.А. Изучение анксиолитического, седативного и миорелаксантного эффектов феназепама, сорбированного на полибутилцианоакрилатных наночастицах [Текст] / В.А. Разживина, Т.А. Воронина, Г.М. Молодавкин, Р.Н. Аляутдин, **В.Ю. Балабаньян** // Фармация. – 2008. - №3. – С. 44-46.
8. Разживина, В.А. Изучение анксиолитического, седативного и антиагрессивного эффектов феназепама, включенного в полибутилцианоакрилатные наночастицы в экспериментах на мышах [Текст] / В.А. Разживина, Т.А. Воронина, Г.М. Молодавкин, Р.Н. Аляутдин, **В.Ю. Балабаньян** // Фармация. - 2008. - №8. – С. 41-43.

9. Kurakhmaeva K.B. Brain targeting of nerve growth factor using poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. [Text] / K.B. Kurakhmaeva, I.A. Djindjikhshvili, V.E. Petrov, **V.U. Balabanyan**, T.A. Voronina, S.S. Trofimov, J. Kreuter, S.E. Gelperina, D. Begley, R.N. Alyautdin // Journal of Drug Targeting. - 2009. - 17. - 8. - P. 564-574.
10. Боят, В. Лекарственные формы паклитаксела [Текст] / В. Боят, Е.А. Оганесян, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Российский биотерапевтический журнал. - 2009. - № 3. - С. 37-44.
11. Боят, В. Получение наносомальной лекарственной формы паклитаксела [Текст] / В. Боят, Я.М. Хамди, Е.А. Оганесян, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Фармация. - 2010. - № 4. - С. 32-33.
12. Боят, В. Цитотоксический эффект паклитаксела, включенного в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот [Текст] / В. Боят, Д.С. Баранов, Я.М. Хамди, Е.А. Оганесян, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2011. - Т.151. - № 3. - С. 315-318.
13. Боят, В. Внутриклеточное накопление и противоопухолевая активность наносомальных форм паклитаксела [Текст] / В. Боят, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2011. - Т.74. - № 3. - С. 22-25.
14. Солев, И.Н. Разработка технологии получения наноформ рекомбинантного эритропоэтина человека [Текст] / И.Н. Солев, О.С. Елизарова, **В.Ю. Балабаньян**, В.В. Тарасов, Р.Н. Аляутдин // Фармация. - 2011. - № 6. - С. 36-38.
15. **Балабаньян, В.Ю.** Нейропротекторный эффект человеческого рекомбинантного эритропоэтина, сорбированного на полимерных наночастицах, на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (модель геморрагического инсульта) [Текст] / В.Ю. Балабаньян, И.Н. Солев, О.С. Елизарова, Т.Л. Гарибова, С.А. Литвинова, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. - 2011. - Т. 74. - № 10. - С. 12-15.
16. Боят, В. Направленный транспорт наносомальной формы паклитаксела в высокорезистентные клетки Т-лимфобластного лейкоза человека [Текст] / В. Боят, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Российские медицинские вести. - 2011. - Т. XVI - № 4. - С. 29-33.
17. Мусина, Н.З. Прогнозирование целесообразности применения эритропоэтина в неврологии [Текст] / Н.З. Мусина, Т.Т. Нгуен, Я.М. Хамди, **В.Ю. Балабаньян**, Д.В. Голуб // Фармация. - 2011. - № 7.- С. 28-30.
18. **Bojat, V.** The entrapment of paclitaxel in PLGA nanoparticles increases its cytotoxicity against multiresistant cell line [Text] / Bojat V., **Balabanyan V.Yu.**, Alyautdin R.N.// British Journal of Medicine and Medical Research. -2011.- №1(4).- P. 306-319.
19. Елизарова, О.С. Изучение нейропротекторного эффекта низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека, включенного в наночастицы на основе сополимера молочной и гликолевой кислот у крыс с интрацеребральной посттравматической гематомой [Текст] / О.С. Елизарова, С.А. Литвинова, **В.Ю. Балабаньян**, И.В. Барсков, С.В. Новикова, Е.В. Стельмашук, С.Э.

- Гельперина, Т.Л. Гарибова, Т.А. Воронина // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 2012. – № 8. – С. 7-10.
20. Елизарова, О.С. Эффективность в отношении экспериментального геморрагического инсульта у крыс новой коллоидной формы низкосиалированного эритропоэтина на основе полилактидов [Текст] / О.С. Елизарова, **В.Ю. Балабаньян**, Е.В. Шипуло, О.О. Максименко, Л.В. Ванчугова, С.А. Литвинова, Т.Л. Гарибова, Т.А. Воронина, С.Э. Гельперина // Химико-фармацевтический журнал. – 2012. – № 10. – С.49-52.
21. Краснопольский, Ю.М. Перспективы применения в клинической практике наноразмерных форм лекарственных препаратов [Текст] / Ю. М. Краснопольский, **В.Ю. Балабаньян**, Д.Л. Шоболов, В.И. Швец // Российский химический журнал. – 2012. – Т. LVI. - № 3-4. – С. 11-33.
22. **Балабаньян, В.Ю.** Направленный транспорт низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека с использованием полимерных наночастиц через гематоэнцефалический барьер [Текст] / В.Ю. Балабаньян, А.М. Ульянов, О.С. Елизарова, И.Н. Солев, С.А. Литвинова, Т.Л. Гарибова, Т.А. Воронина // Российский химический журнал. – 2012. – Т. LVI. - № 3-4. – С. 67-76.
23. Солев, И.Н. Изучение участия BDNF и NGF в механизме нейропротекторного эффекта наночастиц рекомбинантного эритропоэтина человека [Текст] / И.Н. Солев, **В.Ю. Балабаньян**, И.А. Волчек, О.С. Елизарова, С.А. Литвинова, Т.Л. Гарибова, Т.А. Воронина // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т.155. - №2. – С.210-214.
24. **Балабаньян, В.Ю.** Полимерные наночастицы в оптимизации фармакокинетики и фармакодинамики лекарственных веществ [Текст] / В.Ю. Балабаньян // Фармация. – 2013. - № 4. – С. 51-55.
25. Швец, В.И. Биофармацевтические технологии на основе фосфолипидов (химия, биохимия, биофизика, биотехнология, физиология, иммунология, фармакология, технология получения лекарственных и диагностических препаратов, в том числе нанодиапазона) [Текст] / В.И. Швец, А.А. Кубатиев, Д.Л. Шоболов, **В.Ю. Балабаньян** // Обзорный журнал по химии. – 2013. – Т.3. - № 3. – С. 1-29.
26. **Балабаньян, В.Ю.** Противоопухолевая активность наноразмерной формы паклитаксела на основе полилактида в отношении экспериментальной аденокарциномы молочной железы у мышей линии С57BL/6 [Текст] / В.Ю. Балабаньян, Г.Д. Капанадзе, Я.М. Хамди, В.И. Швец // Биомедицина. – 2013. - № 4. – С. 19-24.
27. **Балабаньян, В.Ю.** Разработка и исследование наносомальной формы паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот [Текст] / В.Ю. Балабаньян, А.М. Ульянов, В.Боят, А.Ю. Хоменко, Н.Г. Седуш, С.Н. Чвалун, Г.Д. Капанадзе, Я.М. Хамди, В.И. Швец // Биофармацевтический журнал. – 2013. – Т.5. - № 6. – С. 28-37.
28. **Седова, С.В.** Сравнительное экспериментальное токсикологическое исследование цитостатиков из группы таксанов и их наноразмерных лекарственных форм [Текст] / С.В. Седова, О.И. Авдеева, **В.Ю. Балабаньян**, В.Г. Макаров, М.Н. Макарова, Я.М. Хамди, В.И. Швец // Российский биотерапевтический журнал. – 2013. - № 4. – С. 33-37.

Список других работ, опубликованных по теме диссертации

29. Курахмаева, К.Б. Изучение антипаркинсонического действия фактора роста нервов на модели болезни Паркинсона, вызываемой введением МФТП [Текст] / К.Б. Курахмаева, **В.Ю. Балабаньян**, Т.А. Воронина, Р.Н. Аляутдин // Научные труды VIII международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке; Концепции болезней цивилизации». Москва, 14-17 ноября 2007 г., РУДН, С.368-369.
30. Джинджихашвили, И.А. Полибутилцианоакрилатные наночастицы, покрытые полисорбатом-80, - перспективная система доставки фактора роста нервов через гематоэнцефалический барьер [Текст] / И.А. Джинджихашвили, В.Е. Петров, **В.Ю. Балабаньян**, Т.А. Воронина, С.С. Трофимов, С.Э. Гельперина, Р.Н. Аляутдин // Материалы II конгресса с международным участием «Российский медицинский форум». Москва, 17-19 октября 2007 г., ММА им. И.М. Сеченова, С.32-35.
31. Джинджихашвили, И.А. Изучение антиамнестического действия фактора роста нервов по методике условного рефлекса пассивного избегания в условиях острой амнезии, вызванной введением раствора скополамина [Текст] / И.А. Джинджихашвили, **В.Ю. Балабаньян**, В.Е. Петров, Р.Н. Аляутдин // Научные труды VIII международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке; Концепции болезней цивилизации». Москва, 14-17 ноября 2007 г., РУДН, С.236-237.
32. Джинджихашвили, И.А. Направленный транспорт фактора роста нервов через ГЭБ с использованием полибутилцианоакрилатных наночастиц [Текст] / И.А. Джинджихашвили, В.Е. Петров, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Материалы II конгресса с международным участием «Российский медицинский форум». Москва, 17-19 октября 2007 г., ММА им. И.М. Сеченова, С.144-146.
33. Разживина, В.А. Экспериментальное изучение анксиолитического и противосудорожного эффектов феназепама, сорбированного на полимерных носителях наночастицах [Текст] / В.А. Разживина, Т.А. Воронина, Г.М. Молодавкин, Р.Н. Аляутдин, **В.Ю. Балабаньян** // Научные труды VIII международного конгресса «Здоровье и образование в XXI веке; концепции болезней цивилизации». Москва, 14-17 ноября 2007 г., РУДН, С.530.
34. Черневская (Разживина), В.А. Экспериментальное изучение анксиолитического действия феназепама, сорбированного на полимерных носителях наночастицах [Текст] / В.А.Черневская, Т.А. Воронина, Г.М. Молодавкин, Р.Н. Аляутдин, **В.Ю. Балабаньян** // Материалы III съезда фармакологов России. Санкт-Петербург, 23-27 сентября 2007 г. - С. 2007.
35. Воронина, Т.А. Создание новой лекарственной формы феназепама на основе нанотехнологий. [Текст] / Т.А. Воронина, В.А. Разживина, Р.Н. Аляутдин, Г.Г. Авакян, **В.Ю. Балабаньян** // Сборник тезисов докладов международного форума по нанотехнологиям «Rusnanotech». Москва, 3-5 декабря 2008 г. - С. 375.
36. Джинджихашвили, И.А. Об антиамнестическом действии фактора роста нервов, сорбированного на полибутилцианоакрилатных наночастицах. [Текст] / И.А. Джинджихашвили, **В.Ю. Балабаньян**, В.Е. Петров, Р.Н. Аляутдин //Материалы научно-практической конференции «Высокие технологии в

- терапии и реабилитации заболеваний нервной системы». Москва, 29-30 мая 2008 г., ММА им. И.М. Сеченова, С.63-64.
37. Курахмаева, К.Б. Изучение антипаркинсонического действия наносомального фактора роста нервов на модели МФТП-вызванного паркинсонического синдрома. [Текст] / К.Б. Курахмаева, Т.А. Воронина, **В.Ю. Балабаньян**, В.Е. Петров, Р.Н. Аляутдин // Материалы научно-практической конференции «Высокие технологии в терапии и реабилитации заболеваний нервной системы». Москва, 29-30 мая 2008 г., ММА им. И.М. Сеченова, С.112-113.
 38. Курахмаева, К.Б. Наносомальный транспорт нейротропных средств в ЦНС. [Текст] / К.Б. Курахмаева, И.А. Джинджихашвили, В.А. Развижина, Я.М. Хамди, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Сборник тезисов докладов международного форума по нанотехнологиям “Rusnanotech”. Москва, 3-5 декабря 2008 г. – С. 388.
 39. Боят, В. Изучение цитотоксической активности наносомального паклитаксела на клеточной линии JURKAT WT [Текст] / В. Боят, Д.С. Баранов, Е.А. Оганесян, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Российский биотерапевтический журнал. – 2010. - № 3. – С.5-6.
 40. Солев, И.Н. Нейропротекторное действие эритропоэтина, вводимого с использованием нанотранспортных систем [Текст] / И.Н. Солев, Р.Н. Аляутдин, **В.Ю. Балабаньян**, Т.Л. Гарибова // Материалы I международной научно-практической конференции «Высокие технологии, фундаментальные и прикладные исследования в физиологии и медицине». Санкт-Петербург, 23-26 ноября 2010. – СПб, 2010. – С. 214-215.
 41. Боят, В. Противоопухолевая активность паклитаксела, включенного в матрикс полимерных наночастиц [Текст] / В. Боят, Д.С. Баранов, Е.А. Оганесян, Я.М. Хамди, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Материалы II международной конференции «Фундаментальная наука и практика». Томск, 22 мая-2 июня 2010 г. – Т.1.- № 3.- С.90-92.
 42. Боят, В. Внутриклеточное накопление наносомального паклитаксела в высокорезистентной клеточной линии JURKAT WT [Текст] / В. Боят, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Материалы VII международной научно-практической конференции «Наука и современность». Новосибирск, 27 декабря 2010 г. – Новосибирск, 2010. - С.130-132.
 43. Солев, И.Н. Эффекты наносомального эритропоэтина при интрацеребральной посттравматической гематоме (геморрагическом инсульте) у крыс [Текст] / И.Н. Солев, Р.Н. Аляутдин, **В.Ю. Балабаньян**, Т.Л. Гарибова, С.А. Литвинова, Т.А. Воронина // Материалы VII международной научно-практической конференции «Наука и современность». Новосибирск, 27 декабря 2010. – Новосибирск, 2010. – С. 15-17.
 44. Solev, I.N. Effect of nanosomic erythropoietin in rats with intracerebral post-traumatic haematoma (hemorrhagic stroke) [Text] / **V.Y. Balabanyan**, O.S. Elizarova, S.A. Litvinova, T.L. Garibova T.A. Voronina Russia Abstract book “11 ENCP Regional Meeting, 14-16 April 2011, St. Petersburg”. – St. Petersburg, 2011. – P.37.
 45. Боят, В. Цитотоксическая активность и внутриклеточное накопление наночастиц с паклитакселом [Текст] / В. Боят, **В.Ю. Балабаньян**, Р.Н. Аляутдин // Российский биотерапевтический журнал. – 2011. - № 1. – С.13.

46. Воронина, Т.А. Направленный транспорт фактора роста нервов через гематоэнцефалический барьер с использованием полимерных наночастиц [Текст] / Т.А. Воронина, **В.Ю. Балабаньян** // В кн. Нанотехнологии в нейрофармакологии. - М., 2012. – С.149-159.
47. **Балабаньян, В.Ю.** Основные механизмы доставки лекарственных веществ в мозг с помощью полимерных наночастиц [Текст] / В.Ю. Балабаньян, С.Э. Гельперина // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2012. – № 2. – С.3-9.
48. **Балабаньян, В.Ю.** Изучение фармакодинамики наноразмерной формы феназепама на основе поли(бутил) цианоакрилатных наночастиц [Текст] / В.Ю. Балабаньян, В.А. Разживина, О.О. Максименко, Е.А. Кондрахин, Г.И. Ковалев, Т.А. Воронина // Фармакокинетика и фармакодинамика. – 2012. – № 2. – С.17-25.
49. **Балабаньян, В.Ю.** Применение полимерных систем доставки для транспорта пептидов с нейротрофической активностью через гематоэнцефалический барьер [Текст] / В.Ю. Балабаньян, О.С. Елизарова, И.Н. Солев, С.А. Литвинова, Т.Л. Гарибова, Т.А. Воронина // Материалы Международной научно-практической конференции «Фармацевтические и медицинские биотехнологии». 20-22 марта 2012 г., Москва, Россия. - М., 2012.- С.192.
50. Воронина, Т.А. Перспективы создания нейropsychотропных препаратов с использованием нанотехнологий [Текст] / Т.А. Воронина, К.Б. Курахмаева, В.А. Разживина, И.А. Джинджихашвили, **В.Ю. Балабаньян**, Л.Н. Неробкова, Г.Г. Авакян // Материалы IV съезда фармакологов России. 18-21 сентября 2012 г., Казань, Россия.- Казань, 2012.-С.40.

Патенты

Евразийский патент № 018472. Частицы, содержащие эритропоэтин, для лечения и профилактики неврологических и гематологических заболеваний и нарушений./ **Балабаньян В.Ю.**, Хамди Я.М., Солев И.Н., Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., Шелудченко О.С. // Бюллетень Евразийского патентного ведомства (ЕАПВ) «Изобретения (евразийские заявки и патенты)» - № 8 – 30.08.2013.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

BDNF – мозговой нейротрофический фактор	ПЛА – полилактид
F68 – полксамер 68	ПБЦА - полибутилцианоакрилат
GFAP - глиофибрилярный кислый протеин	ПБЦА-НЧ - полибутилцианоакрилатные наночастицы
NGF – фактор роста нервов	ПВС – поливиниловый спирт
P188 – полксамер 188	ПТХ - паклитаксел
P85 – полксамер 85	ПТХ-ПЛГА – паклитаксел, сорбированный на полилактидных наночастицах
P-gr – Р-гликопротеин	ПТХ-ПЛГА-Р188 – паклитаксел, сорбированный на полилактидных наночастицах, покрытых полксамером 188
PBS – фосфатный буфер	ПЛГА – сополимер молочной и гликолевой кислот
PLGA-НЧ-DiI-P188 (НЧ-DiI-P188) – полилактидные наночастицы с красителем DiI, растворенные в полксамере 188	ПС 80 – полисорбат 80
PLGA-НЧ-DiI-PBS- полилактидные наночастицы с красителем DiI, растворенные в фосфатном буфере	ПЦР – полимерная цепная реакция
PLGA-НЧ-DiI-H ₂ O (НЧ-DiI-H ₂ O) – полилактидные наночастицы с красителем DiI, растворенные в воде	РЭМ – растровая электронная микроскопия
TEER – трансэндотелиальное сопротивление	нсРЭЧ-ПБЦА – низкосиалированный рекомбинантный эритропоэтин человека,

АСМ – атомно-силовая микроскопия	сорбированный на полибутилцианакрилатных наночастицах
в/в – внутривенное введение	нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 – низкосиалированный рекомбинантный эритропоэтин человека, сорбированный на полибутилцианакрилатных наночастицах, покрытых полисорбатом 80
БДЗ – бенодиазепиновые рецепторы	СПЖ – средняя продолжительность жизни
ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография	УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания
ГИ – геморрагический инсульт	УПЖ – увеличение продолжительности жизни
ГЭБ – гематоэнцефалический барьер	ФЕН - феназепам
Д-70 – декстран 70	ФЕН-ПБЦА – феназепам, включенный в полибутилцианакрилатные наночастицы
ИК ₅₀ – ингибирующая концентрация	ФЕН-ПБЦА-ПС80 – феназепам, включенный в полибутилцианакрилатные наночастицы, покрытые полисорбатом 80
ИПГ – интрацеребральная посттравматическая гематома	ФКС – фотонная корреляционная спектроскопия
ИФА – иммуноферментный анализ	ФРН – фактор роста нервов
ЛВ – лекарственное вещество	ФРН-ПБЦА – фактор роста нервов, сорбированный на полибутилцианакрилатных наночастицах
ЛО – ложнооперированные животные	ФРН-ПБЦА-ПС80 – фактор роста нервов, сорбированный на полибутилцианакрилатных наночастицах, покрытых полисорбатом 80
ЛП – латентный период	ЦНС – Центральная нервная система
МТТ - тест для линий опухолевых клеток человека на основе ферментного восстановления неокрашенной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид	ЧСА – человеческий сывороточный альбумин
мРНК – матричная РНК	
МФТП - 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин	
НЧ – наночастицы	
нсРЭЧ – низкосиалированный рекомбинантный эритропоэтин человека	
ПАВ – поверхностно-активное вещество	