

**ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ
ФАРМАКОЛОГИИ ИМЕНИ В.В.ЗАКУСОВА»**

На правах рукописи

Балабаньян Вадим Юрьевич

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

14.03.06 – фармакология, клиническая фармакология

Диссертация
на соискание ученой степени
доктора фармацевтических наук

Научный консультант
Заслуженный деятель науки РФ,
доктор медицинских наук,
профессор Т.А. Воронина

Москва -2015

Оглавление

Список сокращений	7
Введение.....	10
Глава 1. Обзор литературы	18
1.1. Полимерные наночастицы как системы доставки лекарственных веществ.	18
1.2. Технология получения наночастиц.	19
1.3. Распределение наночастиц в организме	27
1.4. Распределение наночастиц в условиях патологии	34
1.5. Основные направления применения полимерных наночастиц.....	37
1.6. Токсикологические аспекты применения наносомальных форм.....	56
1.7. Заключение.	57
Глава 2. Материалы и методы исследования	58
2.1. Препараты и вещества, используемые для получения наносомальных форм.	58
2.2. Оборудование, используемое для получения, визуализации и определения физико-химических характеристик наночастиц.	59
2.3. Методы получения наночастиц-плацебо на основе сополимера молочной и гликолевой кислот и бутилцианоакрилата.	60
2.4. Получение наночастиц с красителями DiI и родамином 123.	60
2.5. Метод получения наносомальной формы ФРН на основе полибутилцианоакрилата.	62
2.6. Метод получения наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПЛГА и ПБЦА наночастиц.	63
2.7. Метод получения наносомальной формы феназепама на основе полибутилцианоакрилата.	66

2.8. Метод получения наносомальной формы паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот.	67
2.9. Экспериментальные животные.....	68
2.10. Исследование наносомальной формы ФРН.	69
2.11. Исследование наносомальных форм РЭЧ.	73
2.12. Исследование наносомальной формы феназепама.....	81
2.13. Исследование наносомальной формы паклитаксела.....	92
2.14. Изучение проникновения наночастиц через ГЭБ в опытах <i>in vitro</i>	95
2.15. Изучение проникновения наночастиц через ГЭБ в опытах <i>in vivo</i>	100
Статистическая обработка.....	102
Глава 3. Получение наносомальных форм фактора роста нервов, низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека, феназепама и паклитаксела.....	103
3.1. Получение наночастиц плацебо.	103
3.2. Получение наносомальной формы ФРН на основе ПБЦА НЧ.	107
3.3. Получение наносомальных форм нсРЭЧ на основе ПБЦА и ПЛГА НЧ.	108
3.4. Получение наносомальной формы феназепама на основе полибутилцианоакрилата.	121
3.5. Получение наносомальной формы паклитаксела на основе ПЛГА НЧ.	122
Заключение.	124
Глава 4. Исследование наносомальной формы фактора роста нервов.	126
4.1. Количественное определение ФРН в тканях мозга мышей C57Bl/6.	126
4.2. Изучение антиамнестического действия наносомальной формы ФРН в условиях острой амнезии УРПИ, индуцированной скополамином у крыс.	127

4.3. Изучение противопаркинсонического действия наносомальной формы ФРН на модели МФТП-вызванного паркинсонического синдрома у мышей C57BL/6.	129
Заключение.	132
Глава 5. Исследование наносомальной формы низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека.....	134
5.1. Определение концентрации нсРЭЧ в тканях мозга нелинейных мышей.	134
5.2. Исследование влияния наносомальной формы нсРЭЧ на экспрессию генов нейротрофических факторов NGF и BDNF.	136
5.3. Исследование нейропротекторных свойств наносомальной формы нсРЭЧ на ПБЦА НЧ на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ) у крыс.	138
5.4. Исследование нейропротекторных свойств наносомальной формы нсРЭЧ на ПЛГА НЧ на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ) у крыс.	146
5.5. Изучение влияния наносомальной формы нсРЭЧ на эритропоз.	151
Заключение.	153
Глава 6. Исследование наносомальной формы феназепама	154
6.1. Изучение анксиолитического действия феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.	154
6.2. Изучение антиагрессивного эффекта феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.	156
6.3. Изучение противосудорожного эффекта феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.	157
6.4. Изучение седативного действия феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.	160

6.5. Изучение миорелаксантного действия феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.....	161
6.6. Исследование механизма действия феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы с использованием блокаторов бензодиазепиновых и ГАМК-А рецепторов.	162
6.7. Изучение рецепторного связывания феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы с бензодиазепиновыми рецепторами мозга в условиях <i>in vitro</i> и <i>ex vivo</i>	164
Заключение.	166
Глава 7. Исследование наносомальной формы паклитаксела.	168
7.1. Исследование внутриклеточного накопления наночастиц в высокорезистентных клетках Jurkat WT.....	168
7.2. Определение цитотоксической активности различных форм паклитаксела в МТТ тесте пролиферативной активности клеток.	169
7.3. Определение противоопухолевой активности различных форм паклитаксела на модели аденокарциномы Ca755 у мышей линии C57BL/6.....	171
Заключение.	173
Глава 8. Изучение проникновения наночастиц через гематоэнцефалический барьер в экспериментах <i>in vitro</i> и <i>in vivo</i>.....	175
8.1. Изучение способности наночастиц проникать через ГЭБ в эксперименте <i>in vitro</i>	175
8.2. Изучение способности наночастиц проникать через интактный ГЭБ в эксперименте <i>in vivo</i>	187
Заключение.	198
Обсуждение результатов.....	199
Заключение.....	217
Выводы.....	218

Список литературы	222
--------------------------------	------------

Список сокращений

AUC - area under the curve (площадь под фармакокинетической кривой)

BDNF – мозговой нейротрофический фактор

ELISA – иммуноферментный анализ

EPR- Enhanced permeability and retention effect (эффект повышенной проницаемости и накопления)

MRP – фактор множественной лекарственной резистентности

NGF – фактор роста нервов

NMDA - N-метил-D-аспартат

P188 – полуксамер 188

P407 – полуксамер 407

P-gr – P-гликопротеин

PLGA-НЧ-DiI-P188 (НЧ-DiI-P188) - полилактидные наночастицы с красителем DiI, растворенные в полуксамере 188

PLGA-НЧ-DiI-PBS- полилактидные наночастицы с красителем DiI, растворенные в фосфатном буфере

PLGA-НЧ-DiI-H₂O (НЧ-DiI-H₂O) - полилактидные наночастицы с красителем DiI, растворенные в воде

Апо – аполипопротеин

АСМ – атомно-силовая микроскопия

БКС - биофармацевтическая классификационная система

БП – болезнь Паркинсона

в/в – внутривенное введение

ВЭЖХ - высокоэффективная жидкостная хроматография

ГИ – геморрагический инсульт

ГЛБ – гидрофильно-липофильный баланс

ГПК - гиппокамп

ГЭБ – гематоэнцефалический барьер

Д-70 – декстран 70

ДМСО – диметилсульфоксид

ЕО, РО – этиленоксид, пропиленоксид
ИК₅₀ – ингибирующая концентрация
ИФА – иммуноферментный анализ
ККМ – критическая концентрация мицеллообразования
ЛВ – лекарственное вещество
ЛПНП - липопротеины низкой плотности
ЛО – ложнооперированные животные
ЛП – латентный период
МАО В – моноаминоксидаза В
МЛУ - множественная лекарственная устойчивость
МФТП - 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин
НЧ – наночастицы
нсРЭЧ – низкосиалированный рекомбинантный эритропоэтин человека
ОП – открытое поле
ПАВ – поверхностно-активное вещество
ПБЦА - полибутилцианоакрилат
ПБЦА-НЧ - полибутилцианоакрилатные наночастицы
ПВС – поливиниловый спирт
ПГЦА - полигексилцианакрилат
ПЕГ, ПЕО – полиэтиленгликоль, диэтиленоксид
ПИБЦА – полиизобутилцианакрилат
ПК С- протеинкиназа С
ПТХ - паклитаксел
ПТХ-ПЛГА – паклитаксел, сорбированный на полилактидных наночастицах
ПТХ-ПЛГА-Р188 – паклитаксел, сорбированный на полилактидных наночастицах, покрытых полксамером 188
ПЛГА – сополимер молочной и гликолевых кислот
ПОЛ – перекисное окисление липидов
ПС – паркинсонический синдром

ПС 80 – полисорбат 80

ПЭГ - полиэтиленгликоль

РФК – реактивные формы кислорода

РЭС – ретикулоэндотелиальная система

РЭМ – растровая электронная микроскопия

нсРЭЧ-ПБЦА – низкосиалированный рекомбинантный эритропоэтин человека, сорбированный на полибутилцианакрилатных наночастицах

нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 – рекомбинантный эритропоэтин человека, сорбированный на полибутилцианакрилатных наночастицах, покрытых полисорбатом-80

СК – сенсомоторная кора

СФ – спектрофотометрия

УРПИ – условный рефлекс пассивного избегания

ФЕН - феназепам

ФЕН-ПБЦА – феназепам, включенный в полибутилцианакрилатные наночастицы

ФЕН-ПБЦА-ПС80 – феназепам, включенный в полибутилцианакрилатные наночастицы, покрытые полисорбатом-80

ФКС – фотонная корреляционная спектроскопия

ФРН – фактор роста нервов

ФРН-ПБЦА – фактор роста нервов, сорбированный на полибутилцианакрилатных наночастицах

ФРН-ПБЦА-ПС80 – фактор роста нервов, сорбированный на полибутилцианакрилатных наночастицах, покрытых полисорбатом 80

ЦНС – Центральная нервная система

ЧС – чёрная субстанция

ЧСА – человеческий сывороточный альбумин

ЭЭГ – электроэнцефалограмма

Введение

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 (ЛВ) 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 (ГЭБ). 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; 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 (НЧ), 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., 1994].

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 (Р-gr), не способен преодолеть ГЭБ [Alyautdin R.N., 1997]. Применение ПБЦА наночастиц, покрытых ПС 80, позволило преодолеть Р-gr-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. 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, используемых 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-gp-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 ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова».

Диссертационная работа выполнялась в рамках темы НИР плана ФГБУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» - «Изучение механизмов эндо- и экзогенной регуляции функций центральной нервной системы. Разработка оригинальных нейрорепаративных 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 нейрорепаративных эффектов.

4. Наносомальная формы 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 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), обсуждение результатов, заключения, выводов и списка литературы, включающего 245 источников, из них 23 отечественных и 222 зарубежных источников.

Глава 1. Обзор литературы

1.1. Полимерные наночастицы как системы доставки лекарственных веществ.

Концепция селективной доставки ЛВ была впервые сформулирована немецким исследователем Паулем Эрлихом, считавшим возможным создание лекарственного препарата избирательного действия, которое при введении в организм находит орган-мишень как «волшебная пуля». Проблема повышения эффективности и снижения токсичности ЛВ за счет их избирательного накопления в органах-мишенях наряду с прогрессом молекулярной биологии, коллоидной химии, фармакологии способствовала созданию различных систем направленной доставки ЛВ.

Существующие в настоящее время системы доставки ЛВ можно разделить на две основные группы: комплексы (конъюгаты) ЛВ с макромолекулярным носителем и коллоидные системы, краткая характеристика которых приведена в табл. 1.1. Представленные в таблице носители ЛВ имеют размер менее одного микрона, то есть согласно определению Энциклопедии фармацевтической технологии являются объектами нанотехнологии [Kreuter J., 1994]. Для биомедицинских целей наиболее часто применяют носители размером от 100 до 500 нм.

Широко известным и применяемым в клинической практике представителем коллоидных систем доставки являются липосомы [Швец В.И., 2008; Краснопольский Ю.М., 2010]. Помимо липосом перспективными носителями ЛВ являются полимерные НЧ, представляющие собой твердые частицы размером от 1 до 1000 нм, состоящие из полимеров как природного (например, альгинат, хитозан, альбумин), так и синтетического (например, полиакрилаты, полилактиды и пр.) происхождения и содержащие активный ингредиент, который может быть инкапсулирован, адсорбирован или присоединен ковалентной связью [Kreuter J., 1994]. Данное определение

распространяется также на нанокапсулы, состоящие из полимерной оболочки, внутри которой находится масляная фаза.

Таблица 1.1

Типы коллоидных систем, используемых для доставки ЛВ [Гельперина С.Э., 2010].

Тип	Типичные размеры, нм	Характеристика
Липосомы	100—200	Капсулы, внешняя мембрана которых состоит из природных фосфолипидов; активный ингредиент растворен во внутренней водной фазе или в липидной мембране
Полимерные наночастицы	100—500	Твердые частицы из полимеров (природных или синтетических); активный ингредиент распределен (растворен) в твердой фазе и/или адсорбирован на поверхности
Липидные наночастицы	100—500	Частицы из твердых липидов; активный ингредиент распределен (растворен) в твердой фазе и адсорбирован на поверхности
Полимерные нанокапсулы	100—300	Капсулы с внутренней масляной фазой, внешняя оболочка состоит из биodeградируемых полимеров; активный ингредиент растворен во внутренней фазе
Наногели	50—250	Частицы из гидрофильного геля, состоящего из поперечно-сшитых полимеров (например, система ПЭГ - полиэтиленгликоль или полисахариды)
Полимерные мицеллы	20—150	Самоорганизующиеся мицеллы из блок-сополимеров типа А-В или А-В-А; активный ингредиент солюбилизирован или ковалентно связан с полимером
Полиплексы /липоплексы	50—150	Комплексы ДНК с поликатионами или положительно заряженными липидами
Дендримеры	5—10	Сверхразветвленные полимеры, макромолекулы которых имеют сферическую форму; активный ингредиент иммобилизован во внутренних полостях макромолекул
Нано-кристаллы	100—500	Кристаллическая форма активного ингредиента; кристаллы стабилизированы поверхностно-активным веществом

1.2.Технология получения наночастиц.

Наночастицы из полиалкилцианоакрилатов (ПАЦА) получают методом полимеризации алкилцианоакрилатов в водной среде в присутствии стабилизаторов [Vauthier C., 2003]. Мономер, нерастворимый в воде, при интенсивном постоянном перемешивании вводят в водную среду, в результате образуется микроэмульсия (рис. 1.1).

Полимеризация алкилцианоакрилатов в водной среде происходит самопроизвольно при комнатной температуре. В качестве инициаторов реакции полимеризации выступают анионы OH^- , которые образуются в результате диссоциации молекул воды. Важнейшим фактором, определяющим характеристики как полимера, так и образующихся в ходе полимеризации НЧ, является рН среды. При нейтральных значениях рН в реакционной среде образуется избыток инициатора и полимеризация происходит обвално с образованием агломератов различного размера. С целью уменьшения число анионов - инициаторов полимеризации реакцию проводят при кислых значениях рН среды.

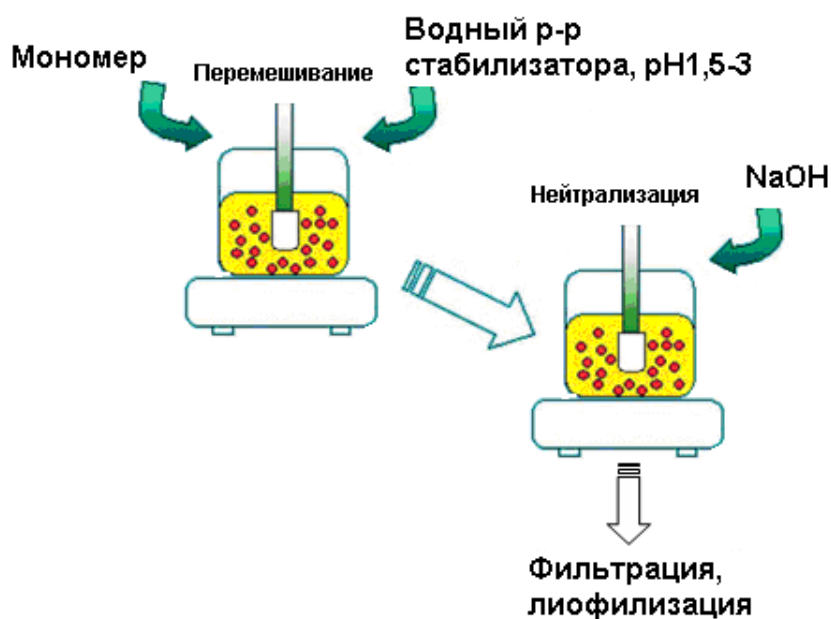
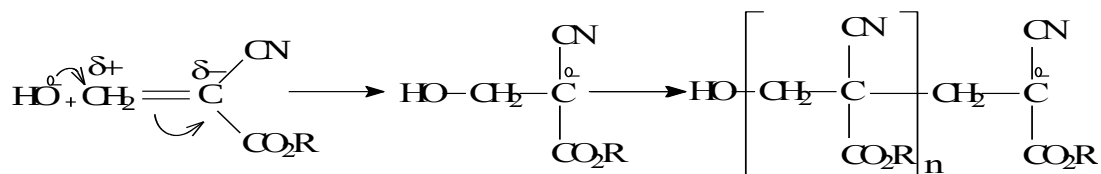


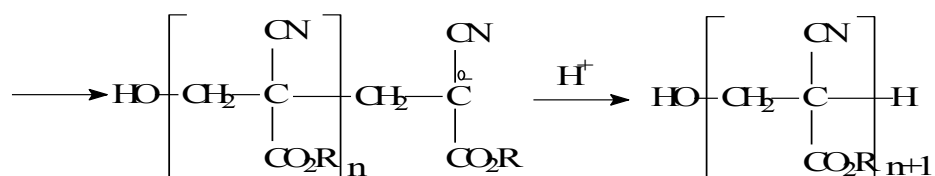
Рис. 1.1. Схематическое изображение процесса получения полибутилцианоакрилатных наночастиц

Реакция полимеризация бутилцианоакрилата протекает по анионному и цвиттер-ионному механизмам (рис. 1.2). Поскольку инициаторами полимеризации являются гидроксид-ионы, а терминаторами – протоны, то скорость полимеризации находится в прямой зависимости от рН полимеризационной среды. Полимеризация происходит в водной среде по мере диффузии в нее молекул мономера. Предположительно, рост полимерной цепи осуществляется «внутри» фазы мономера. При

достижении определенной молекулярной массы полимер выделяется в отдельную фазу и образуется наносuspension.



Реакция полимеризации



Реакция обрыва полимерной цепи

Рис. 1.2. Механизм полимеризации алкилцианоакрилатов

Наиболее эффективным методом включения лекарственного вещества в наночастицы является полимеризация алкилцианоакрилата в присутствии этого вещества. Альтернативный способ – сорбция на готовых наночастицах - применяется в случаях, когда вещество неустойчиво в условиях полимеризации (т.е. при $\text{pH} \leq 3$) или вступает в реакцию с мономером, что приводит к его деактивации и/или образованию побочных продуктов. Следует отметить, что сорбция на готовых наночастицах часто менее эффективна: вещество сорбируется в основном на поверхности наночастиц и, как правило, быстро десорбируется при разбавлении суспензии.

В организме выделение ЛВ из частиц происходит в результате десорбции и/или биodeградации полимерной матрицы под действием ферментов.

Технология получения НЧ на основе ПЛГА представлена на рис. 1.3.

В настоящее время сополимеры молочной и гликолевой кислот широко используются при создании депо-форм ЛВ (табл. 1.2)

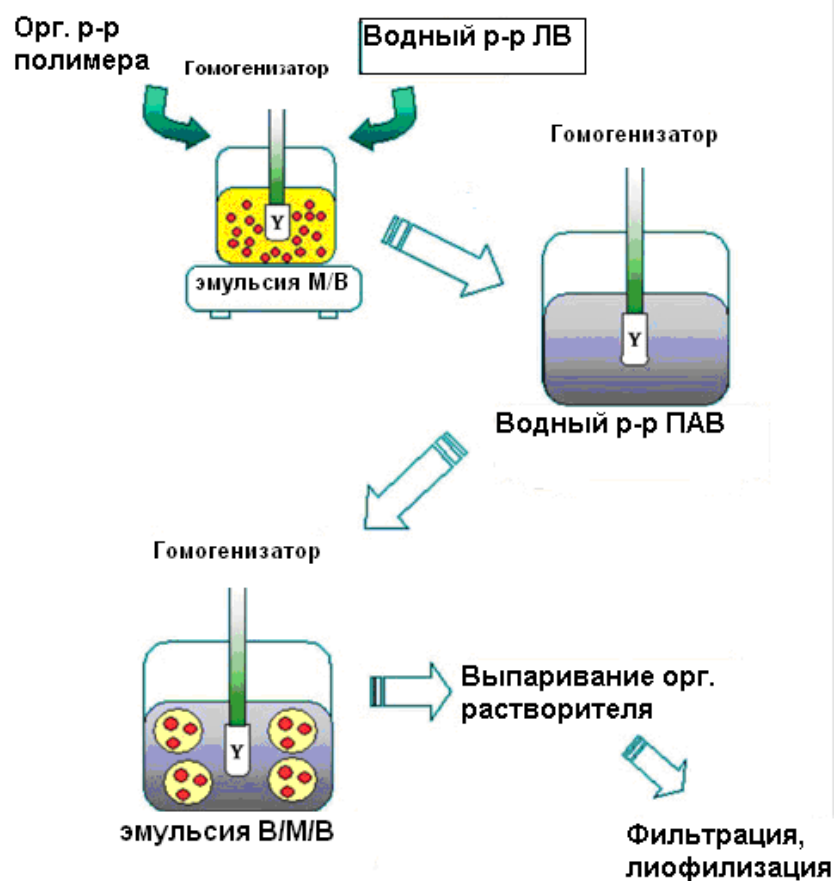


Рис. 1.3. Схематическое изображение процесса получения полилактидных наночастиц, нагруженных ЛВ.

Таблица 1.2

Лекарственные препараты на основе сополимера молочной и гликолевой кислот [Кузнецова И.Г., 2013].

Торговое название	Активное вещество	Производитель	Фармакологическая группа	Лекарственная форма
Бусерелин депо	Бусерелин	«Фарм-Синтез» (Россия)	Противоопухолевое средство – аналог гонадотропин-рилизинг гормона	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения
Октреотид депо	Октреотид	«Фарм-Синтез» (Россия)	Синтетический аналог соматостатина	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения
Кальцитонин депо	Кальцитонин	«Фарм-Синтез» (Россия)	Гормон щитовидной железы	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения

Таблица 1.2 (продолжение).

Торговое название	Активное вещество	Производитель	Фармакологическая группа	Лекарственная форма
Сандостатин Лар®	Октреотид	«Сандоз» Австрия	Синтетический аналог соматостатина	Микросферы для приготовления суспензии для внутримышечного введения
Соматулин®	Ланреотид	«Ипсен Фарма» (Франция)	Синтетический аналог соматостатина	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного введения
Рисполепт конста	Рisperидон	«Алкermес Инк» (США)	Антипсихотическое средство (нейролептик)	Порошок для приготовления суспензии для внутримышечного введения
Вивитрол	Налтрексон	«Алкermес Инк» (США)	Антагонист опиоидных рецепторов	Порошок для приготовления суспензии для внутримышечного введения
Люкрин депо®	Лейпрорелин	«Такеда» (Япония)	Аналог гонадотропин-рилизинг-гормона	Лиофилизат для приготовления суспензии для подкожного введения
Золадекс	Гозерелина ацетат	«АстраЗенка» (Великобритания)	Аналог гонадотропин-рилизинг-гормона	Капсула для подкожного введения
Декапептил депо	Триптозелина ацетат	«Ферринг» (Германия)	Аналог гонадотропин-рилизинг-гормона	Лиофилизат для приготовления суспензии для внутримышечного и подкожного введения

Как правило, НЧ получают из готовых полимеров путем эмульгирования или осаждения. Так, например, получают НЧ из полилактидов, полиакрилатов и поли-ε-капролактона [Bala I., 2004; Nguyen C.A., 2006; Pal S.L., 2011]; структуры этих полимеров приведены на рис. 1.4. ЛВ включается в частицу в процессе ее формирования и, в зависимости от физико-химических свойств (растворимости), может присутствовать в органической или водной фазе. НЧ из полиакрилатов можно получать также полимеризацией соответствующих мономеров в водной фазе; при этом наиболее эффективная сорбция достигается, когда ЛВ присутствует в полимеризационной среде [Vauthier C., 2008; Vauthier C., 2009; Nagavarma B.V.N., 2012].

Помимо упомянутых выше стабильности и высокой емкости, к технологическим достоинствам НЧ следует отнести их способность связывать как гидрофильные, так и гидрофобные вещества, а также пригодность для разнообразных путей введения в организм, в том числе для перорального и ингаляционного [Кедик С.А., 2013]. При получении НЧ, предназначенных для парентеральных путей введения, используются только биodeградируемые полимеры.

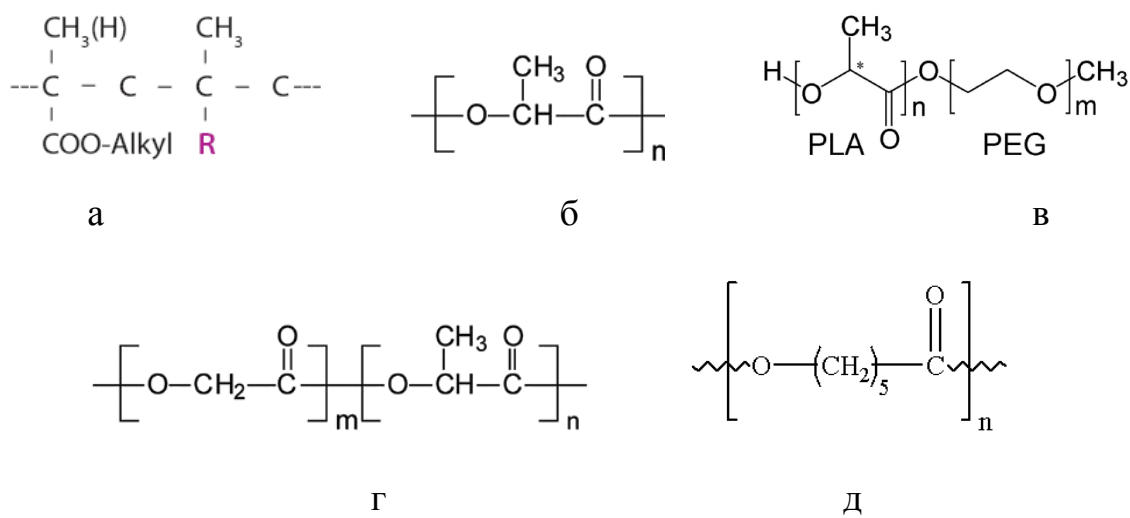


Рис. 1.4. Химическая структура полимеров, применяемых для получения наночастиц: а) полиметакрилаты ($R = \text{COOCH}_3, \text{COOC}_4\text{H}_9, \text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3\text{Cl}^-, \text{COOCH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_2$); б) гомополимер молочной кислоты (ПЛА); в) гомополимер молочной кислоты, модифицированный полиэтиленгликолем (ПЭГ-ПЛА); г) сополимер молочной и гликолевой кислот (ПЛГА); д) поли-ε-капролактон.

При введении в организм ЛВ высвобождается из НЧ путем диффузии и/или десорбции. Выделению веществ также способствуют набухание полимерной матрицы, ее эрозия и деградация. Поскольку скорость деградации полимеров, используемых для получения НЧ, варьирует в широких пределах – от нескольких часов (полиалкилцианоакрилаты, ПАЦА) до нескольких месяцев (полилактиды) – применение наносомальной формы позволяет достигать контролируемого (в том числе пролонгированного) выделения активного ингредиента. Таким образом, выбор полимера-носителя является одним из ключевых факторов этой технологии, в значительной степени определяющим такие важные параметры наносомальной формы, как

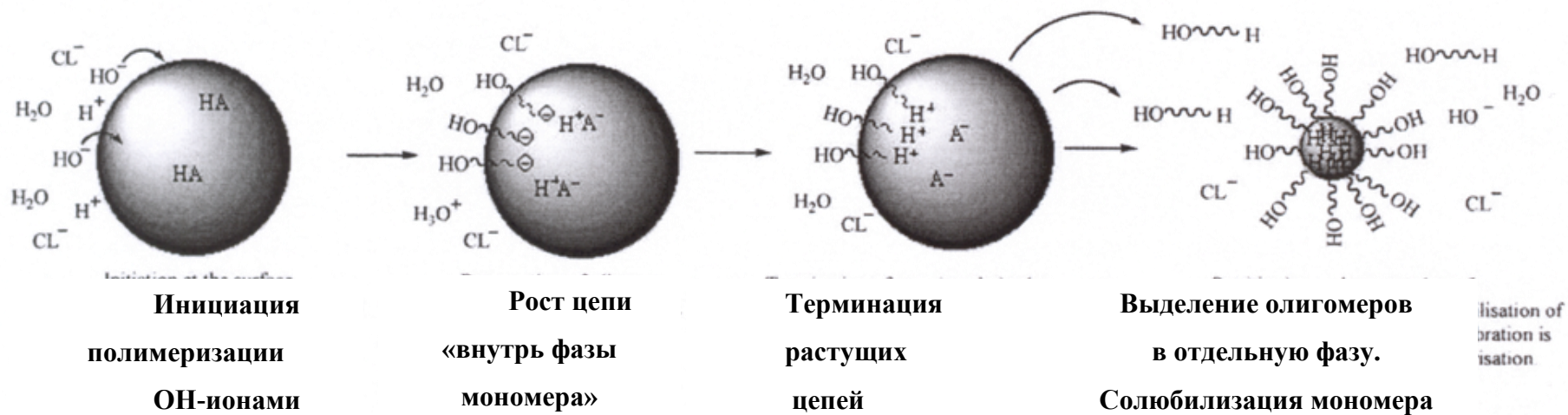


Рис.1.5. Превращение растущей цепи полиалкилцианоакрилатов [Behan N., 2001].

эффективность включения активного ингредиента и скорость его выделения, свойства поверхности, скорость биodeградации и, в конечном счете, параметры биораспределения и терапевтическую эффективность такой формы.

Таблица 1.3

Сравнительные характеристики полилактидов и полиалкилцианоакрилатов [Гельперина С.Э., 2009].

Полимеры	Достоинства	Недостатки
Полиалкил-цианоакрилаты (ПАЦА)	Простота получения Низкая токсичность Экономичность Быстрая биodeградация Низкая молекулярная масса (2-4 кДа) обеспечивает полное и быстрое выведение полимера из организма	Неэффективная сорбция высоко гидрофобных и высоко гидрофильных соединений Быстрая биodeградация
Гомополи-меры молочной кислоты (ПЛА) и сополимеры молочной и гликолевой кислот (ПЛГА)	Гибкая технология: Широкий выбор полимеров фармацевтического назначения Возможность регулировать скорость биodeградации и гидрофобность Возможность сорбции гидрофобных и гидрофильных соединений Низкая токсичность и биосовместимость Наличие лекарственных препаратов на основе ПЛА/ПЛГА	Многоступенчатый процесс получения, сложное аппаратное оформление

В частности, целесообразность применения ПАЦА для получения наносомальных форм обусловлена, прежде всего, их низкой токсичностью и биосовместимостью. Алкилцианоакрилаты, применяемые для получения этих НЧ, широко используются в медицине в качестве хирургических клеев, таких как Indermil[®] (2-н-бутилцианоакрилат, Henkel, Germany), Trufill[®] (2-н-бутилцианоакрилат, Cordis Neurovascular Inc., U.S), Dermabond[®] (2-н-октилцианоакрилат, Ethicon Inc., Johnson & Johnson, U.S.) и др. В процессе получения НЧ образуются низкомолекулярные полимеры

(3000 - 4000 Да), которые в организме подвергаются быстрой деградации в результате ферментативного гидролиза; продукты деградации (полицианоакриловая кислота и соответствующий спирт) выводятся из организма в течение нескольких суток (рис. 1.5.) [Behan N., 2001; Vauthier C., 2008].

Сравнительные характеристики полилактидов и полиалкилцианоакрилатов с точки зрения целесообразности их применения для получения наночастиц - носителей ЛВ приведены в табл. 1.3.

1.3.Распределение наночастиц в организме

Наносомальная форма существенным образом изменяет распределение ЛВ в органах и тканях, влияя, таким образом, и на их фармакодинамические свойства. В связи с этим изучение биораспределения является важнейшим этапом конструирования и оценки наносомальной формы. Сравнение профилей распределения наносомальной и стандартной лекарственных форм позволяет прогнозировать, сможет ли включение ЛВ в НЧ повысить селективность или снизить токсичность.

Внутривенное введение. В отличие от микрочастиц, слишком крупных для внутривенного введения, НЧ после могут беспрепятственно распространяться по капиллярной сети и проникать в клетки. Попадая в кровоток, НЧ, подобно любым другим коллоидным носителям, быстро адсорбируют белки плазмы. Этот процесс, известный под названием «опсонизация», играет решающую роль в биораспределении частиц. Опсонизированные НЧ распознаются системой мононуклеарных фагоцитов (СМФ), которая выполняет функцию по очистке крови от посторонних частиц, в том числе, например, бактерий. Основную роль в этом процессе играют макрофаги печени (клетки Купфера), и, в меньшей степени, макрофаги селезенки и костного мозга, а также циркулирующие

моноциты. Соответственно, основная фракция внутривенно введенных НЧ аккумулируется в печени.

Преимущественный захват НЧ макрофагами печени представляет собой классический пример пассивной и, в то же время, специфической доставки ЛВ, осуществляемой благодаря физико-химическим свойствам носителя и физиологическим особенностям организма. Захват НЧ макрофагами происходит путем эндоцитоза. Эффективность этого процесса настолько велика, что внутриклеточные концентрации наносомальных форм могут в несколько раз превышать концентрации, достигаемые при введении ЛВ в растворе. Именно этим и объясняется высокая эффективность наносомальных форм антибиотиков при лечении инфекций, для патогенеза которых характерна локализация возбудителей в резидентных макрофагах или циркулирующих моноцитах [Pinto-Alphandary H., 1994]. Однако в тех случаях, когда мишенью терапии являются другие органы и ткани, клетки Купфера становятся серьезным препятствием для направленной доставки ЛВ. В связи с этим возникли и продолжают развиваться технологии, позволяющие создавать коллоидные носители, способные избежать захвата макрофагами и длительно циркулировать в кровотоке.

Процесс узнавания НЧ макрофагами и их вывода из системы кровообращения (клиренс) в значительной степени зависит от их физико-химических свойств, в частности, от размера и свойств поверхности. Так скорость фагоцитоза, а, следовательно, и клиренс возрастают с ростом размера НЧ. Гидрофобные НЧ в большей степени подвержены опсонизации и поэтому быстро выводятся из кровяного русла, в то время как частицы с более гидрофильной поверхностью сорбируют меньше опсонинов, благодаря чему могут циркулировать в организме в течение более продолжительного времени.

Наиболее распространенный подход к созданию длительно циркулирующих частиц состоит в гидрофилизации их поверхности путем

создания пространственного (стерического) барьера, препятствующего сорбции белков. Стерическая стабилизация наночастиц создает так называемый «стелс-эффект» (от англ. *stealth* - невидимый), позволяющий НЧ стать «невидимыми» для макрофагов и избежать захвата. Теоретические и технологические принципы, лежащие в основе создания НЧ типа «стелс», изложены в обзорах С.М. Могими и соавт. [Moghimi S.M., 2001, 2003].

Обычно стерическая стабилизация циркулирующих в организме наноносителей достигается за счет модификации поверхности готовых НЧ неионогенными поверхностно-активными веществами (ПАВ) или включения этих ПАВ в НЧ в процессе их получения.

Кроме того, стерическую стабилизацию можно осуществить, привив к поверхности частиц цепи ПЭГ или используя для получения НЧ амфифильные сополимеры. Во всех случаях ориентированные вовне гидрофильные цепи стелс-агентов обеспечивают пространственную защиту поверхности НЧ (рис. 1.6).

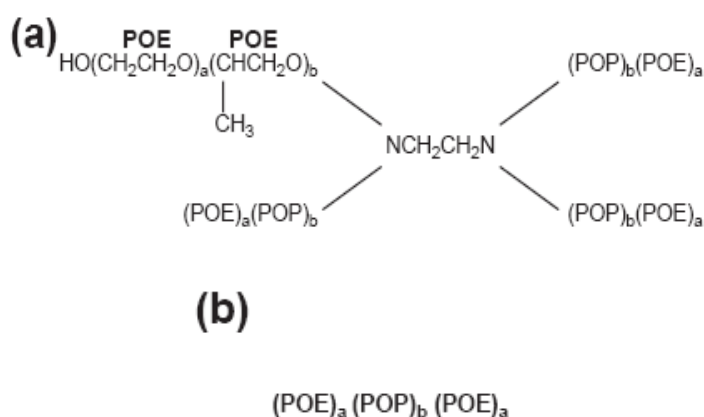


Рис. 1.6. Химическая структура полуксаминов (a) и полуксамеров (b).

POE – полиоксиэтилен, POP – полиоксипропилен

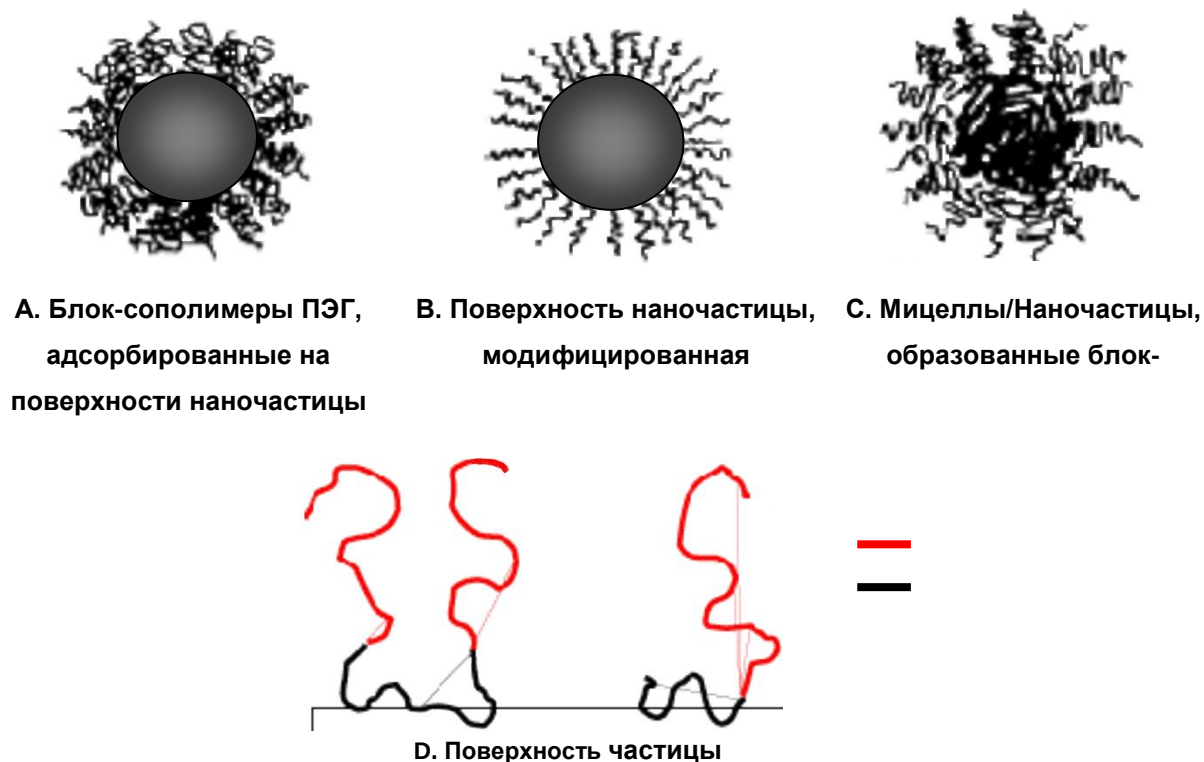
В качестве стерических стабилизаторов наиболее часто применяют производные полиэтиленгликоля (ПЭГ). Среди большого числа таких соединений можно выделить - полуксамеры (Synperonic[®], Pluronic[®]) и полуксамины (Tetronic[®]), представляющие собой блок-сополимеры полиэтиленоксида и полипропиленоксида (рис. 1.7). Присутствие

гидрофильных и гидрофобных сегментов в молекулах этих полимеров обуславливает их поверхностно-активные свойства; некоторые из них используются в фармацевтической промышленности [Moghimi S.M., 2000].

Следует отметить эффективность этих подходов для разных типов НЧ. В частности, модификация поверхности полуксамерами или полксаминами обеспечивает длительную циркуляцию НЧ из полиметилметакрилата [Araujo L., 1999], ПАЦА [Calvo P., 2001], полилактидов [Redhead H.M., 2001] и полистирола [Stolnik S., 2001].

Покрывание поверхности наночастиц полуксамерами или полксаминами является наиболее простым способом гидрофилизации. Преимуществом этого метода по сравнению с модификацией наночастиц путем ковалентной прививки ПЭГ является его рациональность: используются только фармацевтические ингредиенты, не подвергшиеся химической модификации. Различные способы стерической защиты наночастиц представлены на рис. 1.7.

Полуксамеры и полксамины прочно сорбируются на гидрофобной поверхности наночастиц с помощью центрального гидрофобного блока – полипропиленоксида; при этом гидрофильные блоки полиэтиленоксида обращены в водную фазу, что обеспечивает стабильность суспензии. Подвижные и сильно гидратированные сегменты ПЭГ создают гидрофильное «облако» на поверхности наночастиц. Это «облако» и предотвращает адсорбцию опсонинов и других белков плазмы и снижая фагоцитоз частиц. При внутривенном введении такие частицы дольше удерживаются в системном кровотоке. Показано, что в наибольшей степени предотвращают фагоцитоз полимеры, содержащие не менее 40 звеньев пропиленоксида и 70 звеньев этиленоксида, такие, например, как полуксамер-407 и полксамин-908 (табл. 1.4) [Moghimi S.M., 2000].



Конформация блок-сополимеров полиэтиленоксида (ПЭО) и полипропиленоксида (РРО) (типа Pluronic®) на поверхности наночастицы

Рис. 1.7. Схематическое изображение длительно циркулирующих наночастиц: а) полистирольные наночастицы, покрытые полуксаминами или полуксамерами; в) полистирольные наночастицы с привитым на поверхности ПЭГ; с) ПЛГА наночастицы, покрытые блок-сополимером полилактид-гликолид-ПЭГ; d) самоорганизующие частицы из тройного блок-сополимера полилактид-гликолид-ПЭГ [Stolnik S., 1995].

Таблица 1.4

Свойства полуксамера 407 и полуксамина 908 [Moghimi S.M., 2000].

Полимер	Ср. молекулярная масса, Да	Гидрофильно-липофильный баланс	Биологическая активность
Полуксамер 407	12600	22	Стерическая защита полимерных частиц (стелс-эффект), стимуляция макрофагов, стимуляция продукции ЭФР
Полуксамин 908	25000	31	Стерическая защита полимерных частиц (стелс-эффект), стимуляция макрофагов

Столник и соавт. изучали биораспределение полистирольных частиц размером 40, 70 и 137 нм, модифицированных различными количествами полоксамера 407 [Stolnik S., 2005]. Немодифицированные частицы любого размера быстро покидали кровоток, через 1 час после инъекции в плазме обнаруживали менее 10 % введенной дозы. Через 3 часа после инъекции большая часть дозы оказывалась в печени. Модификация поверхности наночастиц полоксамером 407 привела к изменению профиля биораспределения, при этом, чем более плотно была покрыта поверхность, тем дольше наночастицы задерживались в кровотоке. Модификация 25 % поверхности привела к пяти-восьмикратному увеличению содержания наночастиц в кровотоке; накопление наночастиц в печени резко снижалось. Покрытие более 25 % поверхности не приводило к дальнейшим изменениям биораспределения наночастиц [Stolnik S., 2001].

Зависимость изменения биораспределения от дозы ПАВа описана также для полоксамина 908. Авторы использовали наночастицы из полиметилметакрилата и показали, что при концентрации полоксамина 908 менее 0,1% биораспределение не меняется, тогда как более высокие концентрации приводят к резкому снижению накопления наночастиц в печени и повышению времени циркуляции в системном кровотоке [Araujo L., 1999]. В частности, показано, что полоксамер 407 (Synperonic® 407) и полоксамин 908 (Tetronic® 908) значительно увеличивают время циркуляции полистирольных наночастиц и повышают их концентрации в плазме за счет снижения накопления в печени [Moghimi S.M., 2000, 2001, 2003; Stolnik S., 2001].

Интересно, что время циркуляции нестабилизированных НЧ продлевается, если за 1-3 часа до их введения крысы получают внутривенную дозу стелс-агента — полоксамера 407 или полоксамина 908. Очевидно, в этом случае частицы адсорбируют ПАВ, циркулирующее в крови [Moghimi S.M., 1997].

Другое важное наблюдение свидетельствует о том, что однократное внутривенное введение длительно циркулирующих (покрытых поллоксамином 908) НЧ вызывает значительные изменения таких параметров следующей дозы, как период полувыведения и профиль биораспределения, причем выраженность этого эффекта зависит от размера дозы и интервала между инъекциями [Moghimi S.M., 1997]. Этот феномен, характерный также для липосом, объясняется, вероятно, временным снижением фагоцитарной активности макрофагов после введения большой дозы частиц и нуждается в дальнейшем изучении, поскольку может играть важную роль при разработке схем лечения.

Снижение накопления стелс-НЧ в печени приводит к повышению их концентрации в других органах, например, в селезенке и легких [Peracchia M.T., 1999; Moghimi S.M., 2001]. Особенно интенсивно этот процесс протекает в случае твердых частиц, превосходящих по размеру расстояния между эндотелиальными клетками (200 - 250 нм), что создает предпосылки для направленной доставки лекарственных веществ в селезенку.

Другие пути введения. Распределение НЧ при пероральном введении в организм служило предметом многих исследований; результаты обобщены в обзорах [Florence A.T., 2001, 2004; Delie F., 2005]. Трудности доставки с помощью НЧ при этом способе введения связаны с морфологическими и физиологическими особенностями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ). Возможны следующие пути абсорбции НЧ из ЖКТ: а) в результате трансцитоза, опосредованного М-клетками, б) в результате захвата эпителиальными клетками, выстилающими кишечник; в) за счет абсорбции пейеровыми бляшками. Эффективность абсорбции и транспорта НЧ через слизистую ЖКТ зависят от их физико-химических свойств, в основном от размера и состава. В частности, биоадгезивные свойства полимерных НЧ способствуют абсорбции связанных с ними ЛВ из ЖКТ в кровь [Behrens I., 2002; Sakuma S., 2002]. Так НЧ, обладающие сродством к слизистой оболочке желудка, могут повысить биодоступность

трудно растворимых веществ [Yang S., 1999; Ubrich N., 2005] или веществ, подвергающихся метаболизму в желудке [Natarajan J., 2012].

При внутримышечном или подкожном введении мелкие НЧ быстро концентрируются в соседних с местом введения (регионарных) лимфатических узлах. Это свойство частиц может быть полезным, когда мишенью химиотерапии является отдельный лимфатический узел или группа узлов. Параметры распределения НЧ в лимфатической системе можно регулировать с помощью стелс-технологии. НЧ с модифицированной поверхностью избегают захвата макрофагами лимфоузлов, достигают системы кровообращения и могут циркулировать в крови в течение продолжительного времени [Moghimi S.M., 1994; Moghimi S.M., 2003]. Так через 2 ч после подкожного введения частиц из полистирола размером 60 нм, модифицированных полоксамером 407 или полоксамином 908, в крови обнаруживается более 70 % дозы; для немодифицированных частиц этот показатель составляет менее 20 %.

1.4. Распределение наночастиц в условиях патологии

В здоровом организме внутривенно введенные НЧ могут покинуть сосудистую систему только в тех участках, где встречаются фенестрированные или синусоидные капилляры, например, в печени или селезенке. Однако проницаемость капилляров может повышаться в случаях патологии, например, в зоне роста опухоли или при воспалительном процессе. Этот феномен создает предпосылки для эффективного лечения этих заболеваний с помощью наносомальных препаратов. Однако, несмотря на то, что повышенная проницаемость сосудов в опухоли способствует проникновению НЧ в опухолевые клетки, существует целый ряд факторов, который затрудняет этот процесс. К ним относится неоднородная структура сосудов, питающих опухоль, нарушения кровотока в том или ином участке пораженной ткани, повышение гидростатического давления и, как результат, компрессия и

коллапс кровеносных сосудов внутри опухоли [Jain R.K., 2001; Padera T.P., 2004; Ruoslahti E., 2010].

Несмотря на вышеперечисленные проблемы, внутривенно введенным НЧ и макромолекулам с молекулярным весом более 45 кДа все же удастся проникать через эндотелий и накапливаться в опухоли. Типичное для неопластических тканей нарушение оттока лимфы способствует удерживанию частиц. В мировой литературе это явление, впервые описанное [Maeda H., 1989] для макромолекулярных пролекарств, получило название эффекта «повышенной проницаемости и удерживания» (от англ. *Enhanced Permeation and Retention (EPR) Effect*). Схематично EPR effect представлен на рис.1.8.

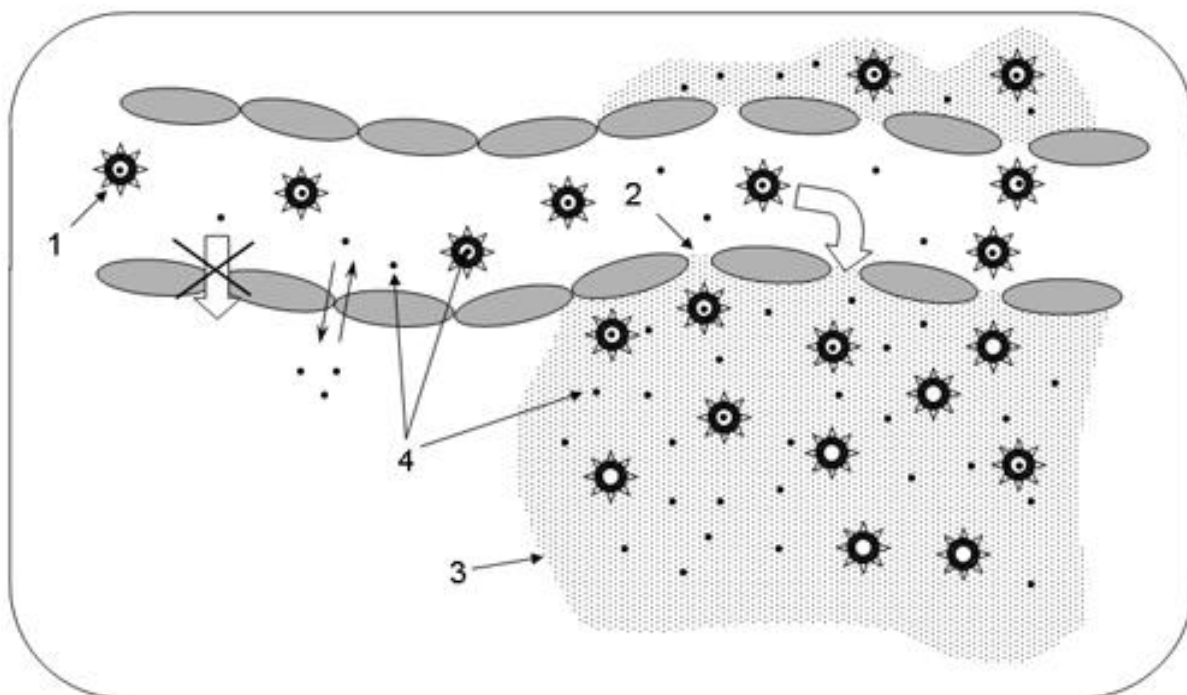


Рис. 1.8. Эффект повышенной проницаемости и накопления (пассивный транспорт-накопление в опухолевой ткани): 1-наночастицы; 2-фенестры; 3 – зона опухолевого роста; 4- ЛВ

Со временем эффект EPR лег в основу широко распространенной в настоящее время концепции пассивной доставки ЛВ в солидные опухоли при помощи макромолекулярных и коллоидных носителей. Накопление НЧ в опухолях отмечали многие авторы [Kaul G., 2004; Miura H., 2004; Yi Y., 2005; Maeda H., 2013]. Таким образом, в случае солидных опухолей

направленная (хотя и пассивная) доставка наносомальной формы в опухоль осуществляется за счет физико-химических свойств носителя (то есть его коллоидной природы) и патофизиологических особенностей мишени (то есть эффекта EPR).

Диффузия или конвекция НЧ в опухолевую ткань зависит от вида опухоли и ее микроокружения. Согласно данным Хоббса и сотр. [Hobbs S.K., 1998] НЧ скорее всего преодолевают эндотелиальный барьер, проникая через открытые межэндотелиальные контакты или трансэндотелиальные каналы, а не в результате фагоцитоза или везикулярного транспорта. Авторы этого исследования определяли проницаемость сосудов в опухолях по их способности пропускать длительно циркулирующие липосомы или латексные наночастицы, модифицированных ПЭГ. В качестве моделей использовали подкожно имплантированные мышам карциномы молочной железы и прямой кишки, гепатомы, глиомы и саркомы. Размер пор в капиллярах, питающих эти опухоли, составлял от 200 нм до 1,2 мкм (в основном 380 - 780 нм); для сравнения: диаметр фенестр эндотелия сосудов печени составляет 106 - 175 нм. В случае интракраниальных опухолей размер пор был значительно меньше. Показано также, что эффективность трансэндотелиального транспорта снижается при проведении антиангиогенной терапии. Эти результаты предполагают, что доставка НФ в интракраниальные опухоли может быть менее эффективной по сравнению с подкожными опухолями или опухолями мягких тканей. Очевидно также, что применение наносомальных форм наиболее перспективно для опухолей с развитой сосудистой системой.

Приведенные выше данные коррелируют с результатами Й. Лоде и сотр. [Lode J., 2001], показавших, что уровень накопления стерически стабилизированных полиметилметакрилатных НЧ в экспериментальных опухолях коррелирует с экспрессией эндотелиального фактора роста сосудов (VEGF), который является маркером опухолевого ангиогенеза.

Наиболее высокая экспрессия VEGF была найдена в подкожно имплантированной меланоме B16; эта опухоль накапливала и наибольшее количество частиц. С другой стороны, в клетках интрацеребральной глиобластомы U-373 экспрессия VEGF была незначительной; в то же время эта опухоль практически не накапливала частиц. Таким образом, для эффективной доставки в экстраваскулярные мишени, к которым относятся и солидные опухоли, размер НЧ приобретает решающее значение: он должен соответствовать размеру пор сосудов в опухоли.

1.5. Основные направления применения полимерных наночастиц.

Химиотерапия экспериментальных опухолей

Наиболее значительная часть работ, посвященных исследованиям в области наносомальных систем доставки, относится к химиотерапии злокачественных новообразований. Результаты этих исследований обобщены в ряде обзоров [Moghimi S.M., 2006; Vijayaraghavalu S., 2007; Alexis F., 2008]. Вне зависимости от механизма действия, успех лечения зависит от физико-химических свойств системы доставки ЛВ. Как правило, носители, обладающие способностью циркулировать в организме более продолжительное время, с большей долей вероятности попадают в мишени, находящиеся за пределами СМФ.

Очевидно, что способность НЧ накапливаться в органах СМФ может быть использована для химиотерапии опухолей, локализованных в этих органах. Действительно, еще в 1989 г. Н. Чианнилкулчай и соавт. показали, что доксорубин, связанный с ПАЦА НЧ проявляет высокую эффективность в отношении метастазов в печени, вызванных внутривенным введением клеток ретикулосаркомы M5076 мышам [Chiannilkulchai N., 1989]. Согласно данным гистологического исследования, у животных, получавших наносомальный доксорубин,

количество метастазов и их размеры были значительно меньше, чем у животных, получавших стандартную лекарственную форму доксорубина. Интересно отметить, что у интактных животных и у мышей с опухолями концентрация антибиотика в печени была практически одинаковой. Подробное изучение биораспределения доксорубина показало, что, несмотря на то, что НЧ не накапливались избирательно в опухолевой ткани, а были в основном сосредоточены в клетках Купфера, эти клетки послужили резервуаром, обеспечившим пролонгированное выделение доксорубина в непосредственной близости от очагов опухолевого роста и поддержание его эффективных концентраций в этих очагах [Chiannilkulchai N., 1990].

Длительно циркулирующие наночастицы. Как отмечалось выше, применение стелс-технологии позволяет повысить противоопухолевый эффект наносомальных препаратов. Например, модифицированные ПЭГ наночастицы ПАЦА (ПЭГ-ПАЦА), обладающие способностью длительно циркулировать в кровяном русле, успешно доставили в опухоль рекомбинантный α -фактор некроза опухоли (rHuTNF- α). Сравнительное изучение фармакокинетики и противоопухолевого эффекта свободного и связанного с НЧ из ПАЦА или ПЭГ-ПАЦА rHuTNF- α проводили на мышцах с внутрикожно имплантированной саркомой S-180. Как и предполагалось, у животных, получавших rHuTNF- α , связанный с модифицированными НЧ, величина интегрального фармакокинетического показателя AUC выросла в три раза по сравнению со свободным rHuTNF- α . Высокое значение AUC, достигаемое с помощью стелс-НЧ, коррелировало с наиболее высоким накоплением rHuTNF- α в опухоли. Более того, связанный с НЧ из ПЭГ-ПАЦА rHuTNF- α подавлял рост опухоли на 78%, в то время как свободный rHuTNF- α лишь на 15%. ПАЦА НЧ показали промежуточные результаты [Li Y.P., 2001].

Преодоление множественной лекарственной устойчивости опухолей с помощью наночастиц. Наиболее трудную проблему для

химиотерапии злокачественных опухолей представляет множественной лекарственной устойчивости, являющаяся причиной ограниченного доступа ЛВ в опухолевые клетки. Для устойчивых к действию лекарств (резистентных) клеток характерен повышенный уровень экспрессии специфических трансмембранных белков, известных под названием «АВС-транспортеры» (от англ. *ATP-binding cassette* – АТФ-связывающая кассета). Основной функцией АВС-транспортеров является связывание нежелательных для клетки молекул и выведение их за пределы клеточной мембраны. Полагают, что основным фактором, ответственным за множественной лекарственной устойчивости при онкологических заболеваниях, является один из АВС-транспортеров, а именно Р-гликопротеин (Р-рр, от англ. *permeability* - проницаемость) [Leslie E.M., 2005]. Многочисленные исследования свидетельствуют о возможности повышения эффективности химиотерапии резистентных опухолей при помощи конкурентных ингибиторов Р-рр; однако этот подход не нашел применения ввиду высокой сопутствующей токсичности.

Наночастицы ПАЦА обладают уникальной способностью преодолевать Р-рр-зависимую устойчивость опухолевых клеток к доксорубину. Следует пояснить, что доксорубин на резистентные клетки не действует: являясь субстратом Р-рр, он в эти клетки просто не проникает. Данные ряда исследований в этой области обобщены в обзоре К. Вотье и соавт. [Vauthier C., 2003]. Так, включенный в полиизобутилцианоакрилатные НЧ доксорубин оказывает сильное цитотоксическое действие на резистентные к нему клетки. В опытах *in vitro* показано, что для преодоления множественной лекарственной устойчивости необходим контакт НЧ с клетками, однако, вопреки ожиданиям, поступление НЧ в клетки вовсе не является необходимым условием для реализации цитотоксического действия. Кроме того, уровень внутриклеточной концентрации доксорубина и его цитотоксичность

зависят от скорости выделения доксорубина из частиц [Couvreur P., 2002].

Для объяснения способности включенного в ПАЦА НЧ доксорубина преодолевать клеточные барьеры был предложен следующий интересный механизм. Вначале НЧ вступают в контакт с мембраной клетки. Последующее проникновение доксорубина в клетку обеспечивается одновременным протеканием двух процессов: выделением доксорубина из НЧ и биодеградацией ПАЦА с образованием водорастворимой полиакриловой кислоты. Именно ионная пара, образованная доксорубином и полиакриловой кислотой, проникает в резистентную клетку, минуя Р-gp.

Высокая эффективность доксорубина в составе ПАЦА НЧ была продемонстрирована в экспериментах на трансгенных мышах Х/тус с гепатоцеллюлярной карциномой, которая характеризуется повышенным уровнем экспрессии генов множественной лекарственной устойчивости [Barraud L., 2005]. Цитотоксический эффект НФ доксорубина, оцениваемый по скорости апоптоза опухолевых клеток, значительно превосходил эффект стандартной лекарственной формы антибиотика. Более того эффект НФ был высоко специфичен, поскольку повышение уровня апоптоза было характерно только для опухолевых клеток, в то время как в нормальных гепатоцитах, окружающих опухоль, этот уровень оставался неизменным.

Еще более эффективное преодоление устойчивости к доксорубину было достигнуто с помощью ПАЦА НЧ, содержащих доксорубин и циклоспорин А (ингибитор Р-gp) [Soma C.E., 2000]. НЧ получали таким образом, чтобы доксорубин находился внутри частицы, а циклоспорин А – на ее поверхности. Опыты *in vitro* на совместных культурах резистентных к доксорубину клеток линии Р388 и макрофагов показали, что такие НЧ более эффективно тормозят рост клеток Р388, чем частицы без циклоспорина А. По мнению авторов, повышение активности НЧ,

содержащих доксорубицин и циклоспорин А, достигалось в результате синергетического действия: включение этих ЛВ в НЧ обеспечивало их одновременное выделение вблизи клеточной мембраны, что способствовало более эффективному подавлению активности Р-гр.

В настоящее время в клинической практике при химиотерапии злокачественных новообразований используются высокоактивные цитостатики, в частности – таксаны. Однако, быстрое возникновение резистентности в клинике вследствие экспрессии Р-гр существенно снижает их эффективность.

Паклитаксел является первым представителем цитостатиков из группы таксанов (рис. 1.9.). Впервые он был выделен в 1971 г. из коры тисового дерева *Taxus brevifolia* [Wani M.C., 1971]. В настоящее время его также получают полусинтетическим и синтетическим путем. Паклитаксел является ингибитором митоза. Связываясь с бета-тубулином микротрубочек, паклитаксел нарушает процесс деполимеризации этого ключевого протеина, что приводит к подавлению нормальной динамической реорганизации сети микротрубочек без которой невозможно осуществление клеточных функций в фазе митоза [Brito D.A., 2008; McGrogan B.T., 2008]. Кроме того, паклитаксел вызывает образование аномальных пучков микротрубочек в течение всего клеточного цикла и образование нескольких центриолей во время митоза [Podolski-Renic A., 2011].

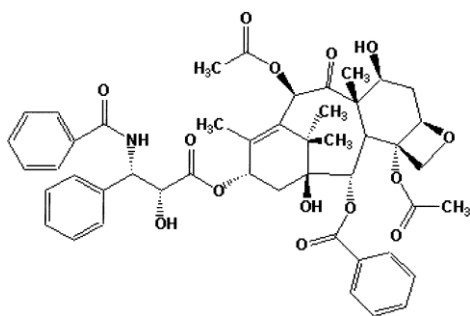


Рис. 1.9. Структурная формула паклитаксела

Химическое название паклитаксела: $5\beta, 20$ -НсРЭЧкси-1, $2\alpha, 4, 7\beta/13\alpha$ -гексагидрокситакс-11-ен-9-он-4, 10-диацетат-2-бензоат 13-эфир с (2R, 3S)-N-бензоил-3-фенилизосерин.

Паклитаксел представляет собой кристаллический порошок белого цвета. Растворим в ацетоне, умеренно растворим в этиловом и метиловом спирте, практически не растворим в воде. Температура плавления паклитаксела составляет $216-217\text{ }^{\circ}\text{C}$. У паклитаксела относительно высокая молекулярная масса (854 кДа), и в то же время очень низкая растворимость в воде ($<0,03\text{ мг/мл}$).

Паклитаксел обладает мощным цитотоксическим эффектом в исследованиях *in vitro*, однако его клиническое применение лимитировано следующими показаниями: немелкоклеточный рак легкого, рак яичников, рак молочной железы и саркома Капоши у больных СПИД-ом. Паклитаксел входит в европейские и российские клинические рекомендации как препарат первой и второй линии при перечисленных выше показаниях [Переводчикова Н.И., 2001; Артамонова Е.В., 2004; Tulpule A., 2002; Stebbing J., 2003; Dhillon T., 2005]. Паклитаксел является субстратом Р-gp, в связи с чем его эффективность в отношении резистентных опухолей существенно снижается [Ott G.A., 2003; Chavanpatil M.D., 2006; Vicari L., 2008]. Кроме того, низкая растворимость паклитаксела требует введения в лекарственную форму высокотоксичного солюбилизатора Cremophor EL®. Можно полагать, что преодолеть множественную лекарственную устойчивость и улучшить биофармацевтические характеристики паклитаксела представляется возможным путем создания его наносомальной формы.

Лечение экспериментальных патологий ЦНС

Мозг наименее доступен для фармакотерапии из-за наличия гематоэнцефалического барьера (ГЭБ), который регулирует обмен веществ между кровью и нервной тканью (мозгом). Основные структурные

элементы ГЭБ – мембраны клеток эндотелия, периваскулярная базальная мембрана, и мембраны ножек глиальных клеток, окружающих сосуды [Begley D.J., 2004]. Для эндотелиальных клеток капилляров мозга и хориоидального (сосудистого) сплетения желудочков мозга характерны плотные межклеточные контакты, образующиеся при участии трансмембранных белков (рис. 1.10).

Гематоэнцефалический барьер

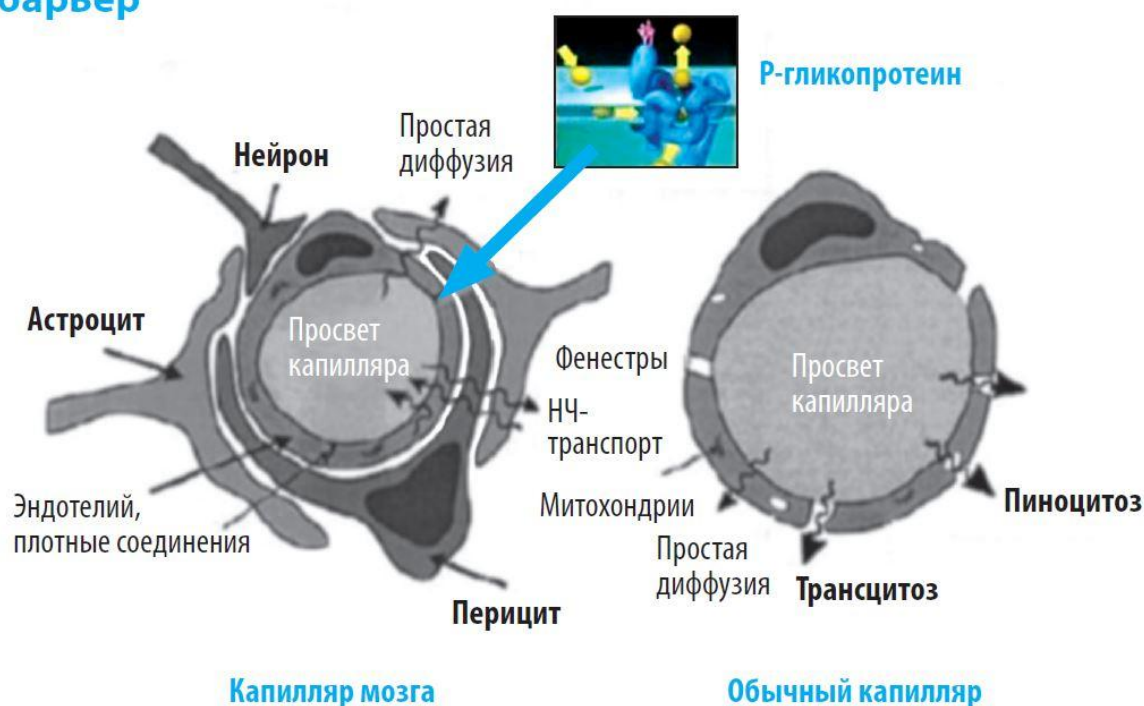


Рис. 1.10. Строение стенки капилляра мозга.

Эндотелиоциты капилляров головного мозга имеют максимальное значение для барьерной функции ГЭБ. Они отличаются от прочих эндотелиоцитов минимальным содержанием пиноцитарных пузырьков, нефенестрированностью и большим содержанием митохондрий, что свидетельствует о затрудненном трансцеллюлярном транспорте жидкости и доминировании энергозависимых видов трансмембранного транспорта [Cervos-Navarro J., 1988].

Парацеллюлярный транспорт в ГЭБ затруднен из-за особого соединения эндотелиоцитов, которое получило название "плотное соединение" (tight junction, zonula occludens) и "склеивающее соединение"

(adherens junction). Боковые поверхности эндотелиоцитов содержат встроенные в мембрану молекулы белков: окклюдина [Rubin L.L., 1999], клаудинов, цингулина, ZO-1, ZO-2, ZO-3 и 7H6 [Kniesel U., 2000]. Эти протеины являются фрагментами системы "плотного соединения". Строение "плотного соединения" схематично представлено на (рис. 1.11).

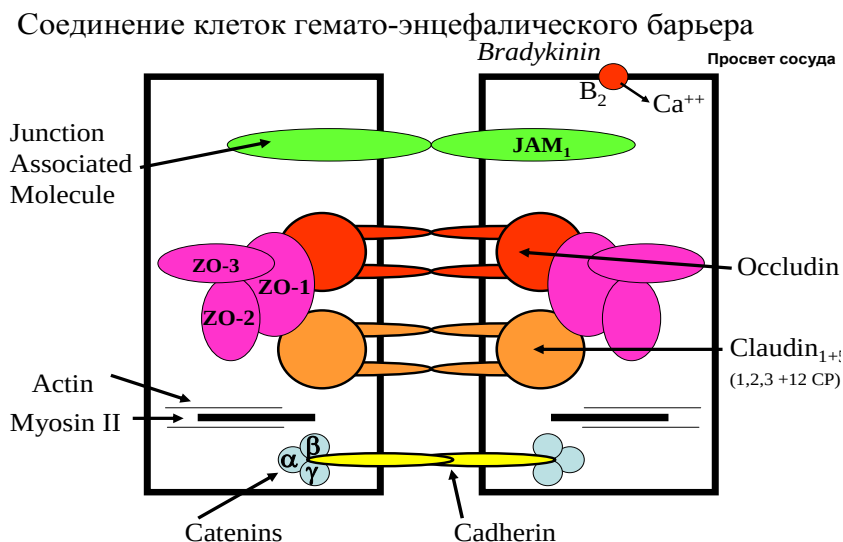


Рис. 1.11. Строение клеток гематоэнцефалического барьера.

Трансмембранные протеины, обеспечивающие контакт между соседними эндотелиоцитами, представлены окклюдинами, клаудинами и JAM. Клаудины и окклюдин имеют по 4 трансмембранных домена и образуют 1 интрацеллюлярную и 2 экстрацеллюлярных петли. С- и N-терминалы имеют цитоплазматическую локализацию, причем с С-терминалом сопряжены интрацеллюлярный мембранный домен и ферментные системы. Внеклеточные петли окклюдина и клаудинов образуют между собой ковалентные транс-связи (обеспечивающие соединение эндотелиоцитов друг с другом) и цис-связи (обеспечивающие деформацию мембран эндотелиоцитов путем закручивания по линиям сращения) [Wolburg H., 2002]. JAM-1 отличается от окклюдина и клаудинов тем, что имеет только один трансмембранный домен, внеклеточно локализованную N-терминаль и внутриклеточно локализованную С-терминаль. Интрацеллюлярный мембранный домен, сопрягающий окклюдин с актиновым цитоскелетом, обозначается как

"протеины бляшек плотного соединения" (TJ-plaque protein). К ним относятся: MAGUK (семейство гомологов гуанилаткиназы, ассоциированных с мембраной), AF6, 7H6, 19B1. Одним из доменов MAGUK является семейство протеинов ZO (Zonula occludens). В настоящее время их известно несколько: ZO-1, ZO-2 и ZO-3, причем, вероятнее всего, ключевую роль в сопряжении с актиновым цитоскелетом играет ZO-1. Этот протеин может сопрягаться напрямую с F-актином — либо через катенин или ZO-2. Напрямую с актиновым цитоскелетом может быть связан AF6. Из других протеинов, сопрягающих трансмембранные белки с актиновым цитоскелетом, известны цингулин и симплекин. Системы сопряжения трансмембранных протеинов внутриклеточными метаболическими процессами представлены для окклюдина: протеинкиназами, ГТФ-связывающими протеинами, гетеромерными G-белками, фосфолипазой C.

Принцип организации "склеивающего соединения" не отличается от такового для "плотного соединения". Трансмембранным протеинами являются кадгерин, интегрин. По структуре они напоминают JAM-1 "плотного соединения". Они имеют один трансмембранный домен. Их N-терминали имеют внеклеточную локализацию и обеспечивают контакт между соседними эндотелиоцитами. C-терминали имеют внутриклеточную локализацию и образуют связь с интрацеллюлярным мембранным доменом. Интрацеллюлярный мембранный домен в структурах "склеивающего соединения" называется комплексом фокальной адгезии (Focal Adhesion Complexes, FAC). Протеинами комплекса фокальной адгезии являются α -актинин, паксиллин, талин, винкулин и катенины. Они, в свою очередь, представлены α -, β - и γ -катенином (последний известен как плакоглобин) [Pardridge W.M., 2003].

"Плотное соединение" не является генетически детерминированной особенностью эндотелиоцитов ГЭБ, а формируется как результат межклеточных взаимодействий в период эмбриогенеза [Wolburg H., 2002].

В культуре тканей эти различия появляются только в случае, когда эндотелиоциты и астроглиоциты культивируются совместно. Кроме того, Huber O. с соавт. [Huber O., 2012] в исследованиях с последовательной электронной микроскопией срезов куриных эмбрионов показали, что на 13-е сутки снижается проницаемость эндотелиоцитов для пероксидазы хрена (что является косвенным подтверждением начала формирования "плотного соединения"), и на поверхности эндотелиоцитов появляется особый протеин (массой 74 kDa), имеющий, по всей видимости, отношение к некоторым механизмам активного транспорта. Это совпадает по времени с развитием ножек астроглиоцитов. Bertossi с соавт. [Virgintino D., 1998] в аналогичных исследованиях на 8, 14 и 17-е сутки показали, что в эндотелиоцитах постепенно уменьшается количество пиноцитарных пузырьков и вакуолей трансэндотелиального транспорта, а между эндотелиоцитами формируется плотное соединение", т.е., эндотелиоциты приобретают особенности эндотелия ГЭБ. Процесс формирования указанных особенностей начинается с момента покрытия капиллярной стенки ножками астроглиоцитов. Таким образом, было показано, что основным фактором, способствующим формированию специфических для эндотелиоцитов ГЭБ особенностей, является воздействие на эндотелиальные клетки ножек астроглиоцитов.

Благодаря указанным выше морфологическим особенностям ГЭБ создает надежную преграду на пути циркулирующих в крови продуктов обмена веществ и ксенобиотиков, не позволяя им проникать в мозг путем диффузии. Поглощение и экскреция жизненно важных соединений, таких как аминокислоты, гексозы, нейропептиды и белки осуществляется при участии специфических транспортных систем. Путем пассивной диффузии преодолевать ГЭБ могут только низкомолекулярные липофильные соединения (м.м.<500 Да) [Begley D.J., 2004].

Кроме того, проникновению многих липофильных ЛВ в мозг препятствуют системы обратного «очистительного» транспорта,

представленные в эндотелиоцитах ГЭБ Р-gr и сходными с ним белками MRP. Впервые на несоответствие между липофильностью лекарственных веществ и их проникновением через ГЭБ указал Begley D.J. [Begley D.J., 2004], в связи с чем было сделано предположение о том, что в структурах ГЭБ может существовать система обратного "очистительного" транспорта (выкачивания) веществ, подобная системе, обуславливающей резистентность опухолей к противобластным препаратам. Помимо опухолевой ткани Р-gr обнаружен в ряде здоровых тканей: почечных клубочках, кишечнике, яичках, яичниках, поджелудочной железе и пр., где локализован в клетках эпителия и эндотелия. В эндотелиоцитах ГЭБ Р-gr существует в двух изоформах: MDR1-Pgp и mdrla-Pgp (от Multidrug Resistance), кодируемых разными генами.

Системы обратного "очистительного" транспорта имеют сходное принципиальное строение (рис. 1.12).

Они представляют собой интегральную мембранную фосфогликопротеиновую макромолекулу молекулярной массой 170 kDa, состоящую из 1280 аминокислотных остатков. Молекула имеет две гомологичные половины, соединенные друг с другом небольшим линкерным участком. Каждая половина имеет по 6 трансмембранных доменов и по 1 цитозольному участку связывания АТФ. Они расположены позади 6 (на N-терминали) и 12 (на С-терминали) доменов и обладают высокой внутренней каталитической активностью, которую "запускает" взаимодействие лиганда с активным центром [Batrakova E.V., 2008]. Активные центры располагаются между 5 и 6 (на N-терминали) и 11 и 12 (на С-терминали) доменами и могут функционировать независимо друг от друга, связывая и транспортируя одновременно два разных вещества [Lebedeva I.V., 2011].

У человека синтез Р-gr детерминирован генами MDR1 и MDR2. У мышей эту функцию выполняют гены mdrla, mdrlb и mdr2. В норме Р-gr синтезируется в эпителиоцитах разных тканей, а также в эндотелиоцитах

(в т.ч. головного мозга). Не вызывает сомнения, что основной локализацией Р-гр, обеспечивающей барьерную функцию ГЭБ, являются люминальные мембраны эндотелиоцитов. Это подтверждается исследованиями Beaulieu E. [Beaulieu E., 1996]. Однако подобные системы существуют и в других структурах ГЭБ. Так, Golden и Pardridge [Golden P.L., 2000], а также Decleves X. [Decleves X., 2011] показали, что Р-гр может локализоваться в ножках астроцитов.

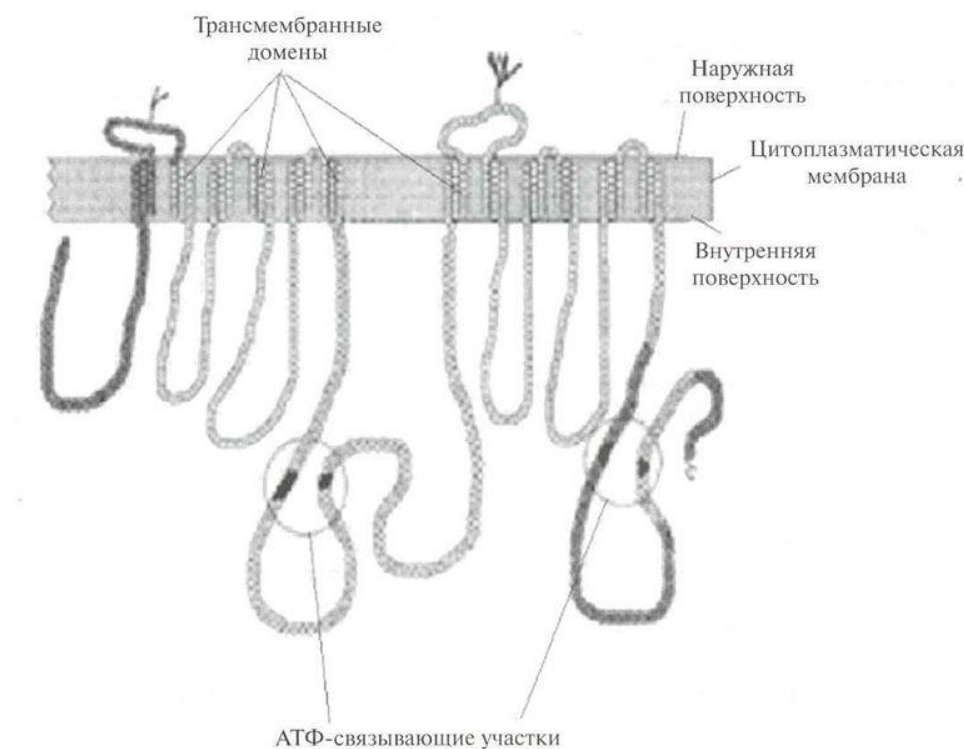


Рис. 1.12. Строение транспортеров «очистительного» транспорта клеток гематоэнцефалического барьера.

Имеются данные о том, что Р-гр может быть не единственной системой, препятствующей проникновению лекарственных веществ в головной мозг. Так, описан сходный с Р-гр протеин MRP, входящий с Р-гр в одно суперсемейство ABC-транспортных белков и существующий в двух изоформах: MRP1 и MRP3. Он имеет сходную с Р-гр структуру; локализован в люминальных мембранах эндотелиоцитов, базальных мембранах эпителиоцитов хориоидного сплетения, в ножках астроцитов и осуществляет обратный транспорт из эндотелиоцитов полярных веществ с

отрицательным зарядом (глюкуронидов, а также веществ, находящихся в связи с глутатионом) [Tempestilli M., 2013].

Наличие Р-рр и других систем обратного очистительного транспорта в структуре ГЭБ зачастую не позволяет создать терапевтически значимые концентрации ЛВ в тканях головного мозга, что существенно снижает эффективность терапии нейротропными, противовирусными, антибактериальными и противоопухолевыми препаратами.

В настоящее время можно считать доказанным, что наночастицы способны доставлять в мозг ЛВ, связанные с ними, в том числе, являющиеся субстратами Р-рр [Alyautdin R.N., 1995; 1997; Gulyaev A.E., 1999; Ambruosi., 2006; Kreuter J., 2008]. В таблице 1.5 суммирована информация о ЛВ, доставленных в мозг при помощи различных наночастиц.

Таблица 1.5

Лекарственные препараты и вещества, доставленные в головной мозг при помощи полимерных наночастиц [дополнено, Wohlfart S., 2012].

Препарат/ вещество	Действие	Используе- мый полимер	Модификация поверхности наночастиц	Размер нм	Заряд поверх- ности, Мv	Ссылка
Амфотерицин	Противогриб- ковый	ПЛА-ПЭГ	ПС80	114–133	Нет данных	Ren T., 2009
BCNU	Противоопу- холевый	ПЛА	Трансферин	120	-35	Han L., 2012
Бревискапин	Сердечно- сосудистый	ПЛА	P188	127 320	от –34 до –56	Lui M., 2008
Камптотецин	Противоопу- холевый	Поли-ε- капролакто н – ПЭГ	ПЭГ	130 -280	0 до –20	Cirpanli, Y., 2011
Ингибитор каспазы –3	Ингибитор каспазы -3	Хитозан – ПЭГ	ПЭГ + антитела к трансферрину	650	от +18 до +20	Karatas H., 2009
Кумарин –6	Краситель	ПЛА-ПЭГ	ПС80 P 188 P407 ПЭГ Глутатион	194 188 196 200 230-246	-23 -21 -20 -22до +2 нет данных	Kulkarni S.A., 2011 Kulkarni S.A., 2011 Kulkarni S.A., 2011 Chen Y.-C., 2013 Maincent P., 1992
Даларгин	Анальгетик	ПБЦА	ПС80	230	нет данных	Kreuter J.,2002; Ramge R.,

						2000
Дексаметазон	Глюкокортикоид	ПЛГА	Гидрогель альгината	400-600	нет данных	Kim D.H., 2006
Дофамин	Противопаркинсонический	Хитозан	Нет	98-148	+27 до +34	Trapani A., 2011
Доксорубицин	Противоопухолевый	ПБЦА	ПС80	270	нет данных	Steiniger S.C.J., 2004 Hekmatara T., 2009 Petri B., 2007 Gulyaev A.E., 1999 Gelperina S., 2010 Wohlfart S., 2011
		ПЛГА	P 188	240-470	-11 до +16	
Эндоморфин-1	Анальгетик	ПБЦА	ПС80	27#	нет данных	Liu H., 2006
Гемцитабин	Противоопухолевый	ПБЦА	ПС80	112	нет данных	Wang C.X., 2009
Пероксидаза хрена	Фермент	ПБЦА	ПС80	150	нет данных	Schroeder U., 1998
Киоторфин	Анальгетик	ПБЦА	ПС80	195-289	нет данных	Trapani A., 2011
Лоперамид	Агонист опиатных рецепторов	ПБЦА HSA	ПС80 Аро Е 3, А 1, В100	290 218-240	-35 до -13	Alyautdin R.N., 1997; Gelperina S., 2010;
		ПЛГА	P188	178-290	-17 до -25	Gelperina S., 2010;
		ПЛГА	(R)-g7 пептид	139-182	-36 до +31	Xin H., 2012 Trapani A., 2011 Chen Y.-C., 2013
		ПЛГА-ПЭГ	ПЭГ	150		
Метотрексат	Противоопухолевый	ПБЦА Хитозан	ПС80	87#- 318 125-263	нет данных +15 до +31	Gao K., 2006 Friese A., 2000
MRZ 2/576	Антагонист NMDA-рецепторов	ПБЦА	ПС80	251	нет данных	Tosi G., 2011
Обидоксим	реактиватор ацетилхолинэстеразы	ЧСА	Аро Е	230	нет данных	Wagner S., 2010
Паклитаксел	Противоопухолевый	Поли-ε-капролактон – ПЭГ	Ангиопеп	90	нет данных	Gabathuler R., 2010, Xin, H.L. 2011
		ПЛГА-ПЭГ	Глютатион	230-246	нет данных	Wohlfart S., 2011
		Поли-ε-капролактон – ПЭГ	Аптамер	156	-33	Guo J., 2011
		ПЭГ	ПЭГ	73	-4	Xin H., 2010
Прозерин	Ингибитор ацетилхолинэстеразы	ПБЦА	ПС80	280	Нет данных	Басель А., 2006
Ривастигмин	Ингибитор	ПБЦА	ПС80	41#	-35	Wilson B.,

	ацетилхолинэстеразы	Хитозан	ПС80	47#	+30 до +33	2008 Wilson B., 2011
Ритонавир	Ингибитор ВИЧ протеаз	ПЛА#	Трансактивирующий пептид	175	+2	Rao K.S., 2008
Саквинавир	Ингибитор ВИЧ протеаз	ПБЦА	ПС80	192-184	Средний отрицат.	Kuo Y.C., 2007
Сульпирид	Атипичный нейролептик	ПЛА#	Малеимид-ПЭГ	329	-39 до -19	Parikh T., 2010
Супероксид дисмутаза	Радиопротектор	ПЛГА	Блок-кополимеры	291	-25	Reddy M.K., 2009
Такрин	Ингибитор ацетилхолинэстеразы	ПБЦА хитозан	ПС80 ПС80	36# 41#	-40 +35 до +37	Wilson B., 2008 Wilson B., 2011
Темозоломид	Противоопухолевый	ПБЦА	ПС80	136	-25	Tian X., 2011
Тубокурарин	Миорелаксант	ПБЦА	ПС80	230	нет данных	Alyautdin R.N., 1998
TGF-бета антисенс-олигонуклеотид	Антисенсовый олигонуклеотид	ПБЦА	ПС80	нет данных	нет данных	Schneider T., 2008
Вальпроевая кислота	Антиконвульсант	ПБЦА	ПС80	нет данных	нет данных	Darius J., 2000

Примечание: # малые размеры, определенные электронной микроскопией.

Одним из перспективных направлений при разработке средств для лечения нейродегенеративных заболеваний является применение факторов роста нервной ткани, представляющих собой одно- или двухдоменные формы полипептидов, насчитывающие до 200 аминокислот в своем составе. Наиболее изученным представителем белково-пептидных регуляторов, необходимых для нормального роста, созревания, а также поддержания жизнедеятельности нейронов центральной и периферической нервной системы является фактор роста нервов [Levi-Montalcini R., 1987]. Обладая нейротрофическим свойством, ФРН оказывает модулирующее влияние также на иммунную и нейроэндокринную системы [Aloe L., 1994]. В мозге ФРН синтезируется в основном пирамидными нейронами коры, нервными клетками гиппокампа и стриатума, а также астроцитами [Thoenen H. 1987; Anand P., 1997].

ФРН – белок относительно небольшого размера (~130 кДа), отвечающий за сохранение и дифференцировку нейронов, рост и

ремоделирование аксонов и дендритов, состояние цитоскелета, экзоцитоз, формирование и пластичность синапсов [Brancucci A., 2004].

Показано, что при болезни Альцгеймера уровень ФРН снижается в переднем мозге [Sofroniew M.V., 2001], а при дефиците ФРН в центральных холинергических нейронах отмечается уменьшение тел нейронов, а также снижение уровня ацетилхолинтрансферазы. Известно, что ФРН может облегчать холинергическую передачу в нейронах гиппокампа, стимулируя постсинаптические тирозинкиназные рецепторы [Backman C., 1996; Humpel C., 2002]. Имеются данные о вовлечении нейротрофических факторов, в частности, ФРН в модуляцию дофаминергической передачи в мозге [Hardy J., 1999].

В Великобритании были проведены клинические исследования ФРН у пациентов с болезнью Паркинсона при непосредственном (интрацеребральном) введении нейротрофина в мозг. Пациентам с болезнью Паркинсона раз в месяц осуществляли внутримозговые инъекции ФРН. На фоне улучшения общего состояния организма у пациентов были отмечены неблагоприятные побочные эффекты – тошнота, слабость, рвота, которые отчасти связаны с инвазивным способом введения препарата [Hoffer B., 1997].

Основным лимитирующим моментом клинического применения ФРН является его весьма ограниченное проникновение через ГЭБ, что объясняется гидрофильным характером молекулы и высокой молекулярной массой [Castellenos-Ortega M.R., 1999; Banks W., 2000]. Существуют различные подходы для облегчения проникновения ФРН через ГЭБ, среди которых следует отметить интраназальное введение, применение конъюгированных форм ФРН, использование генетически модифицированных векторов и липосомальных систем доставки и др. [Чехонин В.П., 2004; Backman C., 1996; Thorne R.G., 2001; Zhang X., 2005].

Среди других тканевых факторов роста значительный интерес представляет эритропоэтин человека. Эритропоэтин человека по структуре

является кислым гликопротеидом и относится к суперсемейству цитокинов, которое так же включает в себя интерлейкин 3 (ИЛ-3), ИЛ-6, гранулоцитарно-моноцитарный колониестимулирующий фактор (ГМКСФ), пролактин, фактор ингибирующий лейкоз, цилиарный нейротрофический фактор, кардиотрофин. Циркулирующим зрелым белком является молекула эритропоэтина, состоящая из 165 аминокислот и имеющая массу 30,4 kDa [Locatelli F., 2004]. Молекула нсРЭЧ имеет две дисульфидные связи: $\text{cys}^7 - \text{cys}^{159}$, $\text{cys}^{29} - \text{cys}^{33}$. Сайты N-гликозилирования: asn^{24} , asn^{38} , asn^{83} . Сайт O-гликозилирования: thr^{134} . Состав углеводных цепей: фукоза, галактоза, манноза, N-ацетил-глюкозамин, N-ацетил-нейраминная (сиаловая) кислота. Общее содержание углеводов в его молекуле достигает 40-50%. РЭЧ содержит от 4-х до 17 остатков сиаловой кислоты, обеспечивающих биологическую активность и стабильность всей молекулы, защищая ее от повреждения кислородными радикалами [Egrie J.C., 1986; Uchida E., 1997].

В настоящее время рекомбинантный эритропоэтин человека (РЭЧ) применяется в медицинской практике для лечения анемий различного генеза. Помимо влияния на эритропоэз, РЭЧ обладает широким спектром защитных функций. Показано, что при различных повреждениях ЦНС наблюдается активный синтез астроцитами эритропоэтина, который оказывает нейропротективное действие [Buemi M., 2002], ингибируя апоптоз, стимулируя пролиферацию нейронов и ангиогенез. В последнее десятилетие стало известно, что РЭЧ вызывает индукцию экспрессии генов нейротрофинов BDNF и NGF в различных структурах мозга, тем самым также способствуя дифференцировке и поддержанию жизнеспособности периферических и центральных нейронов [Viviani B., 2005]. В экспериментальных и клинических исследованиях показано, что РЭЧ эффективен при ишемическом инсульте [Ehrenreich H., 2002; 2009], геморрагическом инсульте [Tseng M.Y., 2009], травмах головного мозга [Talving P., 2012]. Вместе с тем, эффект нативного РЭЧ, как

нейропротектора, выявляется только в очень высоких дозах, вызывающих ряд побочных эффектов: стимуляция кроветворения и антителообразования. Для РЭЧ выделена изоформа с меньшим содержанием сиаловых кислот (низкосиалированный РЭЧ, нсРЭЧ), являющаяся аналогом т.н. «мозгового» эритропоэтина (NeuroEPO).

Можно полагать, что применение наночастиц с модифицированной поверхностью позволит обеспечить транспорт нсРЭЧ через ГЭБ.

Лечение экспериментальных внутриклеточных инфекций.

Низкая эффективность противомикробных средств часто связана с недостаточным проникновением их в инфицированные клетки [Silverstein S.C., 1994; Carryn S., 2003].

Как отмечалось выше, НЧ являются потенциальными средствами доставки ЛВ для лечения внутриклеточных инфекций, поскольку захват НЧ клетками имитирует путь поступления в клетку ряда бактерий (рис. 1.13) [Couvreur P., 1991]. Также известно, что мишенью для НЧ при внутривенном введении являются макрофаги печени и селезенки. Эти же клетки часто являются нишей для выживания внутриклеточных патогенов.

Высокая эффективность наносомальных форм антибиотиков была показана еще в конце 80-х годов. По данным Э. Фатталя активность ампициллина, связанного с ПАЦА НЧ, в 120 раз превысила активность свободного ампициллина при лечении *Salmonella tiphimurium* [Fattal E., 1989]. Эта форма ампициллина была также более эффективна при лечении мышей с сальмонеллезом, чем липосомальный антибиотик. При лечении бестимусных мышей, инфицированных *Listeria monocytogenes*, активность ампициллина, ассоциированного с ПАЦА НЧ, в 20 раз превысила активность свободного антибиотика [Youssef M., 1988].

Высокую эффективность препаратов на основе НЧ при химиотерапии внутриклеточных инфекций связывают с направленной доставкой антибиотика в инфицированные клетки и ткани. Так

установлено, что инфицированные макрофаги более интенсивно связывают НЧ, чем неинфицированные. Макрофаги, инфицированные *Salmonella typhimurium*, накапливали в 1,5 раза больше ампициллина, ассоциированного с НЧ, чем неинфицированные [Balland O., 1996; Couvreur P., 1992]. При изучении локализации НЧ в макрофагах методом электронной микроскопии была показана принципиальная возможность эффективного воздействия антибиотиков в составе НЧ на бактерии, находящиеся внутри клеток [Pinto-Alphandary H., 2000].

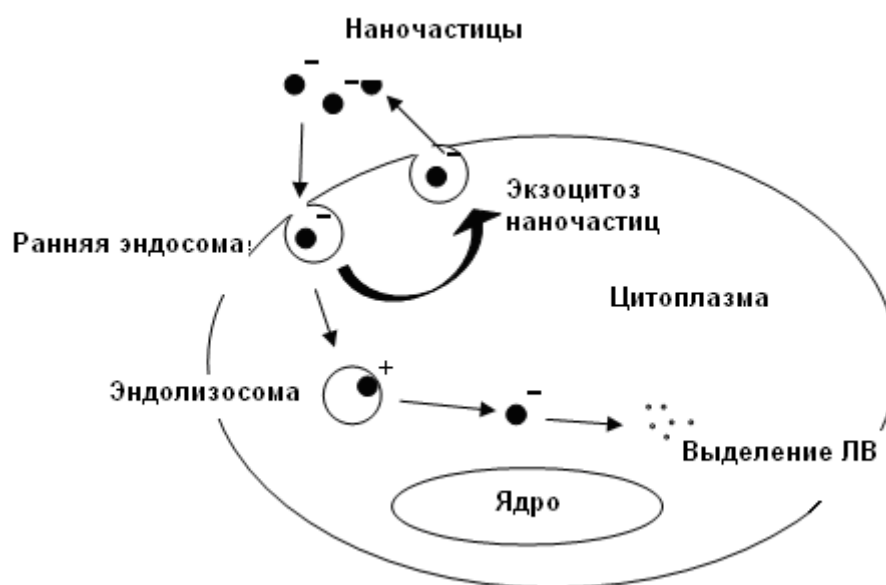


Рис. 1.13. Внутриклеточный транспорт наночастиц с включенным антибиотиком [Гельперина С.Э., 2010].

Включение ципрофлоксацина в ПАЦА НЧ позволило повысить активность этого антибиотика в отношении *Mycobacterium avium*, локализованных в макрофагах. Нифуртимокс, ассоциированный с НЧ из полиэтилцианоакрилата, обладал высокой активностью в отношении *Trypanosome cruzi* [Gonzalez-Martin G., 1998]. Интересно, что «пустые» НЧ также проявили активность в отношении этого паразита. Механизм антипаразитарной активности «пустых» НЧ окончательно не выяснен, однако предполагают, что эффект связан с увеличением продукции свободных радикалов и перекисей макрофагами в результате фагоцитоза частиц.

Действие наносомальных антибиотиков при пероральном введении изучено мало, однако показана высокая активность наночастиц из ПЛГА, содержащих рифампицин, изониазид и пиразинамид в отношении *M. tuberculosis* у мышей [Pandey R., 2003].

1.6. Токсикологические аспекты применения наносомальных форм.

Как отмечалось выше, введение ЛВ в организм в составе наночастиц прежде всего влияет на профиль его биораспределения. Очевидно, что изменяя биораспределение ЛВ, наночастицы могут влиять и на проявление его токсичности и выраженность побочных эффектов.

Действительно, на примере доксорубина хорошо видно, что при совпадении уровня острой токсичности наносомальной и стандартной форм, профили их токсичности могут значительно расширяться [Gelperina S.E., 2002; Pereverzeva E., 2008]. Известно, что доксорубин проявляет кардиотоксичность, выраженность которой зависит от его пиковой концентрации в тканях сердца. Изучение фармакокинетики ПБЦА наночастиц с доксорубином показало, что концентрация антибиотика в плазме повышается, в то время как в сердце он практически не поступает [Gulyaev A.E., 1999]. В связи с этим снижается и кардиотоксичность наносомальной формы. Интересно, что применение наносомальных форм позволяет также значительно снизить тестикулярную токсичность доксорубина. Таким образом, применение наночастиц позволяет существенно повысить безопасность доксорубина.

В последние годы в связи с увеличением воздействия на человека стрессорных ситуаций резко возросло потребление анксиолитических средств, среди которых наибольшее распространение получили препараты бензодиазепиновой структуры, в том числе отечественный препарат феназепам, который применяется в лечебной практике уже более 25 лет [Воронина Т.А., 1982; Середенин С.Б., 2007]. Однако, наличие побочных

эффектов, которые выражаются в ухудшении моторных (седативное и миорелаксантное действие) и мнестических функций, риске возникновения лекарственной зависимости и синдрома отмены, значительно ограничивает использование феназепама в клинической и, особенно, амбулаторной практике. Уменьшить или устранить побочные эффекты феназепама, при сохранности основного анксиолитического эффекта, представляется возможным при изменении его доставки в организм с использованием полимерных наночастиц.

1.7. Заключение.

Приведенные выше данные позволяют заключить, что наночастицы являются эффективным средством оптимизации биораспределения лекарственных веществ. Это направление открывает новые интересные возможности для неинвазивной доставки в мозг препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, а также химиотерапии различных злокачественных опухолей и внутриклеточных инфекций.

Ясно, что в соответствии с современными представлениями, идеальный носитель должен обладать биомиметическими свойствами, чтобы избежать узнавания иммунной системой. Другим важным фактором при выборе носителя для парентеральных форм является способность к биodeградации, определяющая возможность его выведения. Очевидно также, что носитель должен обладать значительной емкостью и обеспечивать контролируемое выделение активного ингредиента.

Глава 2. Материалы и методы исследования.

Разработка технологии получения, стандартизация и наработка образцов наносомальных форм проводилась в обществе с ограниченной ответственностью «Технология лекарств» (ООО «Технология лекарств»).

2.1. Препараты и вещества, используемые для получения наносомальных форм.

Для получения наночастиц использовали - полилактиды марки Lactel® (Absorbable Polymers, DURECT Corporation, USA): PLA $\eta = 0,34$ dl/g;

PLA $\eta = 0,68$ dl/g; PLGA-COOH 50:50 (с карбоксильными концевыми группами), $\eta = 0,15 - 0,25$ dl/g; PLGA 50:50, $\eta = 0,37$ 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), 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-3Н-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).

2.2. Оборудование, используемое для получения, визуализации и определения физико-химических характеристик 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-Turrah T18 basic (IKA, Германия), гомогенизатор Emulsiflex C-5 (Avestin, Канада), роторный испаритель Rotavapor R-210 (BUCHI, Швейцария), лиофильная сушка Alpha 2-4 LSC (Christ, Германия), хроматографы Shimadzu (Япония), «Спектра-Физикс» (США).

Визуализацию полимерных НЧ проводили совместно с сотрудниками Российского научного центра «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). Образцы для АСМ готовили путем получения суспензии наночастиц в воде с концентрацией 2 мг/мл, затем наносили 0,2 мл приготовленной суспензии на свежий скол слюды площадью 0,5*0,5 см и высушивали при температуре 25 С в сушильном шкафу. Измерения осуществляли в полуконтактном режиме. Образцы для растровой электронной микроскопии готовили аналогичным образом. Для проведения просвечивающей электронной микроскопии каплю суспензии НЧ с концентрацией 2мг/мл наносили на медную сеточку с напыленной углеродной мембраной. Измерения проводили в полуконтактном режиме. Сканирование проводили без напыления при низком значении ускоряющего напряжения электронов (1-5 кВ). Размеры, поверхностные зарядов и полидисперсность НЧ определяли методом

динамического светорассеяния на приборе (Nanosizer NanoZS, Malvern Instruments).

2.3. Методы получения наночастиц-плацебо на основе сополимера молочной и гликолевой кислот и бутилцианоакрилата.

НЧ-плацебо на основе сополимера молочной и гликолевой кислот получали методом гомогенизации под давлением с последующим удалением органического растворителя [Ueda M., 1997]. 250 мг полимера растворяли в 5 мл дихлорметана, прибавляли к 25 мл водного раствора поверхностно-активного вещества (ПВС или ЧСА) и проводили гомогенизацию на гомогенизаторе Ultra-Turrax (2 мин, 23600 об/мин), а затем 5 мин на гомогенизаторе EmulsiFlex C-5 (20000-25000 psi). После чего из полученной эмульсии удаляли дихлорметан с помощью роторного испарителя, фильтровали, добавляли криопротектор (маннит, 1%) и лиофильно высушивали.

НЧ-плацебо на основе полибутилцианоакрилата получали методом анионной полимеризации [Couvreur P., 1979]. В 1%-ный (в/о) раствор декстрана в 0.001N HCl при интенсивном перемешивании прибавляли 1% о/о бутилцианоакрилата. Перемешивание продолжали 1 ч, затем проводили нейтрализацию реакционной смеси 0,1N NaOH до pH 5,6, после чего фильтровали через стеклянный пористый фильтр с размером пор 10 мкм для удаления агломератов, образовавшихся в процессе полимеризации. К полученной суспензии добавляли криопротектор маннит (3% в/о) и лиофилизировали.

2.4. Получение наночастиц с красителями DiI и родамином 123.

Навеску полимера Resomer 502 Н 500 мг и красителя DiI 6,4 мг растворили в 10,0 мл хлористого метилена. Соотношение полимер : краситель = 78 : 1 (в/в). Далее полученный раствор добавили к 50 мл 1% раствора ПВС 30-70 кДа и гомогенизировали на диспергаторе UltraTurrax

T18 Basic (23600 об/мин; 5 мин), а затем на гомогенизаторе высокого давления EmulsiFlex C5 (10-15000 psi; 5 мин). Остаточный органический растворитель отгоняли на роторе, далее профильтровали через стеклянный фильтр Пор 1, измерили объем полученной суспензии, порцию 8,0 мл сразу отобрали для очистки от свободного красителя, а оставшееся количество лиофилизировали с добавлением 1% маннита. Свободный краситель удаляли гель-проникающей хроматографией на Sephadex G-25, крупную фракцию НЧ (≈ 5 мкм) отделяли центрифугированием при 1000g, 25°C, 5 мин (Beckman). Супернатант отбирали, добавляли 1% маннита, замораживали при -70°C и лиофильно высушивали.

Навеску полимера ПЛГА (50:50, $\eta = 0.37$) 300 мг и красителя DiI 3,0 мг растворили в 6,0 мл хлористого метилена. Соотношение полимер : краситель 100 : 1 (w/w). Далее полученный раствор добавили к 30 мл 0,5% раствора ПАВ (ПВС 9-10 кДа + Mowiol 3-96 в соотношении 1:3, в/в) и гомогенизировали на диспергаторе UltraTurrax T18 Basic (23600 об/мин; 3 мин), а затем на гомогенизаторе высокого давления Panda (1000 Bar; 5 мин). Остаточный органический растворитель отгоняли на роторе, далее профильтровали через стеклянный пористый фильтр Пор 1, измерили объем полученной суспензии. Свободный краситель удаляли центрифугированием (Beckman 16000g, 15 мин, 18°C), осадок НЧ ресуспендировали в исходном количестве воды с помощью УЗ (Bandelin), крупную фракцию НЧ (≈ 5 мкм) удалили центрифугированием при 1000g, 25°C, 5 мин. Супернатант отобрали, добавили 1% маннита, заморозили при -70°C и лиофильно высушили.

Навеску полимера Resomer 502 Н 300 мг растворяли в 3,6 мл хлористого метилена, а навеску красителя Rhodamine 123 6,0 мг - в 2,4 мл воды. Соотношение полимер : краситель 50 : 1 (w/w). Далее полученные растворы смешивали, и эмульсию измельчали на диспергаторе UltraTurrax T18 Basic (23600 об/мин; 5 мин), затем выливали в 30 мл 1% раствора ПВС 9-10 кДа и гомогенизировали на диспергаторе UltraTurrax

T18 Basic (23600 об/мин; 10 мин), а затем на гомогенизаторе высокого давления Panda (1000 Bar; 5 мин). Остаточный органический растворитель отгоняли на роторе, далее фильтровали через стеклянный фильтр Пор 1, измеряли объем полученной суспензии, порцию 8,0 мл сразу отбирали для очистки от свободного красителя, а оставшееся количество лиофилизировали с добавлением 2,5% маннита. Свободный краситель удаляли гель-проникающей хроматографией на Sephadex G-25, добавляли 1% маннита, замораживали при -70°C и лиофильно высушивали.

Для фармакологических исследований были получены ПЛГА НЧ с красителем DiI размером $250,1 \pm 3,00$ нм с процентом включения DiI -94 % и размером $144,6 \pm 0,38$ нм с включения DiI -80 %.

Навеску 200 мг Декстрана-70 растворили в 20 мл 0,01 н HCl, раствор делили на 2 стакана по 10,0 мл. К содержимому каждого из стаканов при перемешивании (400 об/мин) добавили по 100 мкл (100 мг) н-бутилцианоакрилата (БЦА), а через 20-30 мин добавили по 125 мкл (95 мкг) раствора Rhodamine 123 в воде ($c = 0,76$ мг/мл) и перемешивали еще в течение 2,5 ч. Далее доводили pH суспензии до 5,5 с помощью NaOH и оставляли перемешиваться еще 30 минут, фильтровали через стеклянный фильтр Пор 1. На стадии фильтрации оба стакана объединили, добавили 2,5 % маннита, заморозили при -70°C и лиофильно высушили. Свободный краситель удаляли гель-проникающей хроматографией на Sephadex G-25, добавляли 2,5% маннита, замораживали при -70°C и лиофильно высушивали.

2.5. Метод получения наносомальной формы ФРН на основе полибутилцианоакрилата.

Сорбцию ФРН на поверхности ПБЦА НЧ осуществляли следующим образом: 90 мг лиофильно высушенных НЧ диспергировали в 0,8 мл изотонического раствора натрия хлорида. 45 мкг лиофилизированной субстанции ФРН растворяли в 1 мл изотонического раствора натрия

хлорида. Затем раствор ФРН объединяли с суспензией НЧ и инкубировали при температуре (4°C) в течение 3 ч. Для модификации поверхности НЧ ПС 80 к суспензии ПБЦА НЧ с сорбированным ФРН прибавляли 1% раствор ПС 80 и выдерживали 30 мин при той же температуре. Таким образом получали 1.8 мл 1% суспензии ПБЦА НЧ, модифицированных ПС 80, и содержащих 45 мкг ФРН (5 мкг ФРН в 0.2 мл суспензии).

Для определения степени сорбции методом ультрацентрифугирования (центрифуга BECKMAN MODEL L5, USA). сепарировали свободный ФРН от связанного с наночастицами. Количественное содержание ФРН проводили в образцах, покрытых и не покрытых ПС 80. Для этого к 0,2 мл 1% суспензии ПБЦА-НЧ, покрытых и не покрытых ПС-80, содержащих 5 мкг ФРН, прибавляли по 4 мл дистиллированной воды. Базовая концентрация ФРН составляла 1200 пкг/мл. Разбавленные суспензии НЧ помещали в ультрацентрифужные пробирки и центрифугировали в течение 30 минут при 80000 g. Методом иммуноферментного анализа 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.

Степень сорбции ФРН определяли по формуле:

$$\text{Степень сорбции \%} = \frac{C_{\text{исход}} - C_{\text{своб}}}{C_{\text{исход}}} * 100\%$$

где, C исход. – исходная концентрация ФРН в суспензии, C своб. – концентрация ФРН в супернатанте.

2.6. Метод получения наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПЛГА и ПБЦА наночастиц.

Сорбцию нсРЭЧ проводили на предварительно полученных лиофильно высушенных наночастицах-плацебо по следующей методике: к 10 мг диспергированных в изотоническом растворе НЧ прибавляли 1 мл

раствора нсРЭЧ в концентрации 0,60 мг/мл и перемешивали 1 ч на магнитной мешалке при 250 об/мин. Поверхность НЧ перед введением модифицировали 1% раствором Р 188 (для ПЛГА НЧ) или 1% раствором ПС 80 (для ПБЦА НЧ). В отдельных экспериментах частицы предварительно отмывали от избытка ПАВ. Определение концентрации нсРЭЧ проводили спектрофотометрическим методом при $\lambda_{\max} = 280$ нм по предварительно построенному градуировочному графику (рис. 2.1):

$$A = 0,8432 \times C,$$

где: A – светопоглощение анализируемого раствора, C – концентрация нсРЭЧ в (мг/мл) в интервале концентраций от 0 до 0,9 мг/мл)

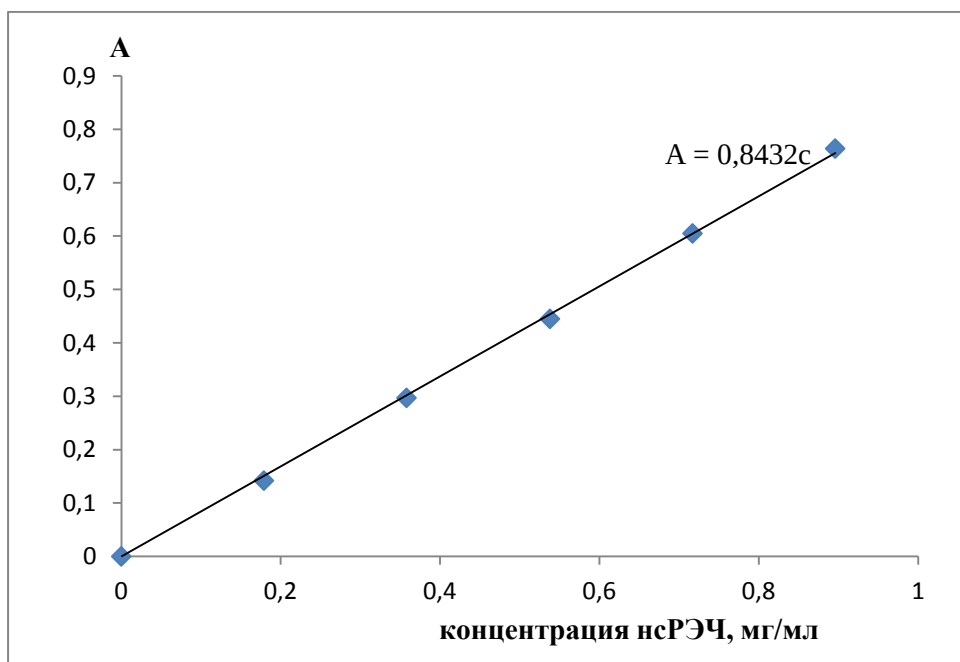


Рисунок 2.1. Градуировочный график зависимости поглощения от концентрации для нсРЭЧ ($\lambda_{\max} = 280$ нм).

С целью отмывания от ПАВ лиофилизированный образец НЧ растворяли в 1 мл дистиллированной воды и ресуспендировали. Полученную суспензию перемешивали на встряхивателе Vortex в течение 1 мин, после чего содержимое флакона переносили в центрифужную пробирку Beckman и отделяли НЧ центрифугированием на центрифуге Avanti J-30 при температуре 4-8 °С в течение 30 мин при 48384 g (20000

об/мин). Затем супернатант удаляли, а осадок НЧ использовали для сорбции нсРЭЧ.

Для определения сорбции нсРЭЧ к промытому осадку прибавляли 1 мл дистиллированной воды (холостой опыт) или 1 мл раствора нсРЭЧ (исходная концентрация $C_{исх} = 0,896$ мг/мл), затем осадок ресуспендировали и переносили суспензию в пенициллиновый флакон, потом перемешивали на магнитной мешалке при 250 об/мин. Время инкубации составляло 1 или 2 часа.

Для определения степени связывания (сорбции) нсРЭЧ наночастицами суспензию НЧ, отмытых от ПАВ и проинкубированных с нсРЭЧ, количественно переносили в центрифужную пробирку и отделяли НЧ центрифугированием от свободного нсРЭЧ на центрифуге Avanti J-30 I, в течение 30 мин при скорости 20000 об/мин (48384 g) и температуре 4-8 °С. В супернатанте спектрофотометрически определяли концентрацию нсРЭЧ ($C_{св}$) по градуировочному графику ($\lambda_{max} = 280$ нм, $A = 0,8432 \times C_{св}$); все измерения проводили относительно супернатанта НЧ-плацебо, ресуспендированных в воде без добавления нсРЭЧ (холостой опыт, см. выше).

Степень сорбции нсРЭЧ (%) рассчитывали по формуле:

$$\% = (C_{исх} - C_{св} / C_{исх}) \times 100\%$$

С целью изучения десорбции нсРЭЧ с НЧ в различных средах отмывали НЧ от ПАВ и проводили последующую сорбцию нсРЭЧ по выше описанной методике. После отделения супернатанта к осадку, содержащему сорбированный нсРЭЧ, прибавляли 1 мл воды, либо фосфатный буфер (PBS, pH7,4), либо 1%-ный раствор полоксамера 188 (F-68) в воде или в PBS. Затем осадок ресуспендировали, переносили суспензию в пенициллиновый флакон и перемешивали при комнатной температуре на магнитной мешалке (250 об/мин). Время инкубации составляло 1 час. После этого суспензию количественно переносили в центрифужную пробирку и центрифугировали на центрифуге Avanti J-30 I

в течение 30 мин при 48384 г (20000 об/мин) при температуре 4-8 °С. Концентрацию десорбированного нсРЭЧ определяли в супернатанте по градуировочному графику. Измерения проводили при 280 нм относительно супернатанта НЧ-плацебо, ресуспендированных в воде без добавления нсРЭЧ (холостой опыт, см. выше). Содержание десорбированного нсРЭЧ (%) рассчитывали по формуле:

$$\% \text{ нсРЭЧ}_{\text{десорб}} = (C_1 : C_2) \times 100\%, \text{ где:}$$

C_1 - концентрация свободного нсРЭЧ (в супернатанте) мг/мл,

C_2 —концентрация нсРЭЧ, связанного с НЧ (осадок), мг/мл

Для изучения агрегационной устойчивости к суспензии НЧ добавляли 1 мл дистиллированной воды, ресуспендировали и определяли размеры НЧ при температуре 4 °С и 20°С. Опыты проводились как с перемешиванием, так и без перемешивания образца.

Для определения агрегационной устойчивости при 20°С в две кюветы для измерения размеров НЧ помещали по 1 мл воды и 20 мкл суспензии (разбавление в 50 раз). Измерение размеров частиц в первой кювете проводили через 0, 1, 2, 3 и 4 часа без перемешивания, тогда как во второй кювете раствор тщательно перемешивался перед проведением каждого измерения.

Для определения агрегационной устойчивости при 4 °С суспензию ресуспендированных НЧ хранили в холодильнике при 4 °С и измеряли при 50-кратном разбавлении размеры частиц через 0, 1, 2, 3 и 4 часа.

2.7. Метод получения наносомальной формы феназепама на основе полибутилцианоакрилата.

НЧ получали методом кислотной полимеризации в среде, содержащей в качестве стабилизатора декстран (мм 70 кДа) в 0,1М растворе соляной кислоты. Субстанцию феназепама (76,7 мг) растворяли в хлористом метилене (2,27 г), к полученному раствору добавляли 180 мкл бутилцианоакрилата. Затем для полного растворения бутилцианоакрилата

осуществляли перемешивание с использованием перемешивателя Vortex и ультразвуковой бани. После чего количественно переносили полученный раствор в водную фазу, содержащую 20,65 мл воды, 36,8 мг безводной лимонной кислоты и 2,35 г полоксамера 188, а затем подвергали ультразвуковой гомогенизации на гомогенизаторе (Ultra-Turrax T18 basic) в течение 1 минуты. Суспензию перемешивали на магнитной мешалке (Labtex Daihan, Корея) в течении 3 часов для удаления органического растворителя, после чего фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» и лиофилизовали (лиофильная сушка Alpha 2-4 LSC Christ, Германия). В качестве криопротектора использовали маннит. Размер частиц определяли на приборе Nanosizer NanoZS. Содержание феназепама в НЧ определяли спектрофотометрически (спектрофотометр Helios Zeta UV-VIS) в диапазоне 290 – 360 нм. В качестве раствора сравнения использовали диметилсульфоксид.

Перед введением животным лиофильно высушенные НЧ ресуспендировали в 0,9 % растворе натрия хлорида, а затем инкубировали в течение часа с 1% раствором ПС 80.

2.8. Метод получения наносомальной формы паклитаксела на основе сополимера молочной и гликолевой кислот.

НЧ с паклитакселом получали методом гомогенизации по следующей методике: растворяли 1,0 – 10 мг паклитаксела, 100 мг Resomer 502 Н в 2 г метиленхлорида. Полученный раствор смешивали с 20 мл 1% водного раствора 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» (размер пор 3 мкм), объем доводили до 20 мл дистиллированной водой и лиофилизовали.

НЧ с паклитакселом получали методом замены растворителя по следующей методике: растворяли 1,0 – 10 мг паклитаксела, 100 мг Resomer 502 в 5 мл ацетона. Полученный раствор смешивали с 10 мл 1% водного раствора ПВС; образовавшуюся суспензию перемешивали при помощи магнитной мешалки в течение 2 – 3 часов при температуре 50-60°C для удаления органического растворителя, после чего добавляли 3% раствор маннита. Затем суспензию фильтровали через бумажный фильтр «белая лента» (размер пор 3 мкм) и лиофилизовали (Alpha Christ 2-4).

Флуоресцентные НЧ для проведения микроскопических исследований получали аналогичным способом. В состав наночастиц вводили 0,05 % раствора кумарина-6 в качестве флуоресцентного маркера.

Процент включения паклитаксела в НЧ определяли методом ВЭЖХ на жидкостном хроматографе SP 8000 после обработки образцов метанолом для растворения паклитаксела и разрушения НЧ. Выход паклитаксела (в процентах) определяли как отношение паклитаксела, найденного в образце, к введенному в синтез.

$$\text{ПТХ \%} = (\text{Выход ПТХ} / \text{Введенный ПТХ}) * 100\%$$

2.9. 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 массой 20-25 г, полученных из Центрального питомника лабораторных животных «Столбовая» Московской области.

В работе использовали 260 беспородных мышей, 230 мышей линии C57/Bl6, 300 беспородных крыс и 40 крыс линии Sprague-Dowly. Животных содержали на постоянном доступе к корму и воде. Содержание и уход за животными, проведение экспериментов и эвтаназия осуществляли в соответствии с требованиями Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609 ЕЕС).

Исследования проводили в соответствии с «Руководством по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», (ред. – Р.У. Хабриев, 2005, А.Н. Миронов, 2012), где дано подробное описание используемых в работе методов.

Экспериментальные исследования были рассмотрены и одобрены для проведения биоэтической комиссией ФГБУ «НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова» РАМН (протокол № 12/2011 от 23.06.2011).

2.10. Исследование наносомальной формы ФРН.

Методика определения концентрации ФРН в тканях мозга мышей линии C57Bl/6.

Определение концентрации ФРН проводили в гомогенатах-лизатах ткани головного мозга мышей линии C57Bl/6 проводили через 15, 45, 90 минут и 24 часа после внутривенного введения тестируемых форм. Для этого извлекали 50 мкг ткани мозга, помещали в пробирки Эппендорф и заливали 500 мкл буфера следующего состава: сбалансированный солевой раствор Дульбекко/Трис pH 7,4 1:1, 0,02% Тритон X-100. Затем ткань подвергали ультразвуковой гомогенизации, полученный гомогенат центрифугировали в течение 10 мин при 14000 g. Для количественного определения ФРН использовали надосадочную жидкость. Содержание ФРН определяли методом ИФА по стандартному протоколу с помощью набора реактивов для ИФА «Nerve Growth Factor Sandwich ELISA kit» (ChemiKine, США). Для количественного определения использовали колориметрический тест - измерение оптической плотности цветного продукта реакции пероксидазы, конъюгированной с поликлональными антителами к фактору роста нервов, с перекисью водорода и тетраметилбензидином. Оптическую плотность определяли на ридер-спектрофотометре «Stat-Fax 2100» при использовании фильтров 450 нм (в качестве основного) и 570 нм (в качестве корректирующего).

Концентрации ФРН рассчитывались автоматически на основе сравнений со стандартной кривой.

Исследуемые группы: по 6 мышей в каждой, которым внутривенно вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9% раствор натрия хлорида (0,2 мл); группа 2 - 1% суспензия ПБЦА-НЧ (0,2 мл); группа 3 - раствор ФРН (0,25 мг/кг); группа 4 - ФРН (0,25 мг/кг) в 1% растворе ПС 80; группа 5 - ФРН (0,25 мг/кг), сорбированный на ПБЦА НЧ; группа 6 - ФРН (0,25 мг/кг), сорбированный на ПБЦА НЧ, модифицированных 1 % ПС 80.

Методика изучения антиамнестического действия ФРН в условиях острой амнезии УРПИ, индуцированной скополамином у крыс.

Исследования выполнялись по методике, описанной [Petkov V., 1988]. Для формирования краткосрочной (острой) амнезии крысам подкожно вводили скополамин в дозе 1,5 мг/кг за 30 минут до обучения УРПИ, непосредственно перед введением изучаемых лекарственных форм. Изучение сохранности навыка пассивного избегания проводили через 24 часа после обучения, измеряя латентного период входа крыс в темную камеру.

Изучаемые группы: по 10 крыс в группе, которым вводили следующие тестируемые вещества: группа 1 (пассивный контроль) – 0.9% раствор натрия хлорида (0,2 мл, внутривенно); группа 2 (активный контроль) – скополамин (1,5 мг/кг, подкожно); группа 3 – скополамин (1,5 мг/кг, подкожно) и сразу субстанцию ФРН в водном растворе (0,25 мг/кг, внутривенно); группа 4 – скополамин (1,5 мг/кг, подкожно) и сразу ФРН в 1% растворе ПС 80 (0,25 мг/кг, внутривенно); группа 5 - скополамин (1,5 мг/кг, подкожно) и сразу ФРН (0,25 мг/кг, внутривенно), сорбированный на ПБЦА НЧ; группа 6 - скополамин (1,5 мг/кг, подкожно) и сразу ФРН (0,25 мг/кг, внутривенно) на ПБЦА НЧ, модифицированных ПС 80.

УРПИ вырабатывали на установке «Lafayette instrument USP», состоящей из двух соединенных между собой ярко освещенной и затемненной камер. Камеры разделяет дверца, через которую животное может свободно перемещаться из освещенной камеры в затемненную. В затемненной камере пол представляет собой металлическую сетку по которой пропускаются импульсы электрического тока. Выработку УРПИ проводили в одном сочетании. Крысу помещали в освещенную камеру хвостом к дверце и регистрировали латентный период входа (в секундах) в затемненную камеру. После захода в темный отсек (норковый рефлекс), дверь блокировали и животное получало 5 кожно-болевых стимулов (5 ударов электрическим током с силой 1 мА и с интервалом в две секунды между стимулами). Воспроизведение рефлекса осуществляли через 24 часа, регистрируя латентный период входа в темный отсек. Время наблюдения за животными в освещенной камере составляло 180 секунд. Животное, не вошедшее в затемненную камеру в течение указанного промежутка времени, считали обученным УРПИ.

Методика изучения противопаркинсонического действия ФРН на модели МФТП-вызванного паркинсонизма у мышей линии C57Bl/6.

Паркинсонический синдром моделировали внутрибрюшинным введением нейротоксина 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) в дозе 30 мг/кг. Оценку основных экстрапирамидных нарушений проводили сразу после введения, а затем через 90 мин, 24 часа и на 7 и 21 дни после введения МФТП и ФРН в тестируемых формах согласно методике, описанной ниже [Воронина Т.А., 2005].

Изучаемые группы: по 10 мышей в группе, которым вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 (пассивный контроль) – 0.9% раствор натрия хлорида (0,2 мл, внутривенно); группа 2 (активный контроль) – МФТП (30 мг/кг, внутрибрюшинно); группа 3 – МФТП (30 мг/кг, внутрибрюшинно) и через 30 мин раствор ПБЦА НЧ (9

мг/мышь, внутривенно); группа 4–МФТП (30 мг/кг, внутривенно) и через 30 мин водный раствор субстанции ФРН (0,25 мг/кг, внутривенно); группа 5 – МФТП (30 мг/кг, внутривенно) и через 30 мин раствор субстанции ФРН в 1% растворе ПС 80 (0,25 мг/кг, внутривенно); группа 6 - МФТП (30 мг/кг, внутривенно) и через 30 мин раствор ФРН (0,25 мг/кг, внутривенно), сорбированный на ПБЦА НЧ; группа 7 - МФТП (30 мг/кг, внутривенно) и через 30 мин ФРН (0,25 мг/кг, внутривенно), сорбированный на ПБЦА-НЧ, модифицированных 1 % раствором ПС 80.

Регистрацию и оценку основных экстрапирамидных нарушений начинали сразу после введения МФТП и продолжали в течение 2-3 часов. Противопаркинсоническое действие тестируемых форм оценивали по их способности уменьшать тремор, ригидность и гипокинезию, вызываемых введением МФТП. Также регистрировали наличие и выраженность слюнотечения, ретропульсии, пилоэрекции и нарушение дыхания.

Для оценки ригидности животному окрашивали лапки красителем, затем помещали в пенал с маркировочной лентой. Измеряли расстояние между следами от передних и задних лапок, оставшимися на ленте.

Олигокинезию оценивали в актометре и тесте «открытое поле». Выраженность олигокинезии оценивали по изменению двигательной активности животных в актометре Ugo Basile (Италия). Регистрацию двигательной активности проводили сразу после введения МФТП, а также через 90 мин, 24 часа и на 7 и 21 дни после введения тестируемых форм. Двигательную активность оценивали в течение 10 мин.

Для определения олигокинезии в тесте «открытое поле» животное помещали в центр арены и фиксировали число горизонтальных и вертикальных перемещений сразу после введения МФТП, а также через 90 мин, 24 часа и на 7 и 21 дни после введения тестируемых форм. Время наблюдения за животными составляло 2 мин.

Тремор оценивали в баллах: 0 - отсутствие, 1 - локальный мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 -

локальный среднеамплитудный тремор, 3 - генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела. Также оценивали % животных с тремором в группе.

Показатели ретропульсии (латеропульсии) регистрировали по % животных с наличием данного признака в группе. Для оценки каталепсии передние и задние конечности животного помещали на параллельные перекладины (стенки) таким образом, чтобы спина животного была прямой. Оценивали % животных с каталепсией в группе. Пребывание животного в неподвижном состоянии на перекладинах в течение 45 с считали в качестве критерия наличия каталептического состояния.

2.11. Исследование наносомальных форм нсРЭЧ.

Методика определения концентрации нсРЭЧ в тканях мозга нелинейных белых мышей.

Количественное содержание РЭЧ проводили в гомогенатах-лизатах ткани головного мозга нелинейных белых мышей. Забор образцов осуществлялся на 45 минуте после введения исследуемых веществ. Образцы замораживали при температуре -70°C . Разморозку образцов проводили на водяной бане при 35°C , затем ткань помещали в холодный свежеприготовленный (4°C) экстракционный лизирующий буфер в соотношении 300 мкл буфера на 100 мг веса ткани и гомогенизировали с помощью гомогенизатора стекло-тефлон. После инкубации 15 мин при 40°C гомогенаты центрифугировали при 16000 g при $+40^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Затем микропипеткой отбирали супернатант для последующего определения концентрации нсРЭЧ. Хранение осуществляли при -70°C . Определяли концентрацию нсРЭЧ методом иммуноферментного анализа (набор для определения концентрации нсРЭЧ методом иммуноферментного анализа - K040 ProCon EPO₂, ООО «Протеиновый контур»). Анализ осуществлялся по стандартному протоколу.

Учет результатов проводили с использованием автоматического фотометра для микропланшетов при длине волны 450 нм, устанавливая нулевое поглощение по лунке с буфером С (проба О)

Исследуемые группы: по 6 мышей, которым внутривенно вводили следующие вещества:

Группа 1 - 0.9% раствор натрия хлорида;

Группа 2 - 1% суспензия ПБЦА-НЧ;

Группа 3 - раствор нсРЭЧ (0.05 мг/кг);

Группа 4 - раствор нсРЭЧ (0.05 мг/кг) с 1% раствором ПС-80;

Группа 5 - нсРЭЧ (0.05 мг/кг), сорбированный на ПБЦА-НЧ, покрытых ПС-80.

Методика изучения нейропротекторных свойств на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ) у крыс.

Моделирование локального кровоизлияния в головном мозге проводилось согласно методике [Макаренко А.Н., 2002] Для этого нелинейным самцам крыс массой 200-250 г, наркотизированным хлоралгидратом (300 мг/кг, в/в) при помощи мандрен-ножа и стереотаксиса осуществляли деструкцию мозговой ткани в области внутренней капсулы с последующим (через 2-3 минуты) введением в место повреждения крови, взятой из-под языка животного (0,02-0,03 мл). Морфологические исследования показали, что таким способом достигается локальный аутогеморрагический билатеральный инсульт в области внутренней капсулы (диаметр - 2 мм, глубина - 3 мм) без существенных повреждений выше расположенных образований мозга и неокортекса. Ложнооперированным животным проводили скальпирование и трепанацию черепа. нсРЭЧ вводили через 3-3,5 часа после операции и пробуждения животных от наркоза и на 2 и 3 сутки. Динамику развития интрацеребральной геморрагической травмы исследовали в течение 14 дней, наблюдая поведение животных в 1-е, 3-е, 7-е и 14 сутки после

операции. Для оценки нарушения поведения и состояния животных использовался комплекс методов: обучение и память крыс исследовали на модели условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ, Passive avoidance фирмы Lafayette Instrument Co США). Для оценки уровня тревожности был использован приподнятый крестообразный лабиринт (ПКЛ, модифицированная модель Pellow и соавт., 1985). Неврологический статус животных определяли с использованием шкалы Stroke-index Mc Grow для монгольских песчанок в модификации И.В. Ганнушкиной [Ганнушкиной И.В., 1996]. Для анализа нарушения координации движений был использован тест вращающегося стержня.

Исследуемые группы: по 6 крыс, которым внутривенно вводили следующие вещества:

Группа 1 – ложнооперированные – 0.9% раствор натрия хлорида;

Группа 2 – животные с ИПГ + 0.9% раствор натрия хлорида;

Группа 3 – животные с ИПГ + раствор нсРЭЧ (0,25 мг/кг);

Группа 4 – животные с ИПГ + нсРЭЧ (0,25 мг/кг), сорбированный на ПБЦА-НЧ, покрытых ПС-80.

Для оценки неврологического дефицита у крыс использовали бальную шкалу. Отмечали количество животных с легкой симптоматикой до 2,5 баллов по шкале Stroke-index (вялость движений, слабость конечностей, односторонний полуптоз, тремор, манежные движения) и тяжелыми проявлениями неврологических нарушений (от 3 до 10 баллов) – парезы конечностей, паралич нижних конечностей, боковое положение.

Приподнятый крестообразный лабиринт. Лабиринт представляет собой перекрещенные полосы размером 50x10 см. два противоположных отсека имеют вертикальные стенки высотой 40 см. Лабиринт приподнят от пола на 50 см. В месте перекрестка плоскостей находится центральная платформа 10x10 см. Крыс помещали на центральную площадку хвостом к открытому рукаву. Регистрировалось время, проведенное животными в открытых рукавах, число заходов в открытые и закрытые рукава. Общее

время наблюдения для каждого животного составляло 5 мин. Для оценки анксиолитического действия использовали показатель времени, проведенного в открытых рукавах установки. Число пересечений центральной платформы (общее число заходов в темный и светлый рукава лабиринта) использовали для оценки влияния тестируемых форм на двигательную активность крыс [Pellow S., 1985].

Ориентировочно - исследовательское поведение животных оценивали в условиях методики открытого поля. Установка открытое поле для крыс представляет собой камеру размером 60х60 см. с прозрачной крышкой. Пол камеры разделен равномерно линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 4 см. В процессе 2-х минутного пребывания крысы в открытом поле регистрировали число вставаний на задние лапки (вертикальная двигательная активность), число переходов из квадрата в квадрат (горизонтальная двигательная активность), число заглядываний в отверстия. Суммировались все три показателя ориентировочно – исследовательского поведения в открытом поле за 3 минуты.

Для оценки нарушения координации движений у животных был использован тест вращающегося стержня. На горизонтальный стержень диаметром 4 см, вращающийся со скоростью 3 об./мин., помещали крыс. Неспособность животных удерживать равновесие на стержне в течение 2-х минут рассматривали как проявление нарушения координации движений [Воронина Т.А., 2005].

Для определения миорелаксантных свойств тестируемых форм также использовали тест подтягивания на горизонтальной перекладине. Крысы опытной и контрольной групп (по 6 – 10 животных в группе) должны были подтянуться на проволоке, натянутой на высоте 20 – 30 см от пола. Невыполнение рефлекса крысами опытной группы свидетельствовало о миорелаксантном действии используемых доз исследуемого вещества. Неспособность животных подтянуть задние конечности на проволоке

регистрировали как слабость конечностей, что также являлось проявлением неврологического дефицита.

Выработку условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) осуществляли по методике разработанной Ворониной Т.А. [Ворониной Т.А., 2005]. Для обучения УРПИ животных помещали в установку Passive avoidance фирмы Lafauette Instrument Co (США). Конструктивно установка состоит из маленькой платформы, расположенной на расстоянии 1м. от пола, освещенной специальной лампой и темной камеры с электродным полом. Крыс помещали на освещенную платформу перед входом в темную камеру установки хвостом к входному отверстию и регистрировали латентное время рефлекса. В эксперименте не использовались животные, которые при обучении показывали латентное время рефлекса более минуты. Затем в темной камере крыса получала однократное болевое раздражение электрошоком (0,6 мА), продолжительность раздражения определялась выбеганием животного из темного отсека. Тест на воспроизведение УРПИ осуществляли через 24 часа после обучения и проводили при повторном помещении животных в установку с регистрацией в течение 3 мин. латентного периода первого захода крысы в темную экспериментальную камеру, а также количества животных, не зашедших в темный отсек камеры в %. С целью анализа влияния вещества на угашение рефлекса процедуру воспроизведения навыка проводили через 3, 7 и 14 суток после обучения.

Для изучения динамики веса животных с ИПГ проводили взвешивание животных до эксперимента и на 14-е сутки после операции.

Методика проведения морфометрических исследований.

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, обезвоживали в спиртах восходящей концентрации, просветляли в ксилоле и заключали в бальзам. 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.

Методика определения экспрессии генов нейротрофических факторов NGF и BDNF в коре и гиппокампе крыс.

Первичную культуру клеток нейроглии получали согласно стандартной методике [Cole R.N, 1989]. Крыс линии Sprague-Dowly возраста 1-3 дня забивали с помощью углекислотной асфиксии (15 минут) и помещали на 1 минуту в 80% водный раствор этанола. Затем все операции проводили в асептических условиях при температуре 4-7°C. Мозг помещали в раствор Хэнкса и далее выделяли кору больших полушарий, освобождая ткань от оболочек. Выделенную ткань один раз промывали раствором Хэнкса и переносили в среду MEM/F12 (1:1), содержащую 20% эмбриональной сыворотки коровы и 2 mM L-глутамина. Ткань диссоциировали на отдельные клетки механически. Полученную клеточную суспензию один раз промывали средой того же состава с помощью центрифугирования при 200 g. Клетки засевали плотностью 200 тыс. клеток/см² на обработанные поли-L-лизинном культуральные планшеты площадью 75 см². Культивирование клеток проводили в CO₂-инкубаторе при 37°C в атмосфере, содержащей 5% CO₂ и 95% воздуха в среде MEM/F12, содержащей 15% эмбриональной сыворотки коровы, 6 г/л D-глюкозы, 2 mM L-глутамина, 25 мг/л инсулина, 100 мг/л трансферрина, 20 нМ прогестерона, 100 нМ путресцина и 30 нМ селенита

натрия, 100 мкг/мл гентамицина. Культуральную среду меняли каждые 3-4 дня. Пересев клеток проводили после достижения монослоя в соотношении 1:3 (время достижения монослоя 1.5-2 недели).

Для выделения тотальной РНК из культуры клеток астроцитов использовали полученные после третьего пересева клетки, которые высевали на обработанные поли-L-лизином 6-луночные культуральные планшеты в указанной культуральной среде. После достижения клетками монослоя культуральную среду заменяли на бессывороточную (указанная среда без эмбриональной сыворотки коровы). После 48 ч инкубации в среду вводили стерильные растворы (40 мкл) тестируемых соединений до конечной концентрации 3 нМ (3 параллели на точку). В качестве контроля вводили равный объем 0.9 % раствора NaCl. Через указанные промежутки времени отбирали культуральную среду, клетки промывали холодным фосфатно-солевым буфером и выделяли тотальную РНК фенол-хлороформным методом с использованием набора YellowSolve (Клоноген, Россия) по методике производителя. Чистоту и концентрацию РНК в полученных образцах определяли спектрофотометрически. В дальнейших экспериментах использовали образцы с соотношением $A_{260}/A_{280} > 1.6$.

Подготовка образцов исследуемых отделов мозга in vivo. Через 1 час после введения препарата крыс забивали с помощью углекислотной асфиксии, и сразу после этого выделяли исследуемые отделы мозга (гиппокамп и фронтальная кора мозга). Ткань замораживали на сухом льду и хранили при -80°C .

Выделение тотальной РНК из исследуемых отделов мозга крысы. Разморозку образцов производили на водяной бане при 35°C , затем ткань помещали в холодный свежеприготовленный (4°C) экстракционный лизирующий буфер в соотношении 300 мкл буфера на 100 мг веса ткани и гомогенизировали с помощью гомогенизатора стекло-тефлон. После инкубации 15 мин при 40°C гомогенаты центрифугировали при 16000 g при $+40^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин. Затем микропипеткой отбирали супернатант

для последующей экстракции РНК. Тотальную РНК из образцов выделяли с помощью фенол-хлороформной экстракции с использованием набора ReqGold TriFast (PeqLab, Германия), следуя методике и рекомендациям производителя. Полученную РНК трижды промывали 80% этанолом (4°C), растворяли в 100 мкл воды, свободной от РНКаз и хранили при -80°C. Содержание РНК измеряли спектрофотометрически, и далее использовали образцы, для которых соотношение оптических плотностей при 260 и 280 нм превышало 1.6.

Определение обратной транскрипции с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Обратную транскрипцию проводили с использованием набора фирмы "Силекс" (Россия) по методике производителя. Для проведения обратной транскрипции отбирали 1 мкг тотальной РНК и проводили реакцию 1 час при 37°C в среде, содержащей 8 ед/мл Moloney Murine Leukemia Virus (M-MLV)-обратную транскриптазу, 10 mM дитиотрейтол, 800 мкМ dNTPs, случайные гексапраймеры (20 мкг/мл) и first-strand buffer (50 mM Трис-HCl, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂) в объеме 25 мкл. После последующей инкубации 10 минут при 70°C образцы полученной кДНК хранили при -20°C.

Оценку уровня экспрессии BDNF мРНК проводили с использованием количественной ПЦР в реальном времени (real-time quantitative PCR, система Mx3000P, Stratagene). Применяли высокоспецифичный dsДНК-связывающий краситель SYBR greenI. Реакцию проводили в смеси объемом 25 мкл, содержащей 2 мкл кДНК образца или стандарта, или 2 мкл воды (негативная проба), 250 мкМ смеси дНТФ (дезоксинуклеозидтрифосфаты), 2.5 mM MgCl₂, 15 mM Трис-HCl (pH 8.8), 50 mM KCl, 0,5% глицерола, 0.1% Tween 20, интеркалирующий краситель SYBR Green I, 1 ед Taq ДНК-полимеразу с ингибирующими активностью фермента антителами ("Синтол", Россия) и по 10 пмоль смысловых и антисмысловых праймеров ("Синтол", Россия) при следующих условиях: старт - 5 минут 95°C, затем 40 циклов, включающих

плавление - 30 секунд при 95°C, отжиг – 30 сек при 68°C, элонгация – 30 секунд при 72°C с детекцией флуоресценции в конце каждого шага элонгации.

Для подтверждения специфичности продуктов амплификации после окончания амплификации образцы охлаждали до 60°C и через 20 минут получали кривые плавления нагреванием до 95°C со скоростью 0.03°C/сек. с непрерывной детекцией флуоресценции. Для получения калибровочных кривых смесь кДНК образцов последовательно разбавляли водой, свободной от ДНКаз, получали стандартные растворы с известной относительной концентрацией соответствующего продукта. С использованием программного обеспечения производителя определяли номер цикла, соответствующий максимальному ускорению процесса амплификации, получали калибровочную кривую числа данных циклов от относительной концентрации продукта, и определяли относительную концентрацию в неизвестном образце с последующей нормализацией по β -актину.

Методика изучения влияния наносомальной формы нсРЭЧ на эритропоэз.

Каплю крови, взятой из хвостовой вены крысы Вистар наносили на предварительно окрашенное бриллиантовым крезильным синим стекло, готовили мазок и помещали во влажную камеру на 3-5 мин при 37°C [Гуляева С.И., 2009]. При микроскопии подсчитывали не менее 1000 эритроцитов и среди них ретикулоциты.

2.12. Исследование наносомальной формы феназепама.

Методика изучения анксиолитического действия в тесте конфликтной ситуации.

Методика конфликтной ситуации по Vogel [Vogel J.R., 1971] основана на столкновении (конflikте) у крыс питьевой мотивации и

электроболевого раздражения. Исследование проводили на разработанной в лаборатории психофармакологии ФГБНУ «НИИ фармакологии им. В.В. Закусова» многоканальной установке конфликтной ситуации [Молодавкин Г.М., 1995].

Установка конфликтной ситуации состоит из трех частей: экспериментальной камеры, электронного блока и счетного устройства. Экспериментальная камера размерами 275х275х450 мм изготовлена из органического стекла. Она установлена на стандартный электродный пол, выполненный из прутков нержавеющей стали, диаметром 4 мм с расстоянием между ними 8-10 мм. К боковой стене каждой камеры прикреплена поилка - стеклянный сосуд с соском, изготовленным из нержавеющей стали. Сосок входил на 2 см в камеру на высоте 5 см от пола. Электродный пол и сосок поилки присоединяли к электронному блоку.

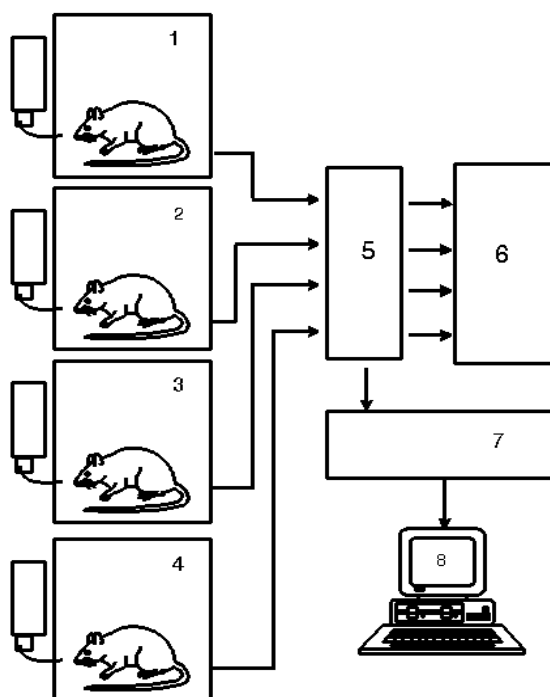


Рис. 2.2. Схема эксперимента по исследованию антиконфликтного действия веществ.

1,2,3,4-экспериментальные камеры; 5-электронный блок; 6-счетный блок; 7-преобразователь сигналов для компьютера; 8-компьютер Искра 103.

Электронный блок содержит стабилизаторы тока (по одному на каждый канал, что обеспечивает возможность независимой регулировки тока в них), формирователи выходных сигналов для счетного устройства и формирователи задержки подачи наказующего тока на поилки в день эксперимента. Он обеспечивает регистрацию ненаказуемых взятий воды во время выработки навыка взятий воды (тренировки, без подачи тока на поилку), а также наказующий ток и сигналы наказуемых взятий воды во время эксперимента.

Счетное устройство обеспечивает регистрацию ненаказуемых взятий воды во время тренировки и наказуемых взятий воды во время эксперимента.

Исследуемые группы: по 10 крыс в каждой, которым внутривенно за 30 минут до эксперимента вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 – 0.9% раствор натрия хлорида; группа 2 – раствор феназепама (0,5 мг/кг); группа 3 – раствор феназепама (1 мг/кг); группа 4 – феназепам (0,5 мг/кг) включенный в ПБЦА НЧ в 1% растворе ПС 80; группа 5 – феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1% растворе ПС 80; группа 6 – ФРН (0,25 мг/кг), сорбированный на ПБЦА НЧ, модифицированных 1 % ПС 80.

Опыт проводили в течение 3-х дней. В первый день животных полностью лишали питья. На следующий день, т.е. после 24-часовой депривации, проводили выработку навыка взятия воды из поилки. Для этого животных на 5 мин помещали в экспериментальные камеры. Животные обследовали камеру, через некоторое время находили поилку и начинали пить. В этот день на поилку и пол камеры подавали слабый ток (50 мкА), не ощущаемый крысами, поэтому взятия воды были ненаказуемыми и их число характеризовало выраженность питьевой мотивации.

На третий день животным за 30 мин до эксперимента вводили внутривенно препараты, а затем на 10 мин помещали в экспериментальные

камеры, но на этот раз через 10 сек после первого взятия воды на соски поилок и электродный пол камер подавали постоянный ток силой 0,45 мА, так что каждое взятие воды становилось наказуемым и для удовлетворения жажды крысам надо было преодолеть страх, развившийся в результате наказания. Критерием наличия анксиолитического эффекта считали увеличение числа наказуемых взятий воды из поилок животными в опытных группах, получивших феназепам, по сравнению с контрольной.

Методика изучения анксиолитического действия в тесте приподнятого крестообразного лабиринта.

Методика приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) основана на естественной боязни открытого пространства, новизне обстановки и падения с высоты [Воронина Т.А., 2005; Pellow et al., 1985]. Исследование проводили на мышах.

Установка приподнятого крестообразного лабиринта представляет собой 4 рукава длиной 30 см и шириной 6 см, скрепленных друг с другом под прямым углом. Два противоположных рукава имеют с двух сторон стенки высотой 30 см на всю их длину, в то время как два других открыты и освещены. Лабиринт поднят над уровнем пола на высоту 40 см. Животных помещали на центральную площадку лабиринта и в течение 3 мин визуально регистрировали следующие показатели поведения: латентный период первого выхода в открытые рукава лабиринта, число выходов и длительность пребывания в открытых рукавах, количество свешиваний с открытых рукавов, число выходов в закрытые рукава и число фекальных болюсов.

Критерием наличия анксиолитического эффекта считали увеличение числа выходов в открытые рукава и времени пребывания в них, а также повышение количеств свешиваний с открытых рукавов и снижение числа выходов в закрытые рукава.

Исследуемые группы: по 10 мышей в каждой, которым внутривенно за 30 минут до эксперимента вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9 % раствор натрия хлорида; группа 2 – раствор феназепама (0,1 мг/кг); группа 3 - раствор феназепама (0,5 мг/кг); группа 4 – раствор феназепама (1 мг/кг); группа 5 - феназепам (0,1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80; группа 6 - феназепам (0,5 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80; группа 7 - феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80.

Методика изучения антиагрессивного действия в тесте «драки» у мышей.

Агрессивное поведение исследовали в опытах на мышах в тесте «драки» пары животных на электродном полу. Агрессивную реакцию изучали по изменению порогов агрессивной реакции. Пороги определяли при раздражении пары мышей постепенно увеличивающимся по силе прерывистым электротоком, подаваемым на электродный пол камеры [Воронина Т.А., 2005].

Мышей парами высаживали на электродный пол стандартной камеры из плексигласа размерами 15x15x30 см. Животным давали привыкать к камере в течение 5 мин затем на пол подавали переменный ток, постепенно увеличивавшейся амплитуды. Ток подавали периодами по 3 сек, разделенными паузами 1 сек. Начинали стимуляцию с напряжения 2 в. Если после трех предъявлений тока одной интенсивности агрессивные реакции не возникали, напряжение увеличивали на 0,5в и продолжали стимуляцию до возникновения агрессии (драки), причем при одном напряжении должны были быть три последовательные драки. Драка животных выражалась в том, что мыши вставали на задние лапы, пищали и били (боксировали) передними лапами и кусали друг друга. Регистрировали напряжение тока, при котором у животных возникала драка.

Исследуемые группы: по 10 мышей в каждой, которым внутривенно за 30 минут до эксперимента вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9 % раствор натрия хлорида; группа 2 – раствор феназепама (2 мг/кг); группа 3 - феназепам (2 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80.

Методика изучения противосудорожного эффекта в тесте антагонизма с коразолом.

Согласно методике оценивали способность феназепама предупреждать тонико – клонический компонент судорожного припадка у крыс, вызванный коразолом. Коразол в дозе 70 мг/кг (ЭД 95 – доза, вызывающая судороги у 95% контрольных животных) вводили подкожно за 10 минут до проявления максимального эффекта вещества (проявляется через 30 мин). О наличии противосудорожного действия судили по способности препарата предотвращать тонико – клонические судороги и гибель животных.

Исследуемые группы: по 10 крыс в каждой, которым вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9 % раствор натрия хлорида (в/в) + коразол (70 мг/кг, подкожно); группа 2 – раствор феназепама (1 мг/кг, в/в) + коразол (70 мг/кг, подкожно); группа 3 - феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80 + коразол (70 мг/кг, подкожно).

Физиологический раствор, раствор субстанции феназепама и наносомальную форму феназепама вводили за 30 минут до начала эксперимента, коразол – через 20 минут после введения тестируемых веществ.

Методика изучения первично-генерализованных судорог, вызванных бемегридом. Методика регистрации биоэлектрической активности головного мозга крыс в условиях свободного поведения.

Для выяснения роли различных структур мозга в механизмах реализации противосудорожных эффектов феназепама в мозг крысы вживляли долгосрочные электроды для регистрации биоэлектрической активности. Электроды вживляли в сенсомоторную область коры, дорзальный гиппокамп и латеральный гипоталамус. Индифферентный электрод вживляли в носовую кость черепа. Координаты подкорковых структур рассчитывались по атласу мозга крыс, приведенному (Bugeš и соавт. 1963). Операции проводили под нембуталовым наркозом (40 мг/кг, в/м).

Регистрацию ЭЭГ проводили в экранированной камере в условиях свободного поведения животных. Использовали 21-ти канальный нейрокарттограф «Нейро-КМ», работающий на базе компьютера Pentium 4 с установленными фильтрами на 32 Гц и постоянной времени 0,03 (производитель «Нейростатокин»); компьютерный анализ ЭЭГ осуществляли с помощью программы «BRAINSYS». Программный комплекс выполнял следующие функции: ввод в компьютер многоканальной ЭЭГ и ее визуальное редактирование; фильтрацию, выделение артефактов и их устранение из анализируемого отрезка ЭЭГ; спектральный и когерентный анализ ЭЭГ и статистическую обработку полученных результатов.

При изучении влияния феназепама на биоэлектрическую активность мозга крыс регистрация ЭЭГ производилась в течение 15 минут до введения препаратов и через 15 и 30 минут после их введения. Вычисляли изменения спектра мощности биоэлектрической активности мозга крыс на фоне действия препаратов. Первично - генерализованная эпилептиформная активность вызывалась внутрибрюшинным введением бемегида (10 мг/кг).

Исследуемые группы: по 10 крыс в каждой, которым вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9 % раствор натрия хлорида (в/в) + бемегид (10 мг/кг, в/б); группа 2 – раствор

феназепама (1 мг/кг, в/в) + бемеград (10 мг/кг, в/б); группа 3 - феназепам (1 мг/кг, в/в), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80 + бемеград (10 мг/кг, в/б).

Физиологический раствор, раствор субстанции феназепама и наносомальную форму феназепама вводили за 30 минут до введения бемеграда.

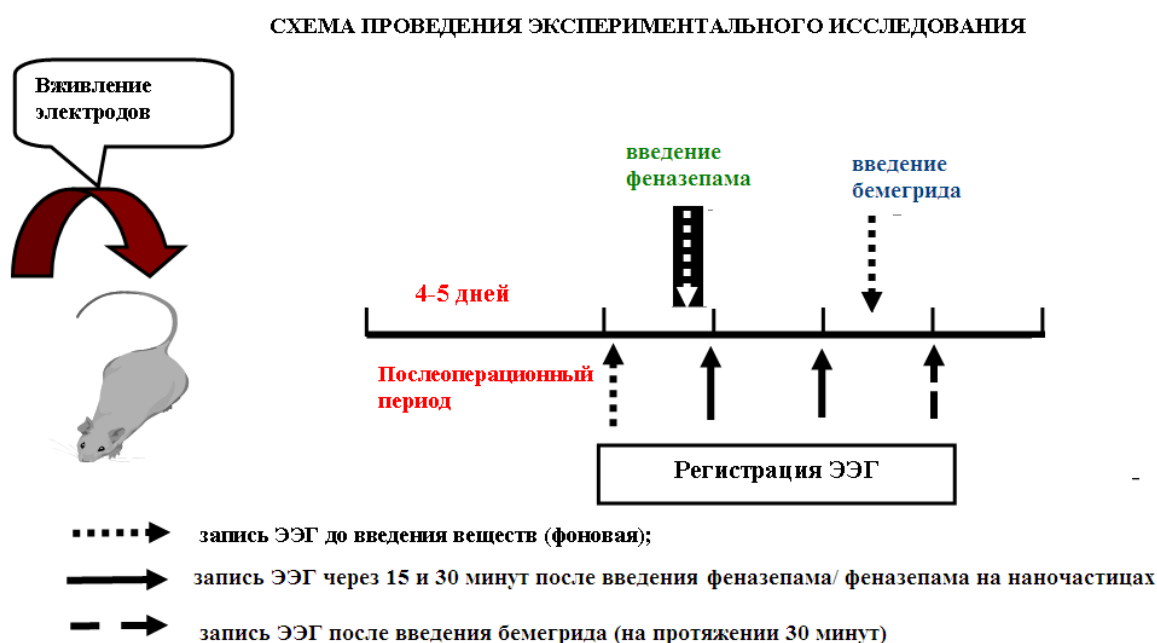


Рис. 2.3. Схема эксперимента по исследованию противосудорожного действия веществ.

Методика изучения седативного действия в тесте открытого поля.

Седативное действие оценивали с помощью метода «открытое поле» [Воронина Т.А., 2005] в опытах на мышах.

Установка открытого поля представляет собой квадратный ящик размером 1×1×1 м, с прозрачной крышкой. Пол камеры равномерно разделен линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 2,5 см. Предварительно мышей перед экспериментом в течение 10 мин выдерживали в темноте, после чего помещали на один из периферийных

квадратов открытого поля. Наблюдение за животными проводилось в течение 3 мин. Фиксировали число пересеченных квадратов, число вертикальных стоек и число обследований отверстий.

Уменьшение числа горизонтальных или вертикальных перемещений отражало седативное действие препарата, а число обследованных отверстий характеризовало ориентировочно – исследовательское поведение мыши.

Исследуемые группы: по 10 мышей в каждой, которым за 30 минут до начала эксперимента вводили внутривенно следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9 % раствор натрия хлорида; группа 2 – раствор феназепама (1 мг/кг); группа 3 - феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80.

Методика изучения миорелаксантажного действия с помощью метода вращающегося стержня.

Миорелаксантажное действие препаратов изучали с помощью метода вращающегося стержня (rota rod) в эксперименте на крысах и мышах. Животных помещали на стержень со скоростью вращения 3 об/мин. При использовании метода регистрировали число животных, не удержавшихся на стержне в течение 2 мин и латентный период падения крыс со стержня. Неспособность животных удержаться на вращающемся стержне свидетельствует о миорелаксантажном действии препарата.

Исследуемые группы: по 10 крыс в каждой, которым внутривенно за 30 минут до эксперимента вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9 % раствор натрия хлорида; группа 2 – раствор феназепама (1 мг/кг); группа 3 - раствор феназепама (2 мг/кг); группа 4 - феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80; группа 5 - феназепам (2 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80.

Исследуемые группы: по 10 мышей в каждой, которым внутривенно за 30 минут до эксперимента вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9 % раствор натрия хлорида; группа 2 – раствор феназепама (1 мг/кг); группа 3 - раствор феназепама (2,5 мг/кг); группа 4 – раствор феназепама (5 мг/кг); группа 5 - феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80; группа 6 - феназепам (2,5 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80; группа 7 - феназепам (5 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80.

Изучение механизма действия феназепама, включенного в ПБЦА НЧ с использованием анализаторов ГАМК-А рецепторов.

С целью выяснения вопроса о вовлечении ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса в реализацию анксиолитического действия наносомальной формы феназепама были использованы фармакологические анализаторы: антагонист бензодиазепиновых рецепторов –флумазенил и антагонист ГАМК-А рецепторов –бикукуллин.

Раствор субстанции феназепама и наносомальную форму феназепама вводили крысам внутривенно, затем через 15 минут этим же крысам вводили внутривенно флумазенил (10 мг/кг) и через 15 минут оценивали анксиолитический эффект, регистрируя количество наказуемых взятий воды.

Раствор субстанции феназепама и наносомальную форму феназепама вводили крысам внутривенно, затем через 15 минут этим же крысам вводили внутривенно бикукуллин (1 мг/кг) и через 30 минут оценивали анксиолитический эффект, регистрируя количество наказуемых взятий воды.

Исследуемые группы: по 10 крыс в каждой, которым за 30 минут до эксперимента вводили следующие вещества и тестируемые формы: группа 1 - 0.9 % раствор натрия хлорида; группа 2 – раствор феназепама (1 мг/кг);

группа 3 - раствор феназепама (1 мг/кг)+флумазенил (10 мг/кг); группа 4 – раствор феназепама (1 мг/кг)+бикукуллин (1 мг/кг); группа 5 - феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80; группа 6 - феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80 + флумазенил (10 мг/кг); группа 7 - феназепам (1 мг/кг), включенный в ПБЦА НЧ в 1 % растворе ПС 80+бикукуллин (1 мг/кг).

Методика изучения рецепторного связывания феназепама с бензодиазепиновыми рецепторами в условиях *in vitro* и *ex vivo*.

Приготовление мембран. Исследуемых животных декапитировали, извлекали головной мозг, отделяли гиппокамп, гомогенизировали в 16 мл ледяного (0-4°C) 50 mM Tris-HCl буфера (pH 7,4) используя гомогенизатор тефлон-стекло. Полученную суспензию центрифугировали при 42 000 g в течение 25 мин в ультрацентрифуге Optima L-70K (Beckman Coulter). После центрифугирования супернатант сливали, осадок ресуспендировали повторной гомогенизацией в том же объеме буфера, затем вновь центрифугировали. Процедуру отмывки проводили трижды, полученный осадок ресуспендировали в 20 мл Tris-HCl буфера и использовали по 250 мкл в процедуре связывания [N-метил-3H]-флунитразепама.

Процедура радиолигандного связывания. Полученную мембранную фракцию головного мозга инкубировали с [N-метил-3H]-флунитразепамом (удельная активность 81 Ки/ммоль) в течение 30 мин при температуре 0-4°C. Неспецифическое связывание определяли в присутствии избытка немеченого феназепама (20 мкМ). Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Процесс связывания останавливали путем добавления ледяного буфера и быстрой фильтрацией через стекловолоконные фильтры типа GF/B (Whatman) с последующей двукратной промывкой ледяным буфером общим объемом 8 мл.

Жидкостно-сцинтилляционная спектрометрия. Фильтры высушивали в течение 12 часов при комнатной температуре, затем помещали в сцинтилляционную жидкость (реактив Брея) объемом 5 мл и использовали для сцинтилляционного счета. Радиоактивность каждой пробы измеряли в течение 2 мин на сцинтилляционном счетчике PerkinElmer 2900TR. Эффективность счета составляла более 45%. Неспецифическое связывание составляло не более 10% от общего.

Анализ радиорецепторного связывания. Для обработки результатов радиолигандного связывания и построения кривых связывания радиоактивного лиганда использовали программу Graphpad Prism 4 Demo. При анализе насыщения и получения характеристик связывания B_{max} (величина отражает количество мест связывания лиганда на соответствующих рецепторах в исследуемой структуре мозга) и K_d (отражает аффинитет лиганда к местам связывания на рецепторном комплексе) измеряли специфическое связывание в диапазоне концентраций меченого лиганда от 0.01 до 20 нМ. Специфическое связывание рассчитывали как разницу между общим и неспецифическим связыванием. Неспецифическое связывание определяли в присутствии немеченого лиганда (20 мкМ). Для построения кривых вытеснения радиоактивных лигандов каждая концентрация исследуемого вещества была взята в 3-х повторностях.

2.13. Исследование наносомальной формы паклитаксела.

Методика изучения внутриклеточного накопления наночастиц в высокорезистентных клетках Jurkat WT.

Исследования выполнены на клетках линии JURKAT (Т-лимфобластоидная линия человека), полученных из банка клеточных культур РОНЦ им. Н.Н.Блохина РАМН, Москва. Клетки культивировали в среде RPMI-1640, содержащей 10% телячьей эмбриональной сыворотки и антибиотики, 10ммоль/л HEPES, pH=7,3. Клеточную культуру,

находящиеся в экспоненциальной фазе роста, в свежей питательной среде пересеивали в лунки 96- или 24-лучночного планшета (50-100 тыс. клеток в лунку), инкубировали в атмосфере 5% углекислого газа при 37°C.

Для подтверждения проникновения и накопления наночастиц в клетках проводили люминесцентное микроскопическое исследование.

В клеточные культуры добавляли 1 мл суспензии наночастиц с кумарином-6 (Sigma, США), спустя 2 часа инкубации фиксировали клетки 70% раствором этанола и выдерживали при температуре 37 °C 20 минут. Затем клетки трижды промывали фосфатным буфером и добавляли пропидий йодид в концентрации 1 мкг/мл (PI, Sigma, США) для окрашивания клеточных ядер. По окончании окрашивания клетки трижды промывали фосфатным буфером и рассматривали методом флуоресцентной микроскопии (Olympus BX51). При микроскопическом изучении НЧ с кумарином-6 флуоресцировали зеленым светом, а ядра клеток окрашивались в красный цвет.

Методика определения цитотоксической активности в МТТ тесте пролиферативной активности клеток Jurkat WT.

МТТ основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать бледно-желтый водорастворимый МТТ (3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)2,5-дифенил-2-Н-тетразолия бромид) в нерастворимые в воде голубые кристаллы формазана. Количество образовавшегося формазана, определяемое колориметрическим методом после его растворения в органических растворителях, характеризует интенсивность окислительно-восстановительных процессов в клеточных культурах и является косвенной количественной характеристикой активной биомассы.

В клеточные культуры, растущие определенное время в лунках 96-луночных плоскодонных планшетов с цитостатиками или без них (контрольные и опытные образцы) за 4-6 часов до окончания расчетного

периода инкубации вносили по 10 мкл раствора МТТ. По окончании инкубации клетки осаждали центрифугированием планшетов при 1000 об./мин. в течение 5-7 минут. Супернатант осторожно отбирали, вносили в каждую лунку по 60 мкл ДМСО, осадки ресуспендировали и инкубировали 30 минут при 37°C, после чего немедленно определяли оптическую плотность раствора формазана, используя спектрофотометр вертикального сканирования при длине волны 540 нм. Результаты измерения обрабатывали с использованием программы Elisafit.

Методика изучения противоопухолевого действия на модели аденокарциномы молочной железы Ca 755 у мышей линии C57bl/6.

Исследование выполнено на перевиваемой модели опухолевого роста мышей – солидной опухоли - аденокарциноме молочной железы, штамм Ca755, экспрессирующий Р-гликопротеин. Штамм Ca755 получен из коллекции опухолей Научно-исследовательского института морфологии человека РАМН.

Аденокарцинома Ca755 впервые получена в 1936 г. от спонтанной опухоли молочной железы у самки мыши C57BL6. Штамм был создан в Национальном институте рака США 5 сентября 1973 г. Средняя продолжительность жизни животных с опухолью – 23-27 дней. Поддерживается на мышах линии C57BL6. В опытах использовали 2-ой пассаж перевиваемой модели. 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 (5×10^6 клеток). Введение наносомальной и стандартной форм паклитаксела в трех экспериментальных дозах (15, 10 и 7,5 мг/кг в расчете 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:

$$\text{УПЖ \%} = (\text{СПЖо} - \text{СПЖк}) / \text{СПЖк} \times 100,$$

где СПЖо и СПЖк – средняя продолжительность жизни (сутки) в опытных и контрольных группах животных.

Торможение роста опухоли (ТРО, %) вычисляли по формуле:

$$\text{ТРО \%} = (V_k - V_o) / V_k \times 100,$$

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.

2.14. Изучение проникновения наночастиц через ГЭБ в экспериментах *in vitro*.

Исследования проводились совместно с Федеральным государственным бюджетным учреждением «Федеральный медицинский исследовательский центр психиатрии и наркологии» Министерства здравоохранения Российской Федерации (ФГБУ «ФМИЦПН»).

Получение первичной культуры клеток.

Для выделения первичных культур эндотелиоцитов из пупочной вены человека использовали методику, описанную в работе [Davis J., 2007] с частичной модификацией. Биологический материал получали из родильных домов г. Москвы в соответствии с этическими нормами, с согласия рожениц. Все последующие стадии выполняли в стерильных

условиях. Полость вены промывали DPBS без ионов Ca^{2+} и Mg^{2+} («Invitrogen», США) до полного удаления крови, заполняли 0,2% раствором коллагеназы в DPBS, приготовленной непосредственно перед выделением эндотелиоцитов, и подвергали ферментативной диссоциации. Пуповину переносили в стакан с DPBS, содержащим 0,9 мМ CaCl_2 , 0,493 мМ MgCl_2 , 5,56 мМ глюкозу, 0,327 мМ пируват натрия и инкубировали при 37°C 20 минут. После инкубации раствор коллагеназы, содержащий клетки отбирали в пробирку 50 мл; оставшуюся коллагеназу собирали перфузией вены 20 мл среды 199 («Invitrogen», США). К собранному элюату добавляли среду 199 с 10% эмбриональной сывороткой теленка («Invitrogen», США) и центрифугировали 10 минут при 250 g. Супернатант удаляли, осадок клеток суспендировали в среде DMEM/F12 («Invitrogen», США), содержащей 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS), 2 мМ L-глутамина, 20 нг/мл bFGF («Sigma», США), 120 мкг/мл гепарина, ростовую добавку для роста эндотелиальных клеток больших сосудов – LSGS («Invitrogen», США), 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина. Культуральные флаконы предварительно покрывали 10 мкг/мл фибронектином («Sigma», США) в течение часа при 37°C, далее промывали флаконы три раза DPBS. Затем клетки высаживали в культуральные пластиковые флаконы 25 см² («Corning-Costar», США) и культивировали при 37°C во влажной атмосфере с 5% CO₂. Культуры пассировали с использованием раствора трипсин (0,02%) – ЭДТА (0,01%). Во всех дальнейших экспериментах использовали первичную культуру эндотелиоциты на ранних пассажах 1-4.

Культура астроцитов для моделирования ГЭБ получена из криобанка отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ГНЦССП им. В.П. Сербского. Клетки культивировали в среде DMEM/F12 с 10% FBS, пенициллином (100 ед/мл) и стрептомицином (100 мкг/мл).

Иммуноцитохимический анализ.

Эндотелиоциты высаживали на предварительно покрытые раствором фибронектина покровные стёкла (2×10^4 кл/см²) в 0,2 мл ростовой среды. Через 12 часов меняли ростовую среду и культивировали до образования 70-80% монослоя (2–3 дня). Затем клетки отмывали от ростовой среды теплым DPBS, фиксировали в течение 30 минут 4% забуференным раствором параформальдегида, pH 7,4 после чего вновь трехкратно отмывали DPBS. Фиксированную и отмытую клеточную культуру инкубировали с 1-5 мкг/мл моноклональными антителами к клаудину-5 («Invitrogen», США), васкулярно-эндотелиальному кадгерину («Abcam», Великобритания) или поликлональными антителами к окклюдину («Abcam», Великобритания), ZO1 («Abcam», Великобритания), фактору фон Виллебранда («Abcam», Великобритания) или β -катенину («Invitrogen», США) в течение ночи. Отмывали три раза от несвязавшихся антител, затем проявляли с помощью антивидовых антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488 в разведении 1:1000 (Goat anti-mouse Alexa Fluor 488 или Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488, «Invitrogen», США). Ядра докрашивали DAPI («Invitrogen», США). Все разведения и отмывки проводили PBS (pH 7,4) с добавлением 0,2% Tween – 20, 0,2% Triton X – 100 и 1% нормальной сыворотки козы. Стекла для иммуноцитохимического анализа монтировали на предметные при помощи 80% глицерина, хранили при -20°C. Анализ связывания антител проводили на флуоресцентном конфокальном микроскопе (Nikon, A1 Multiphoton).

Моделирование гематоэнцефалического барьера.

Кокультивирование эндотелиальных клеток и аллогенных астроцитов проводили с использованием вставок Transwell («Corning-Costar», США), которые состоят из полупроницаемой мембраны с размером пор 0,4 мкм, позволяющий разделить два типа клеток физически, но при этом не влиять на обмен между ними ростовыми факторами и цитокинами (рис. 2.4). Полупроницаемую мембрану покрывали фибронектином 10 мкг/мл в течение часа, затем на нижнюю поверхность

мембраны высаживали астроциты 5×10^4 кл/см² в 12-луночный культуральный планшет с площадью вставок 1,12 см² и культивировали в течение суток.



Рис. 2.4. Оборудование для создания модели гематоэнцефалического барьера *in vitro*. (А) Культуральный планшет со вставками; (Б) Камера для измерения трансэндотелиального сопротивления клеток Endohm с двумя concentric электродами.

Эндотелиальные клетки высаживали на верхнюю поверхность мембраны 1×10^5 кл/см². На второй день клеткам меняли среду и добавляли 8-(4-хлорофинилтио)-аденозин 3',5'-цикломонофосфата («Sigma», США), – являющийся аналогом цАМФ, до конечной концентрации 0,25 мкг/мл. После четырех дней кокультивирования проводили измерение трансэндотелиального сопротивления (TEER) с периодичностью в два дня, используя систему Epithelial- volt-ohm meter и электродную камеру Endohm–12 («World Precision Instruments», США). Перед началом измерения камеру калибровали в среде DMEM/F12 без сыворотки в течение 15 минут. Кроме того, в этой же среде инкубировали клетки на вставках. При измерении в камеру добавляли 2 мл среды, во вставку – 0,5 мл. Величина сопротивления выражалась в $\Omega \cdot \text{см}^2$. Для этого значение сопротивления вставки без клеток вычиталось из величины сопротивления полученной с клетками и умножалась на площадь вставки 1,12 см². Измерение сопротивления проводили в трех параллельных опытах.

Методика оценки проникновения наночастиц через ГЭБ.

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). Для получения раствора к флаконам добавляли растворители, затем встряхивали и оставляли на 30 минут при комнатной температуре. По истечении 30 минут приступали к разведениям препаратов до концентрации 20 мкг/мл по наночастицам в буфере для проведения эксперимента по проницаемости Ringer-Hepes. Все исследуемые образцы тестировали в трех параллельных опытах. В качестве низкомолекулярных трэйсеров для оценки параклеточной и трансклеточной проницаемости применяли флуоресцеин натрия (M_w 376 Да, «Fluka») и родамин 123 («Sigma», США) в эквивалентных концентрациях.

Перед началом эксперимента определяли конфлюентность клеточного монослоя, измеряя трансэндотелиальное сопротивление (TEER). В эксперименте использовали только те клеточные конструкции, у которых TEER было не менее $30 \text{ Ом} \cdot \text{см}^2$. Перед экспериментом клетки инкубировали в течение 20 минут в буфере Ringer-Hepes (150 мМ NaCl, 2,2 мМ CaCl₂, 0,2 мМ MgCl₂, 5,2 мМ KCl, 2,8 мМ глюкозы, 5 мМ HEPES, 6 мМ NaHCO₃, pH 7,4). К нижнему, акцепторному отсеку вставки добавляли 2 мл буфера, в верхний, донорный – 0,5 мл. Через определенные интервалы времени (15, 30, 60, 90 и 120 минут) отбирали из донорной части аликвоту, объемом 100 мкл для последующего количественного измерения прошедшего через клетки вещества методом спектрофотометрии (VICTOR X3-«PerkinElmer»). Измерение флуоресценции проводили на длинах волн 485/530 нм для частиц, меченных родамином 123, и для частиц, меченных Dil – 549/565 нм. Единицы флуоресценции переводили в мкг/мл путем их аппроксимирования на калибровочную прямую, построенную с использованием стандартных растворов того же вещества. Исходя из рассчитанной таким образом концентрации в образцах и известного

объёма буфера, определяли суммарное количество вещества (Q , мкг) в донорной части в каждой временной точке с учетом разбавления препаратов:

$$Q_{30} = C_{30} V_R + C_{15} V_s$$

$$Q_{60} = C_{60} V_R + (C_{15} + C_{30}) V_s$$

где C_{15} , C_{30} , C_{60} – концентрации препаратов в донорной части в 15, 30 и 60 минут, соответственно; V_R – объем среды в донорной части (2 мл); V_s – объем отбираемый для анализа (0,1 мл).

Затем проницаемость (см/сек) оценивали по коэффициенту, рассчитываемому по формуле [Eigenmann D.E., 2013]:

$$P_{app} = dQ/dt \cdot 1/A \cdot C,$$

Где dQ/dt – количество вещества прошедшего в единицу времени через полупроницаемую мембрану, мкг/сек; A – площадь мембраны-вставки $1,12 \text{ см}^2$, C – начальная концентрация препарата, мкг/мл.

2.15. Изучение проникновения наночастиц через ГЭБ в экспериментах *in vivo*.

Исследования 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. Животные содержались в условиях естественного освещения и свободного доступа к воде и пище. НЧ, с включенным флуоресцентным красителем DiI, вводились в хвостовую вену мышам в количестве 50 - 100 мкг на животное (2,5 - 5 мг/кг) и крысам в количестве 150-300 мкг на животное (1-2 мг/кг). Исследовали НЧ размером 150 нм,

меченные DiI, растворенные в фосфатном буфере (pH 7,4) и 1% растворе коллифора. Спустя 2 и 24 часа после введения НЧ животных глубоко наркотизировали путем ингаляции изофлюрана и помещали в камеру аппарата Ivis Spectrum CT (PerkinElmer), где проводили прижизненную детекцию флюоресценции (Ex/Em: 530 -560/580 - 620) по протоколам производителя. Экспозицию и наборы фильтров для осуществления спектрального разделения каналов и вычитания аутофлюоресценции подбирали в автоматическом режиме с помощью поставляемого вместе с прибором программного обеспечения LivingImage 4.4.

Затем животных подвергали эвтаназии и проводили транскардиальную перфузию 4% раствором забуференного параформальдегида. Головной мозг, печень, селезенку и почки извлекали и проводили детекцию флюоресценции на Ivis Spectrum CT при тех же параметрах. После этого головной мозг и печень дофиксировали в течение 24 часов в 4% параформальдегиде pH 7,3 и приготавливали срезы толщиной 50 мкм 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 405нм, 488 нм, 561 нм и 638нм. Используемая оптика: Plan Apo 20x/0,75 Dic N, Apo IR 60x/1,27 WI и Apo TIRF 60x/1,49 oil Dic объективы. Контуров клеток визуализировали с помощью дифференциальной интерференционно-контрастной микроскопии. Ядра клеток докрасивали с помощью красителя Hoechst (Invitrogen).

Для идентификации нейронов и астроцитов на срезах мозга проводили флюоресцентный иммуногистохимический анализ с помощью антител к бета-III-тубулину и глиофибрилярному кислому белку.

Применяли стандартный иммунофлюоресцентный протокол. В качестве вторых антител применяли Goat anti-mouse Alexa Fluor 633 и Goat anti-rabbit Alexa Fluor 488 (Invitrogen).

Статистическая обработка.

Статистическая обработка экспериментальных данных выполнена с помощью компьютерной программы BioStat for Windows, Sigma-plot for Windows и Статистика 6.0 (StatSoft, USA). Для всех данных была применена описательная статистика: данные проверены на нормальность распределения. Тип распределения определялся критерием Шапиро-Уилка. Межгрупповые различия анализировали параметрическими методами, так как тип распределения был нормальным. В качестве параметрического критерия использовали t-критерий Стьюдента для независимых переменных. Различия были определены при 0.05 уровне значимости. Результаты исследования выражали как среднее $\pm$ ошибка среднего. В случае отсутствия нормальности распределения использовался непараметрический критерий Фишера.

Глава 3. Получение наносомальных форм фактора роста нервов, низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека, феназепама и паклитаксела.

3.1. Получение наночастиц плацебо.

Наночастицы из полиалкилцианоакрилатов получали путем полимеризации алкилцианоакрилатов в водной среде в присутствии стабилизаторов [Vauthier С., 2003]. Мономер-бутилцианоакрилат при интенсивном перемешивании вводили в водную среду, что приводило к образованию микроэмульсии.

С целью подбора оптимального режима перемешивания процесс полимеризации осуществляли при 100, 500 и 2500 оборотах мешалки. Перемешивание со скоростью 100 об/мин оказалось мало результативным поскольку не позволяло сформировать первичную эмульсию на начальном этапе процесса полимеризации. Перемешивание со скоростью 2500 об/мин приводило к повышению показателей полидисперсности полученной суспензии. Перемешивание со скоростью 500 об/мин является оптимальным, поскольку приводит к получению наночастиц, однородных по размеру.

В качестве стабилизатора первичной наносуспензии использовали декстраны. С целью подбора оптимальной концентрации и типа декстрана проводили исследования с использованием декстрана -10 и декстрана-70 в концентрациях 0,1%, 0,5%, 2,5%, 5%. Установлено, что при добавлении 0,1% раствора декстрана -10 или декстрана-70 процесс коагуляции частиц не тормозится. Кроме того, при использовании декстрана-10 в концентрациях от 0,1 % до 5 % образуются относительно крупные частицы. При использовании декстрана-70 в 5% концентрации полимеризационная среда становится вязкой, что приводит к существенному замедлению процесса полимеризации. Проведенное исследование показало, что при синтезе ПБЦА НЧ оптимальным

стабилизатором является декстран-70 в диапазоне концентраций от 0,5% до 2,5%.

С целью подбора оптимального значения pH реакционной смеси синтез НЧ проводили при различных значениях pH: 1.9, 2.0, 2.4, 2.6, 2.8 и 3.0, а затем определяли размер полученных частиц. В ходе эксперимента установили, что размер НЧ повышается при уменьшении pH от 3,5 до 1,8 (от 150 до 300 нм). Впоследствии при наработке НЧ полимеризацию вели в пределах pH от 1.9 до 3.0.

Для получения НЧ на основе сополимера молочной и гликолевой кислот использовали метод гомогенизации под давлением с последующим удалением органического растворителя [Ueda M., 1997]; полученные наночастицы подвергали лиофильной сушки. Для уменьшения поверхности раздела фаз с целью повышения агрегационной устойчивости НЧ использовали синтетические и природные стабилизаторы: низкомолекулярный поливиниловый спирт и человеческий сывороточный альбумин или поливиниловый спирт.

Для использования НЧ в качестве носителей ЛВ необходимо характеризовать их размер и форму, поскольку эти параметры оказывают существенное влияние на биораспределение частиц в организме и их способность проникать в клетки [Dinarvand R., 2011].

Для характеристики полимерных НЧ широко используют технологии рассеяния в различных диапазонах: видимом, ультрафиолетовом, рентгеновское рассеяние в больших и малых углах; кроме того, широко применяют многие виды микроскопии [Almeria B., 2010].

В наших исследованиях для визуализации полимерных НЧ использовали атомно-силовую и электронную (растровую и просвечивающую) микроскопию.

На рис. 3.1. представлено распределение наночастиц по размеру. Из графика видно, что распределение по диаметру исходных частиц в суспензии до приготовления лиофилизата имеет максимум в районе 105 нм

и полуширину распределения около 150 нм. Повторные измерения, проведенные в течение 24, 48 и 168 часов после исходного, подтвердили стабильность среднего диаметра и распределения частиц. При этом визуально не наблюдалось образование осадка или помутнение суспензии. Предположительно это можно объяснить тем, что, начиная с некоторого радиуса частиц беспорядочное броуновское движение компенсирует гравитационное осаждение. После проведения лиофилизации и ресуспензирования как средний диаметр, так и полуширина распределения заметно не изменились.

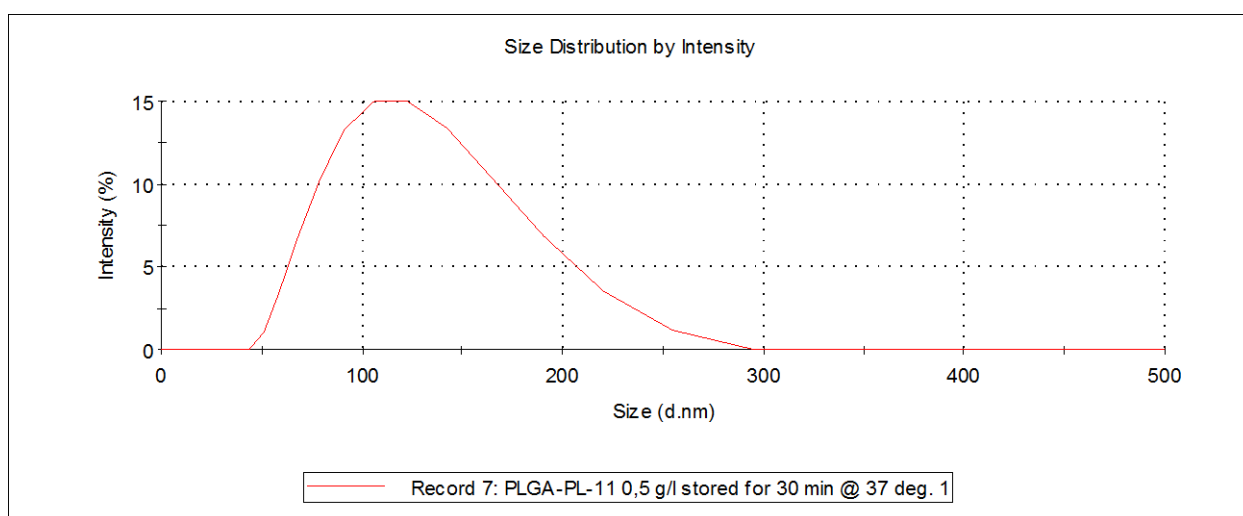


Рис.3.1. Распределение ПЛГА наночастиц по размерам.

Микрофотография отдельной ПБЦА НЧ, полученная просвечивающей микроскопией, приведена на рисунке 3.2. Видна сферическая форма частицы с размерами около 200 нм.

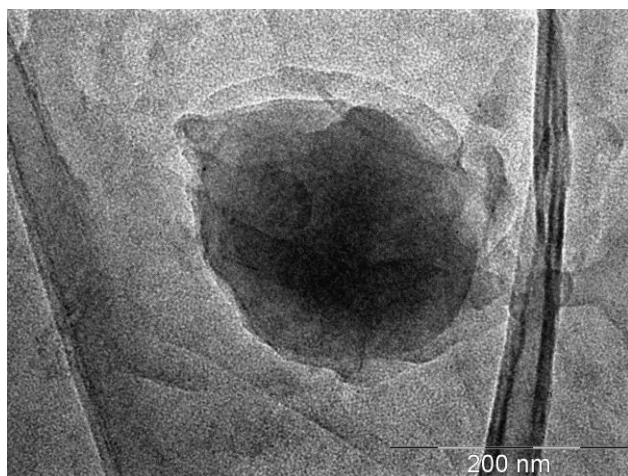
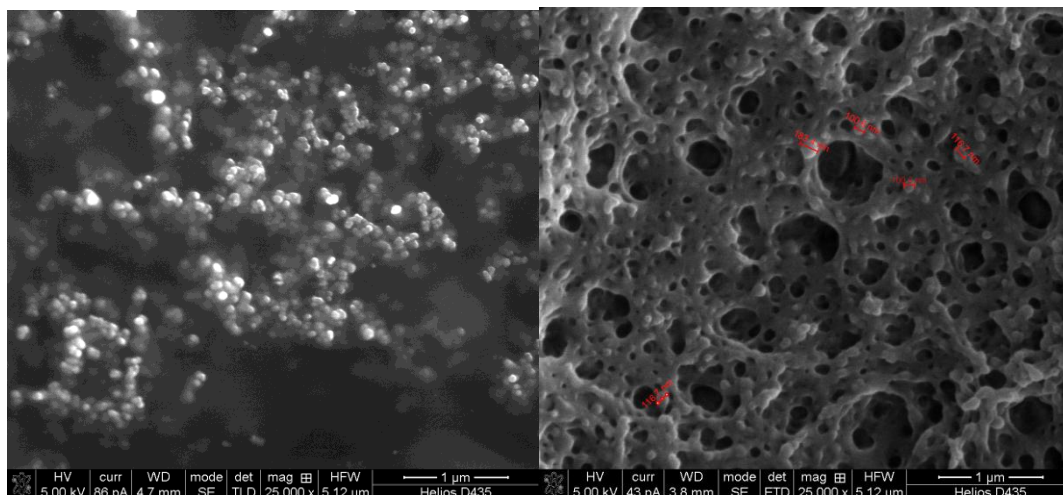


Рис.3.2. Микрофотография ПБЦА наночастицы.

На рис. 3.3 представлены микрофотографии НЧ, полученные РЭМ.



а

б

Рис. 3.3. Микрофотографии НЧ сразу после получения образца (а) и по прошествии 48 часов с момента получения (б).

На микрофотографии (рис. 3.3а) видны отдельные частицы сферической формы, а также агломераты, состоящие из 2-х и более частиц, так и состоящие из двух и более частиц агломераты. Необходимо отметить, что данная микрофотография сделана в течение 2 часов после приготовления образца. Более длительная экспозиция образца на подложке приводит к существенному увеличению размеров частиц и формированию однородной полимерной массы, что представлено на микрофотографии (рис. 3.3б), полученной спустя 48 часов после получения образца.

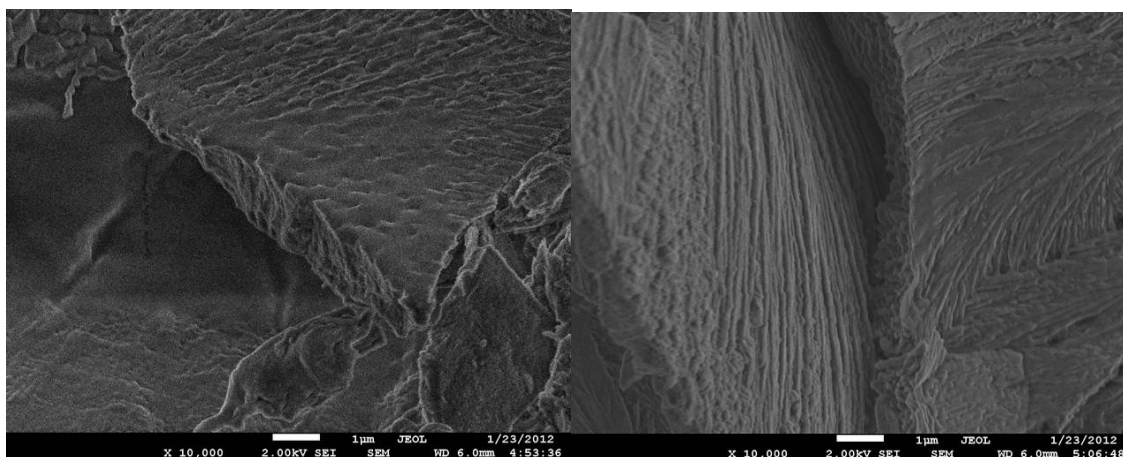


Рис.3.4. Микрофотографии образцов НЧ после лиофилизации.

На рис. 3.4 представлены микрофотографии образцов после лиофилизации. Отдельные частицы не различимы в массе криопротектора, однако слоистая структура поверхности свидетельствует об их наличии.

На рис. 3.5 представлена микрофотография НЧ, полученная методом АСМ. На микрофотографии видны как отдельные частицы, так и их агломераты.

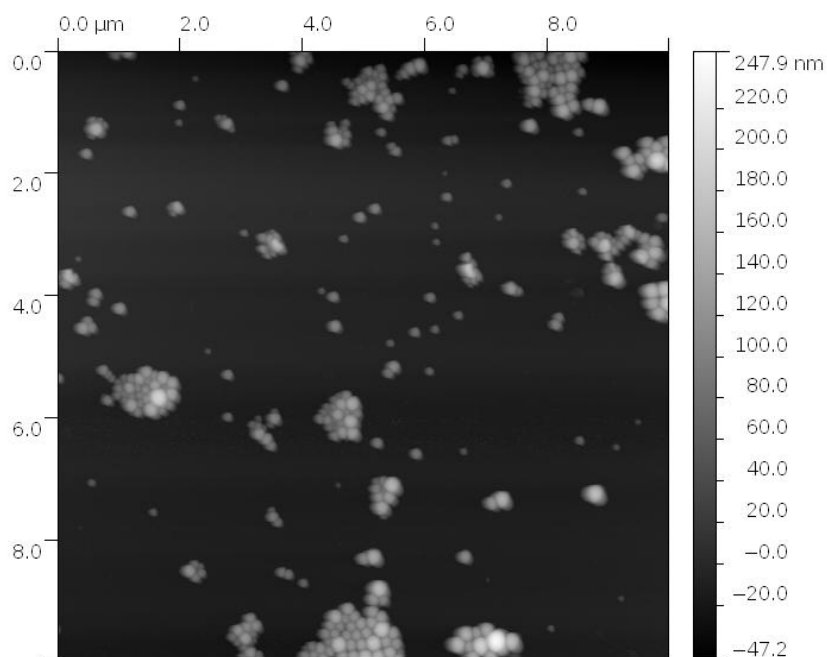


Рис.3.5. Микрофотография НЧ, полученная АСМ.

3.2. Получение наносомальной формы ФРН на основе ПБЦА НЧ.

Наносомальную форму ФРН получали путем сорбции ФРН на поверхности ПБЦА НЧ с последующей модификацией поверхности НЧ ПС 80. Иммуноферментным методом установлено, что степень сорбции ФРН на поверхности НЧ практически не зависит от присутствия ПС 80 и составляет 96,6% без инкубации НЧ в растворе ПС 80 и 95,9% в случае суспензии НЧ, покрытых ПС 80.

3.3. Получение наносомальных форм нсРЭЧ на основе ПБЦА и ПЛГА НЧ.

нсРЭЧ представляет собой гликопротеин, то есть сложный белок, в котором белковая (пептидная) часть молекулы ковалентно соединена с одной или несколькими группами гетероолигосахаридов. Известно, что создание наноразмерных форм для доставки белков в организме представляет собой непростую задачу в связи с неустойчивостью большинства белков в условиях синтеза наночастиц. Контакт с органическими растворителями в сочетании с различными видами гомогенизации может привести к нарушению третичной структуры белка и, соответственно, к его инаktivации. Учитывая указанное обстоятельство, нами было предложено использовать в качестве методического подхода сорбцию нсРЭЧ на предварительно полученных НЧ на основе различных полимеров и оптимизировать условия сорбции таким образом, чтобы добиться наибольшей степени связывания белка НЧ.

На эффективность сорбции соединений различной природы на поверхности НЧ влияет целый ряд факторов, определяющих сродство этих соединений к поверхности НЧ, среди которых основополагающую роль играет возможность электростатического взаимодействия между сорбируемым соединением и поверхностью НЧ с возможностью образования псевдо-полиэлектролитных комплексов. Указанное взаимодействие может быть ключевым в случае нсРЭЧ, проявляющего выраженные кислотные свойства (величина изоэлектрической точки для эритропоэтина составляет $pH\ 3,5-4,0$), что обусловлено наличием сиаловых кислот в концевых положениях углеводных остатков, входящих в состав нсРЭЧ. Также определенную роль в стабилизации связывания молекул с поверхностью НЧ могут играть и гидрофобные взаимодействия фрагментов молекул с наиболее гидрофобными участками поверхности НЧ. С целью изучения возможности сорбции нсРЭЧ были получены НЧ на основе различных типов полимеров – ПБЦА, ПЛА и ПЛГА. Для

стабилизации НЧ использовали различные ПАВ: ЧСА, ПВС, либо Р 188 для ПЛГА НЧ и Д-70 – для частиц из ПБЦА. Размеры и поверхностные заряды НЧ представлены в табл. 3.1. Данные по эффективности сорбции на них нсРЭЧ представлены в табл. 3.2. и на рис. 3.6.

Полученные данные свидетельствуют о том, что эффективность сорбции на поверхности НЧ нсРЭЧ зависит как от типа полимерной основы НЧ, так и ПАВ, который был использован в качестве стабилизатора в процессе получения НЧ. Так, присутствие Р 188 в принципе препятствует сорбции нсРЭЧ, вероятно вследствие гидрофилизации поверхности НЧ.

В то же время не было выявлено прямой зависимости между поверхностным зарядом НЧ и степенью сорбции нсРЭЧ на их поверхности или, в случае полилактидов – количеством концевых карбоксильных групп (кислотными числами) этих полимеров. Хотя следует отметить, что среди всех полилактидных НЧ наиболее эффективно сорбировали нсРЭЧ частицы 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 сополимера Resomer 502Н, полученными в присутствии ЧСА, составляет более 80% при поверхностном заряде НЧ -30,1 мВ. Что касается НЧ, полученных на основе полибутилцианоакрилата, то они достаточно эффективно сорбировали нсРЭЧ (более 70% нсРЭЧ связано с НЧ).

Таблица 3.1

Характеристики НЧ, использованных для сорбции нсРЭЧ

№ образц а	Полимер	ПАВ	Поверхностный заряд, мВ	Средний диаметр (Z-Aved), нм	Поли- дисперсность (PDI)
993	PLA ($\eta=0,34$)	0,5% ПВС	-18.9 $\pm$ 2.05 (разб.в 100 раз)	191.9 $\pm$ 0.911 (разб. в100 раз)	0,103 $\pm$ 0,023
1028	PLA ($\eta=0,34$)	2% F-68	-15,7 $\pm$ 0,833 (разб.в 100 раз)	423,9 $\pm$ 71,9 (разб. в100 раз)	0,558 $\pm$ 0,064
1167	PLA ($\eta=0,34$)	0,5% HSA	-25.7 $\pm$ 1.42 (разб. в100 раз)	150.0 $\pm$ 0.7071 (разб. в100 раз)	0.171 $\pm$ 0.020
982	PLA ($\eta=0,68$)	0,5% ПВС	-23.8 $\pm$ 2.34 (разб. в100 раз)	203.3 $\pm$ 1.247 (разб. в100 раз)	0,086 $\pm$ 0,023
780-1	ПБЦА (рН 3)	Д-70	-0.90 $\pm$ 0.14 (без разбавл.)	165.5 $\pm$ 1.443 (разб. в100 раз)	0,083 $\pm$ 0,007
785-1	ПБЦА (рН 2)	Д-70	-1.46 $\pm$ 0.27 (без разбавл.)	187.7 $\pm$ 1.632 (разбавл. в 100 раз)	0,107 $\pm$ 0,023
1206	Resomer 202S	1% ПВС	-2.12 $\pm$ 0.0763 (без разбавл.)	144,1 $\pm$ 1,534 (разбавл. в 50 раз)	0,102 $\pm$ 0,008
1207	Resomer 202H	1% ПВС	-3.65 $\pm$ 0.0964 (без разбавл.)	142,0 $\pm$ 0,8539 (разбавл. в 50 раз)	0,107 $\pm$ 0,017
1208	PLGA50:50 ($\eta=0,37$)	1% ПВС	-10.8 $\pm$ 1.30 (разбавл. в 50 раз)	143,0 $\pm$ 0,7932 (разбавл. в 50 раз)	0,090 $\pm$ 0,015
1209	Resomer 752H	1% ПВС	-5.86 $\pm$ 0.245 (без разбавл.)	141,2 $\pm$ 0,1414 (разбавл. в 50 раз)	0,115 $\pm$ 0,017
1216	Resomer 502S	1% ПВС	-2.16 $\pm$ 0.0810 (без разбавл.)	137,0 $\pm$ 0,6164 (разбавл. в 50 раз)	0,090 $\pm$ 0,017
1217	Resomer 502H	1% ПВС	-5.04 $\pm$ 0.220 (без разбавл.)	140,9 $\pm$ 0,4655 (разбавл. в 50 раз)	0,101 $\pm$ 0,009
1218	Resomer 752S	1% ПВС	-2.02 $\pm$ 0.256 (без разбавл.)	160,8 $\pm$ 0,8809 (разбавл. в 50 раз)	0,081 $\pm$ 0,010
1219	PLGAaeg	1% ПВС	-3.53 $\pm$ 0.363 (без разбавл.)	143,3 $\pm$ 0,3304 (разбавл. в 50 раз)	0,135 $\pm$ 0,008
1226	Resomer 202H	1% HSA	-19.6 $\pm$ 0.759 (без разбавл.)	115,2 $\pm$ 0,2160 (разбавл. в 50 раз)	0,191 $\pm$ 0,009
1227	Resomer 502H	1% HSA	-30.1 $\pm$ 1.56 (без разбавл.)	90,09 $\pm$ 0,4567 (разбавл. в 50 раз)	0,216 $\pm$ 0,008
1228	Resomer 752H	1% HSA	-24.4 $\pm$ 2.30 (без разбавл.)	93,42 $\pm$ 0,7299 (разбавл. в 50 раз)	0,196 $\pm$ 0,006
1229	PLGAaeg	1% HSA	-7.41 $\pm$ 0.612 (без разбавл.)	453,7 $\pm$ 10,98 (разбавл. в 50 раз)	0,547 $\pm$ 0,019

Таблица 3.2

Эффективность сорбции нсРЭЧ на НЧ различного состава.

№ образца	Полимер	ПАВ	Степень сорбции нсРЭЧ, %	Кислотное число, мг КОН/г полимера	ZP, mV
993	PLA($\eta=0,34$)	0,5% ПВС	25,67	1,7	-13,2
1128	PLA($\eta=0,34$)	2% F-68	0	1,7	-14,8
982	PLA($\eta=0,68$)	0,5% ПВС	23,4**	1,7	-18,9
780-1	ПБЦА	Д-70	77,2**	—	-12,8
1226	Resomer 202H	1% HSA	44,11*	6	-19,6
1227	Resomer 502H	1% HSA	81,07*	6	-30,1
1228	Resomer 752H	1% HSA	60,18*	8-15	-24,4
1229	PLGAaeg	1% HSA	74,64*	26	-7,4

Примечание:* - данные получены методом иммуноферментного анализа;

** - среднее из 5 измерений

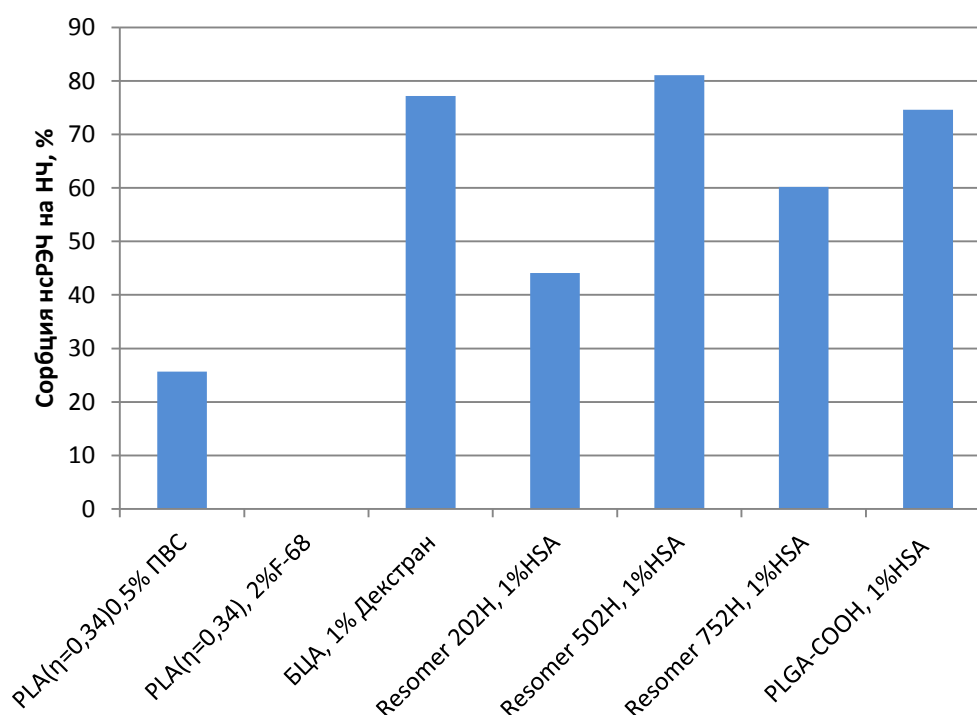


Рис. 3.6. Влияние состава НЧ и условий их получения на эффективность сорбции нсРЭЧ на их поверхности (численные значения приведены в табл. 3.2.).

Известно, что на поверхности НЧ, полученных в присутствии стабилизатора, остается и достаточно прочно удерживается некоторое количество стабилизатора. В то же время можно было ожидать, что наличие свободного (не связанного с наночастицами) стабилизатора в растворе нсРЭЧ во время инкубации способно в той или иной степени повлиять на эффективность сорбции нсРЭЧ НЧ – например, за счет конкурентного взаимодействия нсРЭЧ со стабилизатором. Учитывая указанное обстоятельство, нами было проведено предварительное отделение готовых НЧ от свободного стабилизатора (ПВС или ЧСА) с последующей их инкубацией в растворе нсРЭЧ.

Действительно, оказалось, что наличие в инкубационной среде использованного ПАВ может влиять на эффективность процесса сорбции, однако влияние это в существенной степени зависит от природы ПАВ. Так, если предварительное отделение НЧ от ПВС позволяло значительно увеличить эффективность сорбции нсРЭЧ, то наличие в инкубационной среде ЧСА не только не повышало эффективность сорбции, но и существенно понижало ее (табл. 3.3 и рис. 3.7).

Таблица 3.3.

Эффективность сорбции нсРЭЧ на НЧ в зависимости от наличия свободного ПАВ в инкубационной среде

№ образца	Полимер	ПАВ, %	Степень сорбции, %	
			Наличие стадии удаления свободного ПАВ	
			Да	Нет
993	PLA ($\eta=0,34$)	0,5% ПВС	46,5 $\pm$ 2,6*	25,67
982	PLA($\eta=0,68$)	0,5% ПВС	33,2 $\pm$ 2,2**	23,4 $\pm$ 2,0
1217	Resomer 502H	1% ПВС	81,5 $\pm$ 0,7***	69,4 $\pm$ 1,2 ****
1227	Resomer 502H	1% HSA	44,46 ¹	81,07 ¹
1228	Resomer 752H	1% HSA	37,32 ¹	60,18 ¹

Примечание: * - среднее из 4-х; ** - среднее из 5; *** - среднее из 3-х; **** - среднее из 2-х

¹ - степень связывания по данным иммуноферментного анализа

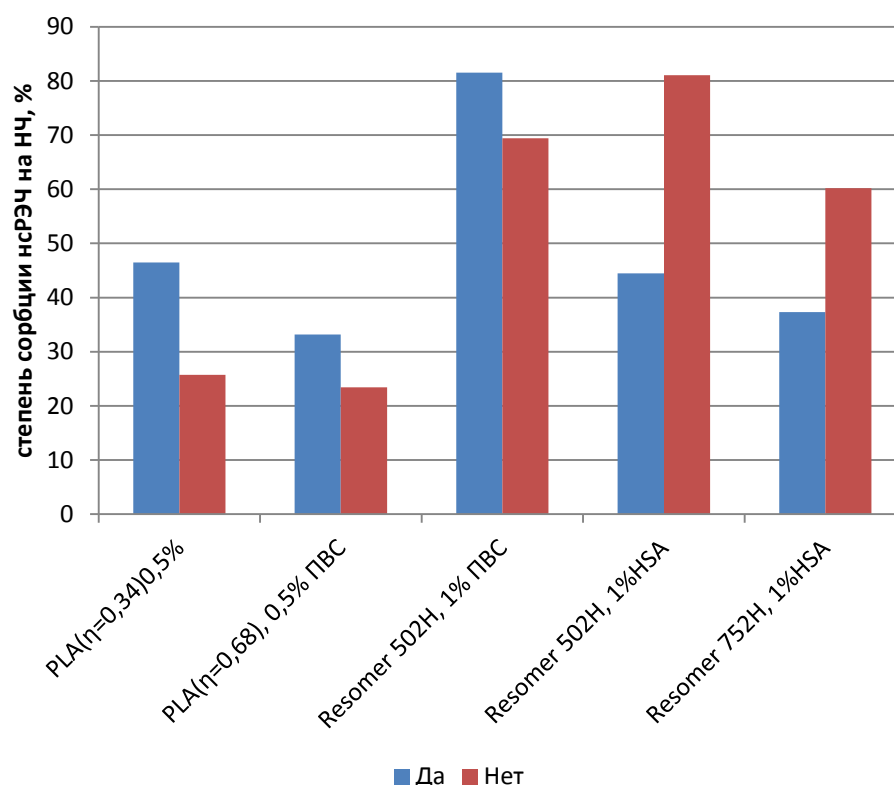


Рис. 3.7. Эффективность сорбции нсРЭЧ на НЧ в зависимости от наличия свободного ПАВ в инкубационной среде («Да» - частицы отмыты от свободного ПАВ, «Нет» - частицы от свободного ПАВ отмыты не были)

Из представленных данных следует, что наличие свободного альбумина в инкубационной среде способствует сорбции нсРЭЧ на поверхности НЧ. Наиболее эффективно нсРЭЧ сорбируется на НЧ на основе сополимера Resomer 502 Н (сополимер с соотношением звеньев молочной и гликолевой кислот 1:1 и с концевой карбоксильной группой), причем полученных в присутствии 1% ЧСА и не отмытых от него.

Что касается полилактидных НЧ, полученных в присутствии ПВС, то из представленных данных следует, что сорбцию нсРЭЧ более целесообразно проводить на предварительно отмытых от свободного ПВС частицах.

Для уточнения оптимального состава НЧ было исследовано влияние состава предварительно отмытых НЧ, полученных с использованием 1% ПВС, на эффективность сорбции нсРЭЧ. Результаты представлены в табл. 3.4 и на рис. 3.8.

Таблица 3.4.

Влияние природы полилактида на эффективность связывания нсРЭЧ НЧ на его основе (1% ПВС).

№ образца	Полимер	Степень сорбции нсРЭЧ, %
1206	Resomer 202S	46,5 ± 2,6*
1207	Resomer 202H	23,4 ± 2,0*
1217	Resomer 502H	69,4 из 2-х**
1208	PLGA 50:50 ($\eta=0,37$)	25,2 ± 1,8 ***
1209	Resomer 752H	83,3 ± 1,2***
1216	Resomer 502S	38,3 ± 1,7*
1218	Resomer 752S	45,2 ± 2,0*
1219	PLGA-COOH	64,1 ± 2,1****

Примечание: * - среднее из 3; ** - среднее из 2-х; *** - среднее из 4-х; **** - среднее из 5

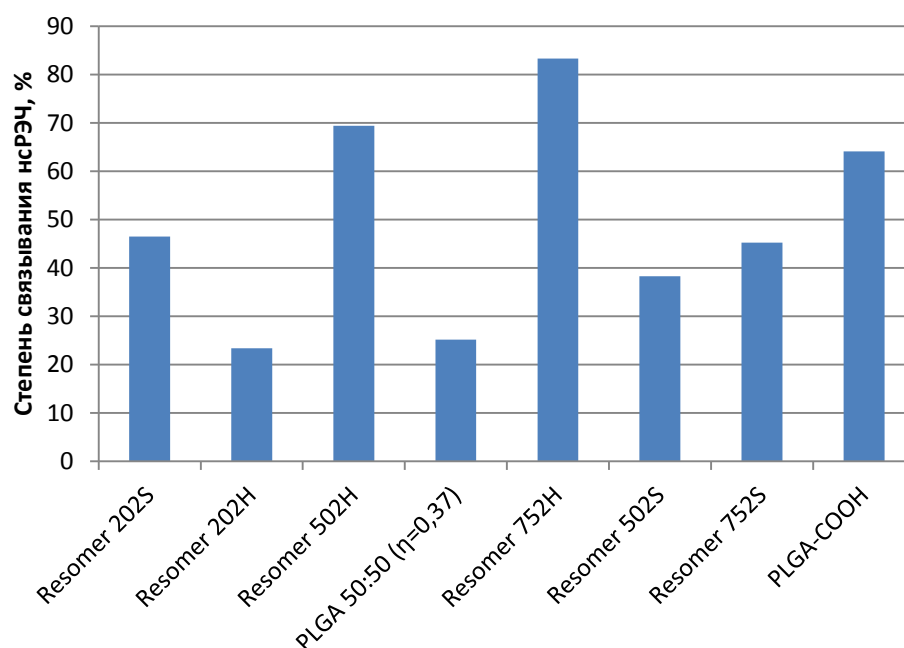


Рис. 3.8. Эффективность связывания нсРЭЧ НЧ различного состава (получены в присутствии 1% ПВС и отмыты от него перед инкубацией в растворе нсРЭЧ)

Полученные результаты позволяют предположить, что в целом наиболее эффективно связывают нсРЭЧ НЧ на основе сополимеров Resomer 502H и Resomer 752H.

Влияние времени инкубации НЧ в растворе нсРЭЧ на степень его сорбции было исследовано на примере НЧ на основе сополимера Resomer 502Н, полученных в присутствии 1% ПВС и предварительно отмытых от него. Результаты представлены на рис. 3.9.

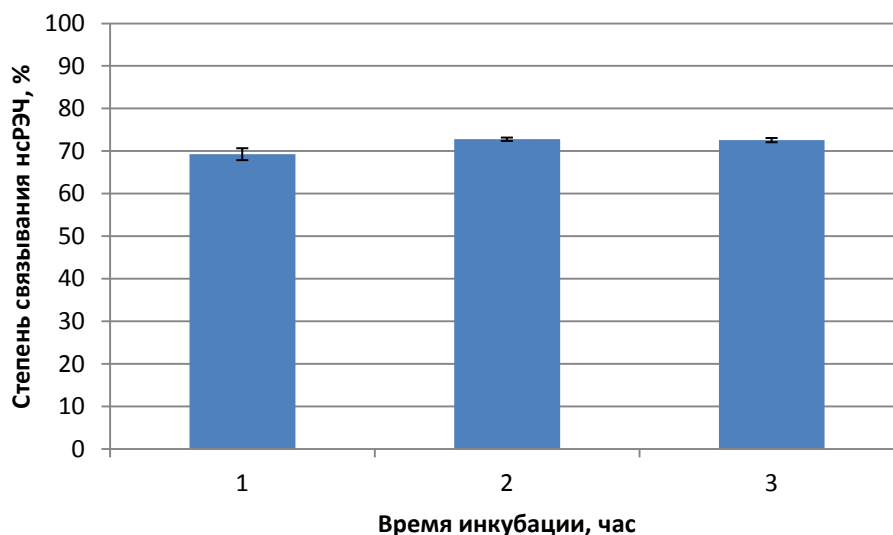


Рис. 3.9. Влияние времени инкубации НЧ в растворе нсРЭЧ на степень его сорбции (наночастицы на основе Resomer 502Н, полученные в присутствии 1% ПВС и предварительно отмытые от него).

Очевидно, что для эффективной сорбции достаточно инкубировать НЧ в растворе нсРЭЧ в течение одного часа – при этом достигается предельное насыщение поверхности НЧ нсРЭЧ.

Как показано выше, эффективность сорбции нсРЭЧ на некоторых типах НЧ достаточно высока и достигает значения 80%. Вместе с тем, можно предположить, что ионная сила и наличие в растворе дополнительно введенных ПАВ могут повлиять на устойчивость связывания молекул нсРЭЧ НЧ. С этой целью оценивали устойчивость сорбции нсРЭЧ в таких средах как фосфатно-солевой буферный раствор (PBS pH 7,4) и водный раствор полоксамера F-68. В качестве объекта исследования были выбраны НЧ на основе Resomer 502Н, полученные в присутствии 1% ПВС и предварительно отмытые от него. Указанные частицы инкубировали в растворе нсРЭЧ, выделяли из суспензии центрифугированием и вновь ресуспендировали либо в воде, либо в PBS,

либо в 1% растворе полоксамера F-68. Выбор последнего обусловлен тем, что по данным ряда авторов модификация именно этим полоксамером в ряде случаев обеспечивает повышение эффективности доставки в мозг НЧ на основе полилактидов [Batrakova E.V., 2003; 2008]. Результаты исследования представлены на рис. 3.10.

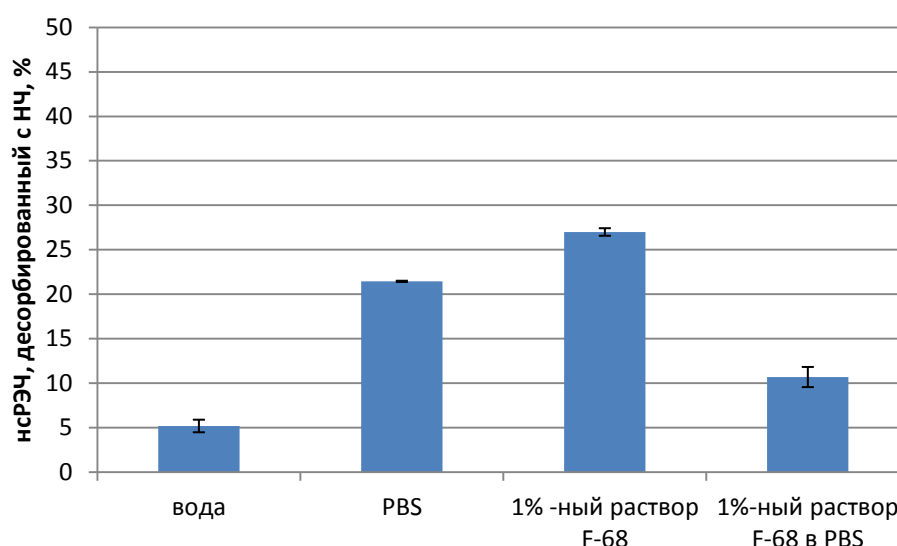


Рис.3.10. Десорбция нРЭЧ с НЧ на основе Resomer 752Н 1% ПВС в различных средах. Время инкубации 1 час (n=3).

Таблица 3.5.

Статистическая обработка данных по размерам и распределению по размерам наночастиц различного состава.

Полимер	ПАВ	n, P=0,95	Размеры, нм	S _r	PDI	S _r
ПБЦА	Д-70	3	177,5±27,9	0,15	0,082±0,044	0,54
Resomer 502Н	ПВС	3	145,3±15,5	0,11	0,114±0,042	0,37
Resomer 502Н	ЧСА	2	92,47±11,40	0,12	0,220±0,045	0,21

Важным параметром для характеристики наносомальной формы являются размеры НЧ и распределение их по размерам. В связи с этим были проанализированы данные, полученные при определении размеров НЧ-плацебо, полученных в идентичных условиях из идентичных составляющих (Табл. 3.5).

Достоверность предложенной методики сорбции нсРЭЧ на НЧ была исследована на примере сорбции нсРЭЧ на НЧ на основе Resomer 502Н, полученных в присутствии 1% ПВС и предварительно отмытых от него. Результат, представленный в табл. 3.6, свидетельствует, что данный метод достаточно надежен и позволяет при точном соблюдении методики эксперимента добиться достаточно достоверного результата: степень сорбции нсРЭЧ составила $83,68 \pm 1,11$ % ($n = 9$; $p = 0,95$, относительное стандартное отклонение $s_r = 0,017$). Таким образом, средняя величина сорбции нсРЭЧ во флаконе с 1 мл лиофилизата составляет $83,68 \pm 1,11$ % ($n = 9$; $p = 0,95$, воспроизводимость $s_r = 0,017$).

Таблица 3.6.

Статистическая обработка результатов сорбции нсРЭЧ (с отмыванием, стабилизатор 1% ПВС, полимер Resomer 752Н)

№ образца	С нсРЭЧ исх., мг/мл	С нсРЭЧ в супернатанте, мг/мл	Степень сорбции нсРЭЧ, %
1209	0,896	0,164	81,70
		0,150	83,26
		0,149	83,37
		0,137	84,71
		Среднее из 5 измерений: 0,150	Среднее из 5 измерений: 83,26
		0,138	84,60
		0,146	83,71
		0,129	85,60
		0,156	82,56
		0,136	84,82
		0,151	83,15
		0,138	84,60
0,172	80,80		
Среднее (n = 9)		83.68 ± 1.11	

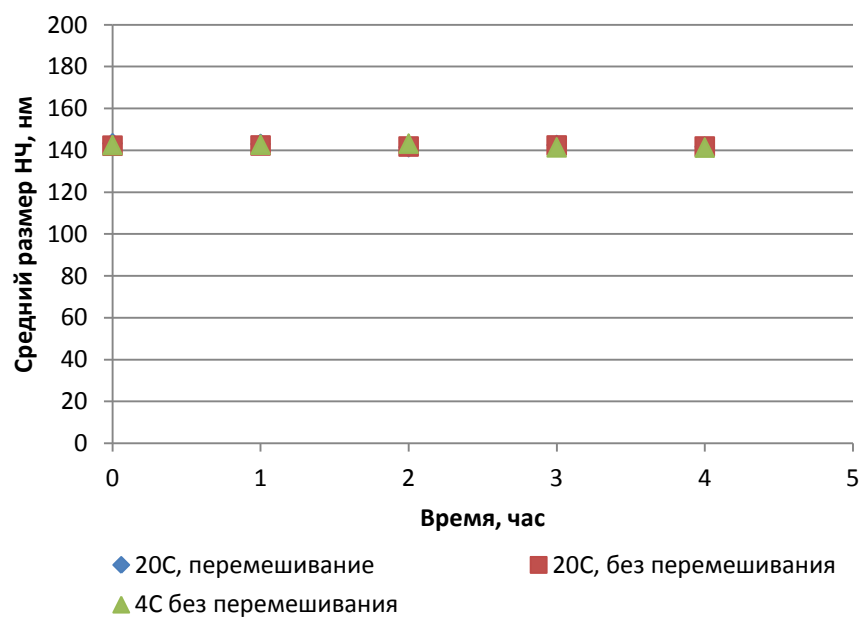
Результаты иммуноферментного анализа и их статистическая обработка приведены в табл. 3.7.

Таблица 3.7.

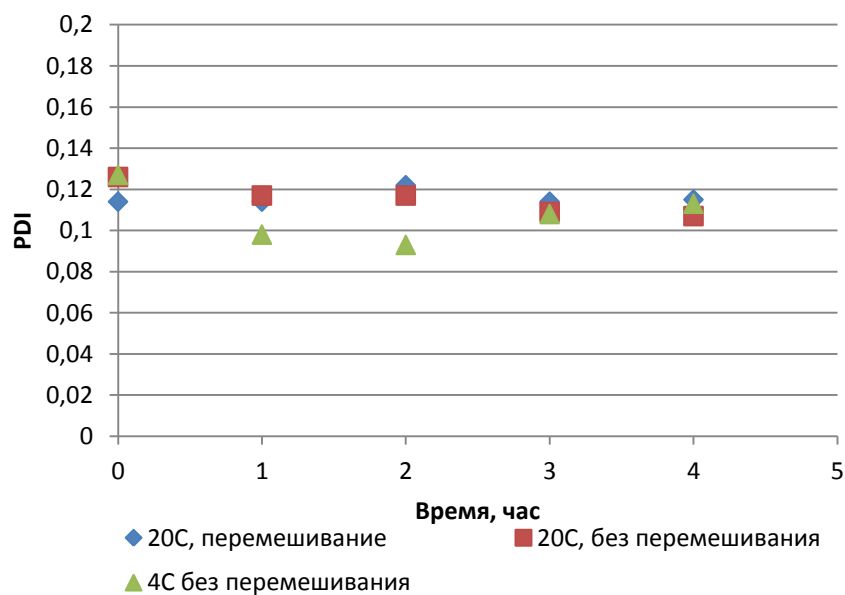
Статистическая обработка результатов иммуноферментного анализа раствора нсРЭЧ.

С нсРЭЧ, мг/мл	Среднее значение С нсРЭЧ, мг/мл	S _r	n	P
0,63; 0,56; 0,52; 0,63; 0,65	0,60±0,06	0,10	5	0,95

Использование разработанных наносомальных форм нсРЭЧ в дальнейших исследованиях, а также в практике предполагает, что суспензия НЧ должна быть агрегационно стабильна в течение некоторого времени как при комнатной температуре, так и при хранении ее в холодильнике. В связи с этим агрегационная устойчивость НЧ различного состава была изучена в течение 4-х часов при температурах 4°C и 20°C. Размеры НЧ в суспензии определялись как без перемешивания, так и с перемешиванием, предваряющем определение размеров НЧ. Результаты, представленные в табл. 3.8., демонстрируют, что в указанном временном интервале размер частиц практически не изменяется (о чем свидетельствуют как средние размеры НЧ, так и индекс полидисперсности, который должен был бы увеличиться при появлении более крупных фракций и агрегатов). Результаты измерений размеров наночастиц и индексов полидисперсности в течение 4 часов при разной температуре представлены также на рис. 3.11 а и б.



а



б

Рис. 3.11. Изменение размеров (а) и индексов полидисперсности (б) суспензии НЧ на основе Resomer 752Н, стабилизированных 1% ПВС, в течение 4 часов.

Таблица 3.8.

Агрегационная устойчивость наночастиц при разных температурах.

№	Образец	Время, час	20 °С				4 °С	
			С перемешиванием		Без перемешивания		С перемешиванием	
			ZAveD, нм	PDI	ZAveD, нм	PDI	ZAveD, нм	PDI
209	Resomer 752H 1% ПВС	1	143.4±0.4830	0.114±0.016	142.3±0.8406	0.126±0.014	142.6±2.515	0.127±0.015
		2	143.1±1.031	0.114±0.025	142.4±0.6403	0.117±0.018	142.8±0.4787	0.098±0.008
		3	141.6±1.237	0.122±0.001	141.9±0.9465	0.117±0.015	143.3±0.723	0.093±0.014
		4	142.6±0.5598	0.114±0.012	142.4±0.4123	0.109±0.016	141.5±0.6055	0.108±0.010
		5	141.8±0.9878	0.115±0.014	141.9±0.3862	0.107±0.018	141.4±0.8869	0.113±0.008
1227	Resomer 502H 1% ЧСА	1	91.54±0.2882	0.216±0.002	91.76±0.6253	0.219±0.011	92.23±0.3314	0.219±0.011
		2	89.88±0.5119	0.217±0.006	90.61±0.7643	0.218±0.005	91.98±0.6110	0.224±0.004
		3	89.67±0.8109	0.218±0.011	89.77±0.5699	0.224±0.003	91.76±0.8898	0.205±0.011
		4	89.36±0.7251	0.218±0.010	89.51±0.5986	0.219±0.010	91.97±1.222	0.217±1.222
		5	88.81±0.7641	0.227±0.006	89.34±0.6225	0.218±0.010	92.07±0.2970	0.223±0.005
1263	ПБЦА, 1% Д-70	1	183.2±1.962	0.096±0.020	184.6±2.271	0.093±0.028	182.6±1.269	0.105±0.020
		2	182.7±1.683	0.088±0.013	183.3±1.226	0.095±0.015	182.1±1.297	0.102±0.008
		3	181.9±1.489	0.096±0.010	180.9±2.392	0.100±0.009	181.6±0.9201	0.101±0.022
		4	181.1±1.666	0.086±0.011	180.9±1.936	0.089±0.017	183.7±2.949	0.084±0.020
		5	180.6±0.7848	0.094±0.018	180.1±0.7762	0.091±0.020	181.8±1.066	0.100±0.015

Поскольку наносомальная форма представляет собой лиофилизат-плацебо, который перед введением будет ресуспендирован в растворе нсРЭЧ, задача свелась к определению стабильности лиофилизата и агрегационной стабильности ресуспендированных НЧ. Вопрос агрегационной стабильности был рассмотрен выше. Что касается стабильности лиофилизата, то проведенные нами ранее исследования показали, что лиофилизат-плацебо стабилен при хранении в течение года при температуре 4°C.

Вместе с тем, нами была проверена принципиальная возможность получения лиофилизата наночастиц с предварительно сорбированным на них нсРЭЧ. Для этого часть партии НЧ-плацебо №1274 (получены на основе Resomer 502Н в присутствии 1% ПВС) была проинкубирована в растворе нсРЭЧ и лиофилизована. Далее лиофилизат ресуспендировали и спектрофотометрически определяли степень связывания нсРЭЧ. Оказалось, что, во-первых, препарат хорошо ресуспендируется, то есть наличие нсРЭЧ не ухудшает агрегационную стабильность. Во-вторых, степень связывания нсРЭЧ для образцов данной серии (№1274-НСРЭЧ) составила 74,3% (среднее из двух измерений - 74,44% и 74,22%).

3.4. Получение наносомальной формы феназепама на основе полибутилцианоакрилата.

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. Показано, что наносуспензия с феназепамом остается стабильной в течение 24 часов.

Методом фотонной корреляционной спектроскопии установлено, что размеры ПБЦА НЧ с феназепамом лежат в пределах от 230 до 250 нм. Включение феназепама в НЧ составило 65 ± 8 %.

3.5. Получение наносомальной формы паклитаксела на основе ПЛГА НЧ.

Для получения НЧ с ПТХ использовали два метода: ультразвуковой гомогенизации и замены растворителя.

Процесс получения НЧ методом гомогенизации основан на кавитации. Основным преимуществом данного метода является его доступность в лабораторных условиях. К недостатку метода следует отнести неравномерность гомогенизации, что обуславливает широкое распределение частиц по размеру и трудности масштабирования методики. В ходе получения НЧ варьировали количество ПТХ, вводимого в синтез, при этом количество полимера в процессе получения НЧ сохраняли на постоянном уровне. Установлено, что чем выше исходное содержание ПТХ в реакционной смеси, тем ниже его выход и, соответственно, выше потери ПТХ в процессе синтеза НЧ. При соотношении паклитаксел/полимер 1 к 50 выход составил около 30%, повышение количества ПТХ приводило к снижению выхода до значений менее 10% (табл. 3.9). При этом при синтезе НЧ образовывался аморфный полимерный осадок, остающийся на фильтре.

В отличие от метода гомогенизации, в случае использования метода замены растворителя, органическая фаза представляет собой растворитель или систему растворителей, смешивающихся с водой, то есть для получения наносuspензии не требуется внешнего источника энергии – гомогенизатора. Как и при использовании метода гомогенизации, органический растворитель выбирают исходя из его низкой токсичности и низкой температуры кипения. В зависимости от растворимости полимера, ЛВ, используют системы растворителей на основе ацетона, этанола, изопропанола. Органическую фазу смешивают с водной, содержащей ПАВ, и, поскольку, фазы полностью

смешиваются друг с другом, образуется новая система растворителей. По мере удаления (отгонки) органического растворителя растворимость полимера снижается, и он высаживается в форме НЧ. Другие названия методики соосаждения – нанопреципитация, конденсация, замена растворителя.

Таблица 3.9.

Влияние технологических параметров получения НЧ на выход РТХ (метод гомогенизации).

Метод получения	Исходные количества компонентов				Выход РТХ, %	Потери по полимеру
	Органическая фаза			Водная фаза		
	РТХ	ПЛГА	растворитель	1% ПВС		
УЗ	2 мг	100 мг	DCM 2 г	20 мл	28,1	Есть
УЗ	5 мг	100 мг	DCM 2 г	20 мл	9,9	Есть
УЗ	10 мг	100 мг	DCM 2 г	20 мл	6,4	Есть

УЗ – ультразвуковая гомогенизация, DCM – дихлорметан, РТХ – паклитаксел, ПЛГА – сополимер молочной и гликолевой кислот

Основные параметры метода соосаждения, которые необходимо правильно подобрать, чтобы избежать неконтролируемой преципитации полимера – соотношение органической фазы к водной фазе и концентрация полимера в органической фазе. Чем ниже указанные параметры, тем более «плавно» происходит замена растворителя, тем меньше потерь полимера в ходе получения наночастиц. Используя метод соосаждения, можно получать частицы размером менее 100 нм.

Очевидно, что методика соосаждения применима только для лекарственных веществ, хорошо растворимых в полярных растворителях. Эффективность сорбции определяется исключительно взаимодействием ЛВ с полимером, в отличие, например, от метода двойного эмульгирования, при котором лекарственное вещество заключено внутри пор частиц и, в принципе, может не взаимодействовать с полимерной матрицей. Это создает определенные сложности при использовании метода соосаждения для получения наночастиц гидрофильных веществ.

В ходе получения НЧ варьировали количество ПТХ, вводимого в синтез. Как и в случае гомогенизации, выход ПТХ был тем ниже, чем выше было его исходное количество (табл. 3.10). Указанное обстоятельство обусловлено тем, что полимер может сорбировать определенное количество ЛВ, затем происходит его насыщение и, соответственно, дальнейшее повышение количества сорбируемого вещества никак не влияет на его конечный выход. Однако, в отличие от метода гомогенизации, при исходном соотношении паклитаксел/полимер 1 к 100 и ниже синтез осуществлялся практически без потерь по ПТХ. Выход ПТХ составил 99,5%. Следует также отметить, что при любом соотношении паклитаксел/полимер образовывалась гомогенная суспензия, легко проходящая через фильтр с размером пор 3 мкм, что косвенно свидетельствует об отсутствии потерь по полимеру.

Таблица 3.10.

Влияние технологических параметров получения НЧ на выход ПТХ (метод замены растворителя или соосаждения).

Метод получения	Исходные количества компонентов				Выход ПТХ, %	Потери по полимеру
	Органическая фаза			Водная фаза		
	ПТХ	ПЛГА	растворитель	1% ПВС		
НП	0.5 мг	100 мг	Ацетон 5 мл	10 мл	99.5	Нет
НП	1 мг	100 мг	Ацетон 5 мл	10 мл	91.4	Нет
НП	3 мг	100 мг	Ацетон 5 мл	10 мл	9,2	Нет
НП	10 мг	100 мг	Ацетон 5 мл	10 мл	4,7	Нет

НП – нанопреципитация (соосаждение, замена растворителя), DCM – дихлорметан, РТХ – паклитаксел, ПЛГА – сополимер молочной и гликолевой кислот

НЧ с паклитакселем, полученные методом замены растворителя, имеют размер $145,6 \pm 2,11$ нм и процент включения паклитаксела – $95,7 \pm 2,2$ %.

Заключение.

В ходе проведенных исследований были разработаны технологии получения наносомальных форм ФРН, нсРЭЧ, ФЕН и ПТХ на основе полибутилцианоакрилата и сополимера молочной и гликолевой кислоты.

Учитывая белковую природу ФРН и нсРЭЧ, в качестве методического приема использовали сорбцию указанных веществ на поверхности наночастиц-плацебо. ФЕН и ПТХ включали в полимерный матрикс частицы, поскольку данные ЛВ устойчивы в органических растворителях и условиях гомогенизации. В ходе изучения влияния различных параметров технологического процесса на свойства наносомальных форм было выявлено, что степень включения ЛВ зависит от структуры полимера, поверхностного заряда наночастицы, типа используемого стабилизатора и модифицирующего поверхность частица агента. На основании выявленных параметров разработаны подходы к конструированию наносомальных форм, обеспечивающих проникновения связанного с ними ЛВ через ГЭБ.

Для фармакологических исследований получены и охарактеризованы:

- 1) наносомальная форма ФРН на основе ПБЦА НЧ (размер частиц- $220,7 \pm 2,32$ нм; процент сорбции ФРН – $95,5 \pm 3,1$ %);
- 2) наносомальная форма нсРЭЧ на основе ПБЦА НЧ (размер частиц- $165,5 \pm 1,44$ нм; процент сорбции нсРЭЧ – $77,2 \pm 6,2$ %);
- 3) наносомальная форма нсРЭЧ на основе ПЛГА НЧ (Resomer 502 Н, стабилизатор 1% ЧСА): (размер частиц – $90,09 \pm 0,46$ нм; процент сорбции нсРЭЧ – $81,07 \pm 8,1$ %);
- 4) наносомальная форма ФЕН на основе ПБЦА НЧ (размер частиц- $230,9 \pm 3,54$ нм; процент включения ФЕН – $65,5 \pm 7,3$ %);
- 5) наносомальная форма ПТХ на основе ПЛГА НЧ (Resomer 502 Н, стабилизатор 1% ПВС): (размер частиц – $145,6 \pm 2,11$ нм; процент включения ПТХ – $95,7 \pm 2,2$ %);

Глава 4. Исследование наносомальной формы фактора роста нервов.

4.1. Количественное определение ФРН в тканях мозга мышей C57Bl/6.

С целью изучения возможности проникновения ФРН в мозг при системном введении определяли содержание ФРН в тканях мозга мышей линии C57Bl/6 через 15 мин, 45 мин, 90 мин и 24 часа после внутривенного введения ФРН (0,25 мг/кг) в различных сочетаниях.

Через 15 мин после введения тестируемых форм не наблюдалось достоверной разницы в содержании ФРН в тканях мозга мышей опытных и контрольной групп. В контрольной группе мышей, получавших внутривенно 0,9 % раствор натрия хлорида, отмечались значения концентрации ФРН соизмеримые с фоновой (эндогенной) концентрацией ФРН (490 ± 26 пг/мг).

Через 45 минут после введения тестируемых форм отмечали значительное повышение (примерно в 6 раз) уровня ФРН у мышей, получавших ФРН ПБЦА ПС 80, по сравнению с группой контроля (3110 ± 170 пг/мг относительно 550 ± 66 пг/мг). В группах мышей, получавших ФРН, ФРН в растворе ПС 80 и ФРН ПБЦА наблюдалась тенденция к повышению уровню ФРН (рис. 4.1).

Через 90 минут после введения тестируемых форм сохранялась та же тенденция, что и на 45 минуте. Сохранялись статистически достоверные отличия между группой животных, получавших ФРН ПБЦА ПС 80 и контрольной группой. Однако, уровень ФРН был существенно ниже, чем на 45 минуте (1090 ± 80 пг/мг относительно 3110 ± 170 пг/мг). При этом, статистически достоверной разницы между остальными группами не наблюдали (рис.4.1).

При измерении концентрации ФРН в тканях мозга через 24 часа после введения тестируемых форм, также отмечали достоверное повышение уровня ФРН у мышей в группе, получавших ФРН ПБЦА ПС 80, по сравнению с

группой контроля. Однако, концентрация снизилась в 3,5 раза по сравнению с содержанием ФРН на 45 минуте (890 ± 40 пг/мг относительно 3110 ± 170 пг/мг). Статистически достоверной разницы между остальными группами также не наблюдали (рис.4.1).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о способности ПБЦА НЧ с модифицированной ПС 80 поверхностью обеспечивать транспорт ФРН через ГЭБ при внутривенном введении.

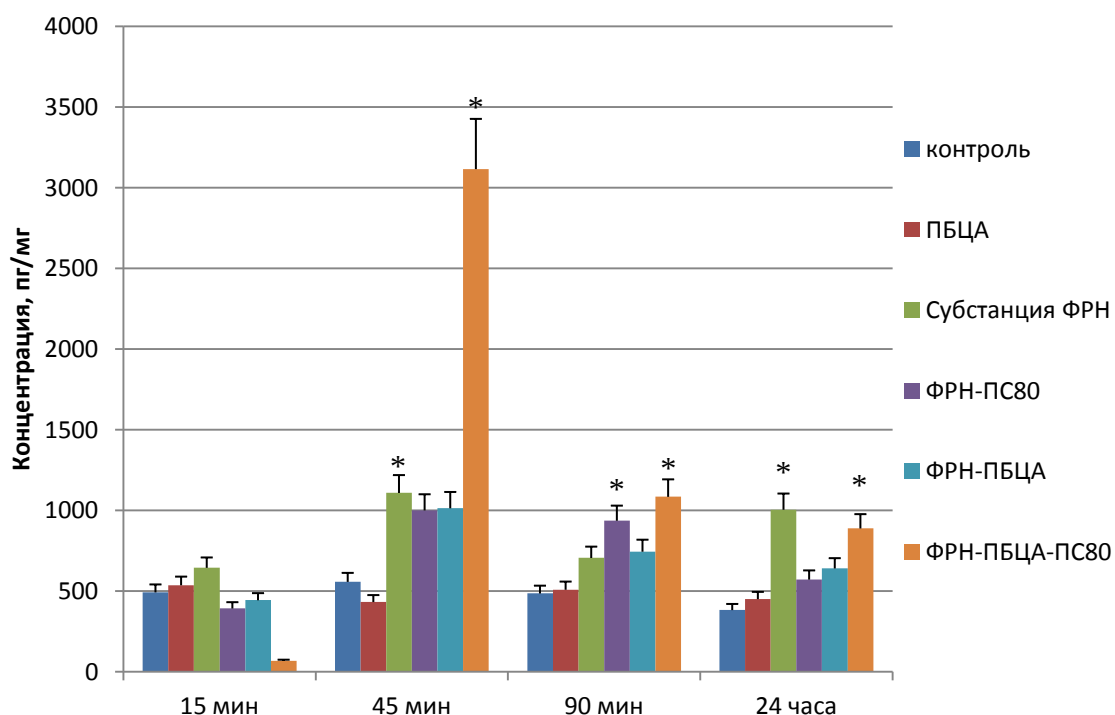


Рис. 4.1. Концентрации ФРН в гомогенатах тканей мозга мышей C57Bl/6 в различные промежутки времени после внутривенного введения ФРН (0,25 мг/кг) в тестируемых формах.

* - ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от контрольной группы.

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

Антиамнестическое действие наносомальной формы ФРН было изучено на модели краткосрочной (острой) амнезии, вызванной подкожным введением скополамина крысам. Использовали методику выработки УРПИ в

одном сочетании, регистрируя латентный период входа крыс в затемненную камеру. Обучение животных УРПИ проводили через 30 мин после введения скополамина и тестируемых форм. Воспроизведение УРПИ осуществляли через 24 часа после введения тестируемых форм. У животных с ненарушенной памятью отмечали увеличение ЛП входа в затемненную камеру (стремясь избежать болевого раздражения, животные неохотно входят в затемненную камеру). О развитии амнестического эффекта судили по отсутствию увеличения ЛП. Животное, не вошедшее в затемненную камеру в течение 180 с, считали обученным УРПИ.

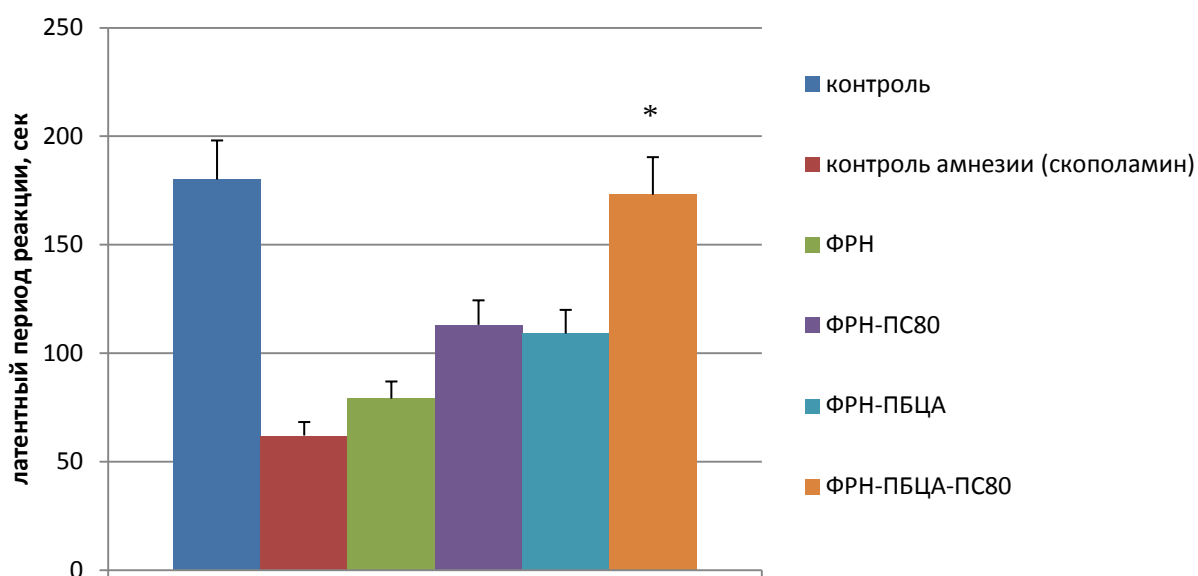


Рис. 4.2. Влияние ФРН в тестируемых формах на латентный период УРПИ у крыс. * - статистически достоверное отличие от группы контроля амнезии ($p \leq 0.05$)

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. 4.2). На фоне введения водного 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.

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.

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

Введение МФТП экспериментальным животным приводит к избирательному повреждению дофаминергических нейронов черной субстанции и возникновению олигокинезии, ригидности, тремора и ряд вегетативных нарушений [Воронина Т.А., 2005]. Через 2-3 минуты после внутрибрюшинного введения МФТП у мышей возникают локомоторные и двигательные нарушения, проявляющиеся мелкоамплитудным или среднеамплитудным генерализованным тремором, сохраняющимся на протяжении 30-50 минут; спустя 3-5 минут появляется пилоэрекция, затем ретро- и/или латеропульсия; примерно через 15-20 минут начинают проявляться признаки ригидности в виде нарушения походки, уменьшении длины шага, напряжении передних и задних конечностей, появлении «горба» у мышей. Постепенно развиваясь, олигокинезия достигает пика через 1,5 часа. Наблюдаются стереотипия, ротационные движения, неустойчивость походки, периоды фризинга (замирания). После однократного введения МФТП на 7 и 21 день у мышей также сохраняются ригидность и олигокинезия, однако их выраженность существенно ниже (рис. 4.3).

Таким образом, однократное введение нейротоксина МФТП мышам C57Bl/6 запускает каскад экстрапирамидных нарушений, различающихся по

времени возникновения и степени выраженности. Так, олигокинезия появляется через 90 мин, сохраняется 24 часа, затем к 7 и особенно к 21 дню выраженность олигокинезии снижается, тогда как ригидность наблюдается сразу после введения и сохраняется в течение 21 дня.

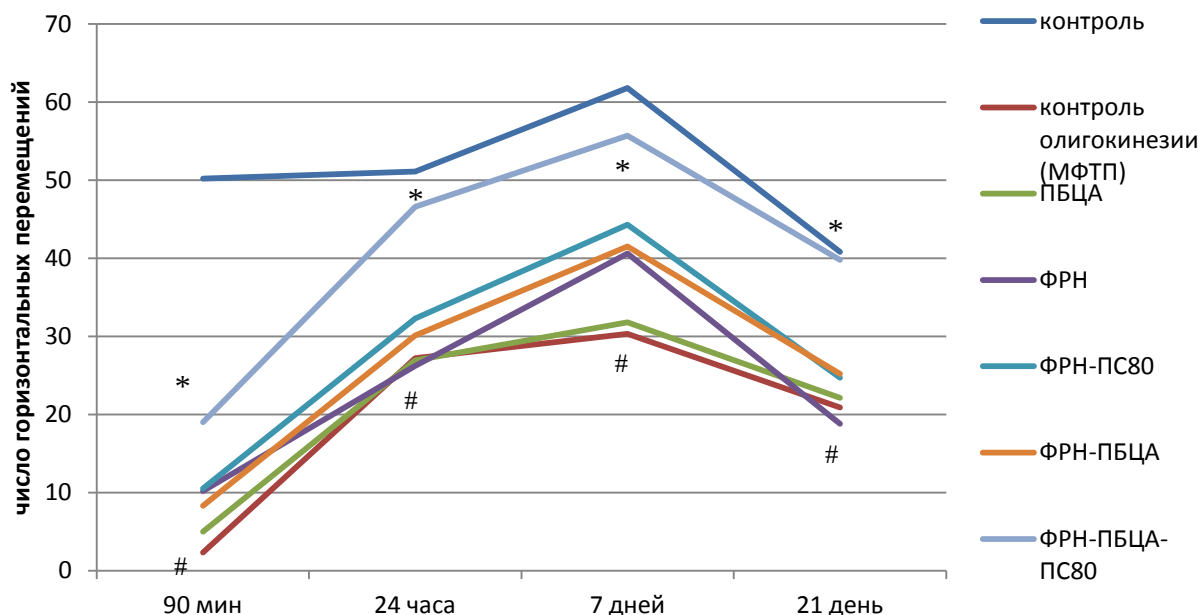


Рис. 4.3. Влияние ФРН в тестируемых формах на олигокинезию в тесте «открытое поле».

- ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от группы пассивного контроля;

* - ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от группы контроля олигокинезии (МФТП);

Субстанция ФРН, ФРН ПБЦА, ФРН ПС80 и ПБЦА НЧ при внутривенном введении мышам линии C57Bl/6 после МФТП не вызывают достоверного увеличения двигательной активности в тесте «открытое поле» (рис. 4.3). Сходные результаты получены при исследовании этих веществ на двигательную активность в актометре.

ФРН-ПБЦА-ПС 80 (0,25 мг/кг, в/в), после введения МФТП существенно повышает двигательную активность мышей. Так, через 90 мин после введения ФРН-ПБЦА-ПС 80 вертикальная активность увеличилась в 8,5 раза, а горизонтальная активность - в 8,3 раза. Значительное повышение (примерно в 2 раза) двигательной активности в открытом поле (рис. 4.3) и в

актометре наносомальная форма ФРН, модифицированная ПС 80, вызывает через 24 часа, на 7 и 21 сутки после моделирования ПС.

Через 10 мин после однократного введения МФТП у мышей С57Вl/6 возникает тремор (3 балла) головы и всего тела. Наносомальная форма ФРН, модифицированная ПС 80, через 90 мин и сутки после введения уменьшает % животных с тремором примерно в 2 раза, тогда как через 7 дней этот показатель возрастает более чем в 10 раз по сравнению с активным контролем (МФТП) (рис. 4.4). Субстанция ФРН, ФРН-ПБЦА, ФРН+ПС 80 и ПБЦА достоверно не изменяют выраженность тремора, вызванного МФТП.

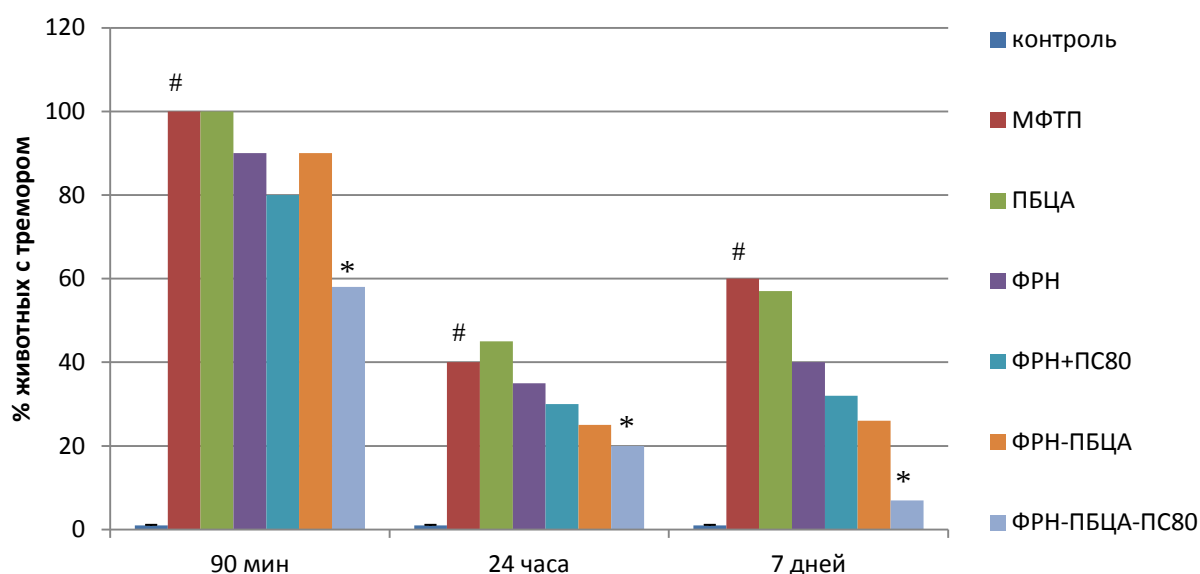


Рисунок 4.4. Влияние ФРН в тестируемых формах на тремор, вызванный МФТП.

- ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от группы контроля;

* - ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от группы МФТП;

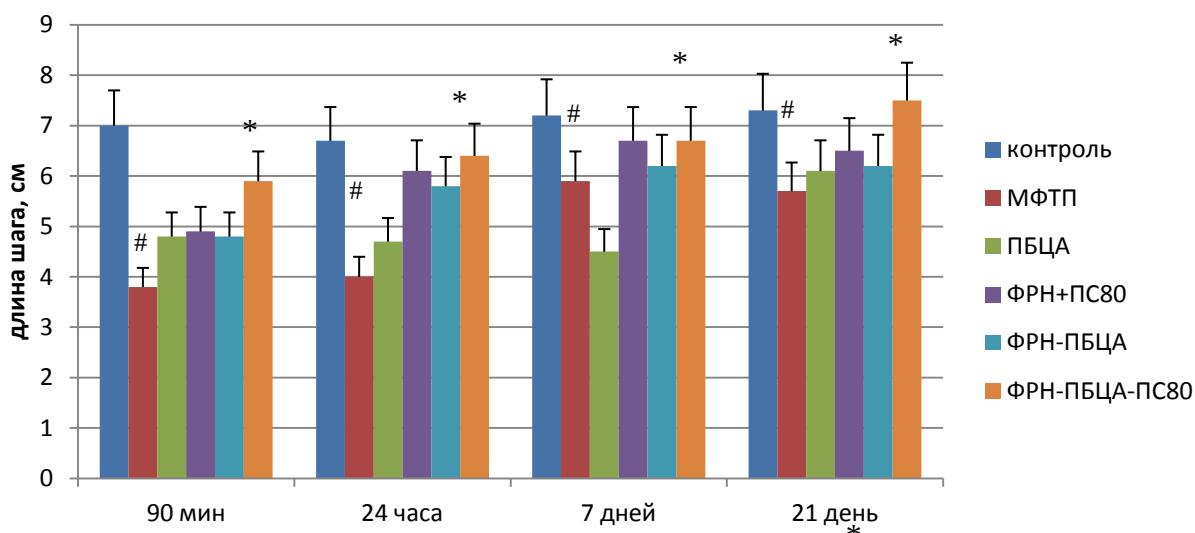


Рисунок 4.5. Влияние ФРН в тестируемых формах на ригидность, вызванную МФТП.

- ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от группы контроля;

* - ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от группы МФТП;

При однократном введении МФТП у мышей C57Bl/6 возникает выраженная ригидность, которая характеризуется скованностью движений и достоверным укорочением длины шага. Субстанция ФРН, ФРН-ПБЦА, ФРН+ПС 80 и ПБЦА достоверно не изменяют показатели ригидности, вызванные МФТП, у мышей C57Bl/6 (рис. 4.5). ФРН-ПБЦА-ПС 80, введённый в/в после МФТП, снижает олигокинезию 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.

Заключение.

В проведенном исследовании показана принципиальная возможность применения ПБЦА НЧ для транспорта ФРН через ГЭБ. Способность наночастиц доставлять в мозг терапевтически значимые концентрации ФРН подтверждена как иммуноферментным методом, так и при экспериментальном моделировании нейродегенеративных процессов.

Антиамнестический эффект ФРН, полученный на модели острой амнезии, вызванный однократным введением скополамина, возможно обусловлен его стимулирующим влиянием на высвобождение ацетилхолина из пресинаптических мембран центральных холинергических синапсов. Вследствие этого увеличивается концентрация ацетилхолина в синаптической щели, что ведет к конкурентному вытеснению скополамина из связи с центральными М-холинорецепторами. Необходимо отметить, что ФРН стимулирует деление и рост, а также способствует выживанию холинергических нейронов ЦНС. Кроме того, имеются данные, подтверждающие участие нейротрофических факторов в модуляции дофаминергической передачи в мозге и способность ФРН препятствовать гибели дофаминергических нейронов. Установлено также, что ФРН усиливает высвобождение дофамина *in vitro*. Значительное увеличение содержания дофамина показано также в стриатуме мышей с паркинсоническим синдромом, вызванном МФТП, которым в головной мозг вводили ФРН [Fernandez S.M., 2004]. Таким образом, можно предположить, что противопаркинсонический эффект ФРН, выявленный в нашем исследовании, обусловлен модулирующим влиянием вещества на дофаминергическую систему мозга.

Учитывая вышеизложенное, применение наносомальной формы ФРН можно рассматривать как потенциальное перспективное направление медикаментозной коррекции заболеваний, обусловленных дегенерацией центральных холинергических и дофаминергических нейронов.

Глава 5. Исследование наносомальной формы низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека.

В экспериментальных исследованиях показана высокая нейропротекторная активность РЭЧ при геморрагическом инсульте [Seyfried D. M., 2009], ишемическом инсульте как при фокальной, так и тотальной формах ишемии [Villa P., 2007], травмах головного мозга. Однако нейропротекторное действие РЭЧ проявляется только в высоких дозах [Ehrenreich H., 2009], вызывающих ряд существенных побочных эффектов в виде стимуляции антителообразования и кроветворения.

Учитывая вышеизложенное, целью настоящего раздела работы явилось изучение возможности транспорта нсРЭЧ в составе полимерных НЧ через ГЭБ и оценка нейропротекторной активности наносомальной формы нсРЭЧ.

5.1. Определение концентрации нсРЭЧ в тканях мозга нелинейных мышей.

Концентрацию нсРЭЧ в гомогенатах-лизатах ткани головного мозга мышей определяли методом иммуноферментного анализа.

В результате измерения концентрации нсРЭЧ в образцах тканей мозга экспериментальных животных, взятых на 45 минуте после введения тестируемых веществ и комбинаций, отметили статистически достоверное увеличение уровня нсРЭЧ в ЦНС мышей, получавших нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80, в сравнении с группой контроля (группа животных, получавших 0,9% раствор натрия хлорида) (рис. 5.1). В группе животных, получавших ПБЦА-НЧ плацебо, увеличения концентрации нсРЭЧ по сравнению с контрольной группой не наблюдали. В группе животных, получавших водный раствор нсРЭЧ, статистически значимого увеличения уровня нсРЭЧ в ЦНС экспериментальных животных не отмечали (рис. 5.1).

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+ПС80 увеличивали концентрацию нсРЭЧ в головном мозге, однако достоверности различий значений концентрации по сравнению с контрольной группой не установлено.

Таблица 5.1.

Концентрации нсРЭЧ в гомогенатах мозга экспериментальных животных после внутривенного введения нсРЭЧ в разных тестируемых формах.

Группы животных Вещества и комбинации, вводимые животным	Концентрация нсРЭЧ, нг/мл
Контроль (0.9% раствор натрия хлорида)	0,90±0.02
1% суспензия ПБЦА-НЧ	0,87±0,04
Раствор нсРЭЧ	1,87±0.25
нсРЭЧ +ПС80	2,17±0,31
нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80	6,41±0.78*

* - ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от группы контроля;

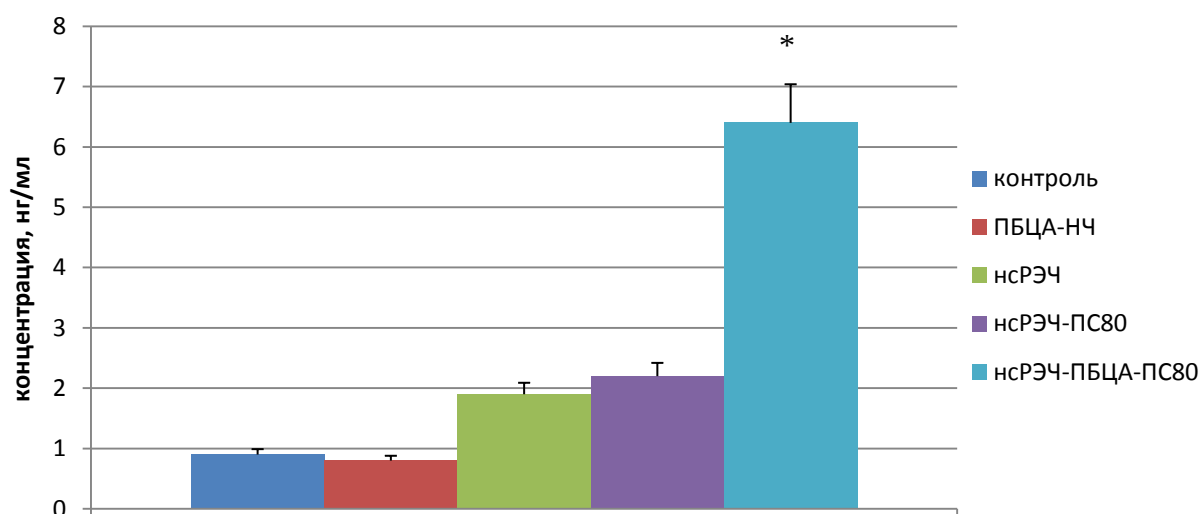


Рис. 5.1. Концентрация нсРЭЧ в гомогенатах мозга экспериментальных животных на 45 минуте после внутривенного введения нсРЭЧ в различных сочетаниях.

* - ($p \leq 0.05$) - статистически достоверное отличие от группы контроля.

5.2. Исследование влияния наносомальной формы нсРЭЧ на экспрессию генов нейротрофических факторов NGF и BDNF.

Согласно исследованиям ряда авторов [Viviani B., 2005; Mennini T., 2006; Fumagalli F., 2008] одним из механизмов протекторного действия нсРЭЧ является активация генов нейротрофинов, а именно NGF (nerve growth factor) и BDNF (brain-derived neurotrophic factor). В настоящем исследовании показано, что нсРЭЧ-ПБЦА способен преодолевать ГЭБ и оказывать нейропротекторное действие, однако для подтверждения «нейротрофиновой» теории механизма действия РЭЧ было проведено исследование влияния наносомальных форм нсРЭЧ на экспрессию генов нейротрофинов у крыс. Поддержание жизнеспособности нейронов является BDNF-зависимым процессом, осуществляемым нейроглиальными клетками. Можно предположить, что увеличение экспрессии BDNF и NGF под действием нсРЭЧ является одним из основных молекулярных механизмов его нейропротекторного действия.

Исследование влияния наносомальной формы нсРЭЧ на экспрессию генов нейротрофических факторов NGF и BDNF в эксперименте in vitro.

Методом количественной ОТ-ПЦР в реальном времени (полимеразная цепная реакция продуктов обратной транскрипции) протестирована способность нативного нсРЭЧ влиять на экспрессию мРНК BDNF и NGF в культивируемых астроцитах коры больших полушарий мозга крысы.

Показано, что при введении в культуральную среду нативного нсРЭЧ в концентрации 3 нМ обнаружено существенное повышение экспрессии (в 2-4 раза по сравнению с контролем) мРНК как BDNF, так и NGF. При этом, увеличение экспрессии мРНК нейротрофинов является длительным и наблюдается как через 1, так и через 4 ч после введения в культуру нсРЭЧ (рис. 5.2).

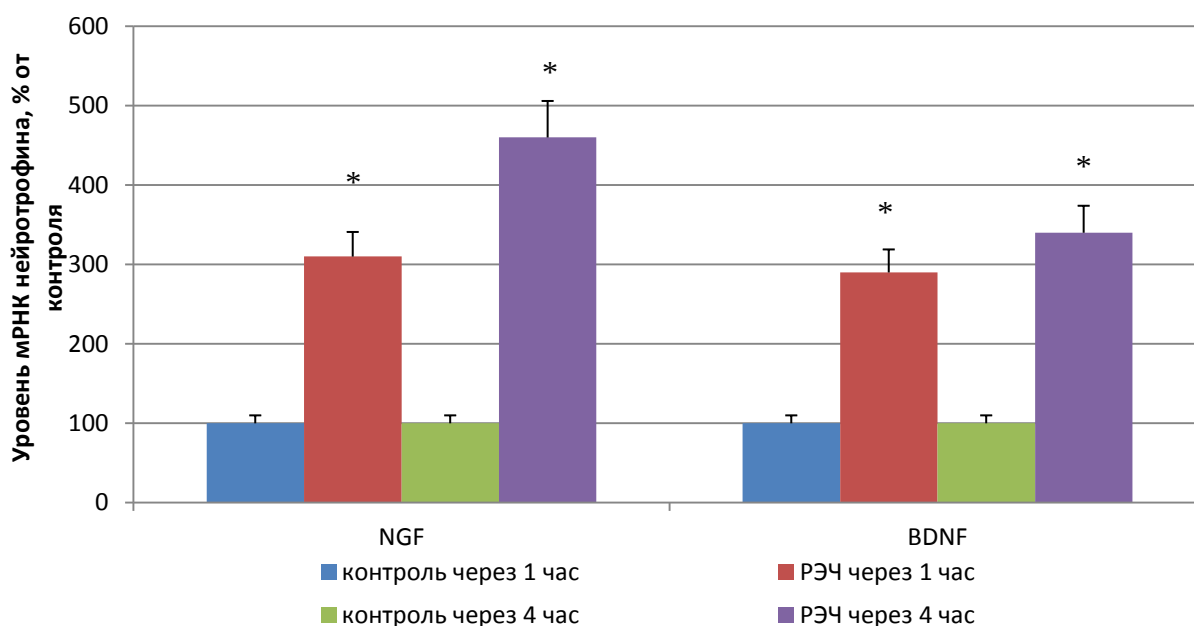


Рис. 5.2. Влияние нативного нсРЭЧ в концентрации 3 нМ на экспрессию мРНК нейротрофических факторов BDNF и NGF в культивируемых клетках астроцитов коры больших полушарий мозга крысы при инкубации в течение 1 и 3 часов.

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы контроля;

Исследование влияния наносомальной формы нсРЭЧ на экспрессию генов нейротрофических факторов NGF и BDNF в эксперименте in vivo.

В данном разделе исследования методом ОТ-ПЦР оценивали способность нсРЭЧ и нсРЭЧ, включенного в ПБЦА наночастицы, влиять на экспрессию мРНК BDNF и NGF в фронтальной коре и гиппокампе крыс.

Установлено, что нсРЭЧ, включенный в ПБЦА НЧ в дозе 0,05 мг/кг через 1 час после внутривенного введения вызывает статистически достоверное повышение мРНК BDNF и мРНК NGF в гомогенатах тканей фронтальной коры у крыс в 3,5 и 1,9 раза соответственно (рис. 5.3, I). В гиппокампе под влиянием нсРЭЧ на ПБЦА НЧ уровень мРНК BDNF повышался в 2,3 раза по сравнению с контролем, а уровень мРНК NGF – в 3,1 раза ($p \leq 0.05$) (рис. 5.3, II). В гиппокампе, имеющем особое значение при нейродегенеративных заболеваниях, только при введении нсРЭЧ-ПБЦА

отмечено значительное увеличение экспрессии как BDNF, так и NGF (рис. 5.3).

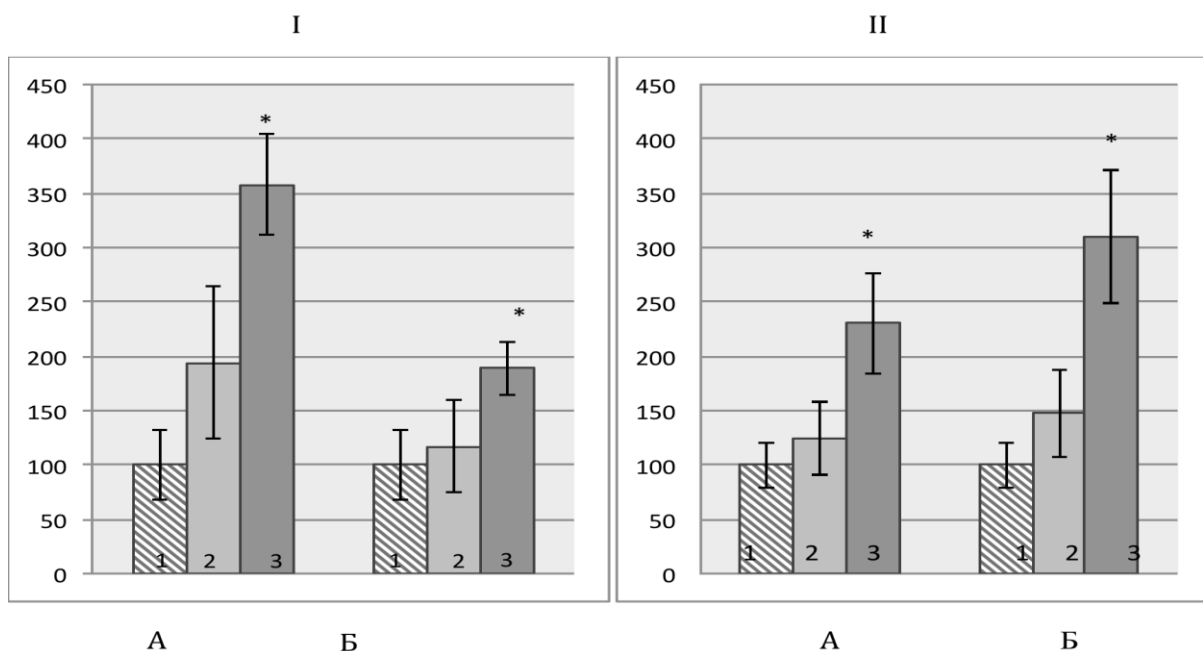


Рис. 5.3. Влияние нсРЭЧ и нсРЭЧ в составе наносомальной формы на экспрессию мРНК BDNF (А) и NGF (Б) во фронтальной коре (I) и гиппокампе крыс (II) через 1 час после внутривенного введения.

По горизонтали: 1- 0,9 % раствор натрия хлорида; 2- Раствор нсРЭЧ (0,05 мг/кг); 3- нсРЭЧ (0,05 мг/кг) в составе наносомальной формы. По вертикали: уровень мРНК нейротрофина, % от контроля.

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы контроля (t-критерий Стьюдента).

5.3. Исследование нейропротекторных свойств наносомальной формы нсРЭЧ на ПБЦА НЧ на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ) у крыс.

Моделирование локального кровоизлияния в головном мозге у крыс проводилось согласно процедуре, описанной в разделе «материалы и методы». Исследование проводили согласно представленной ниже схемы.

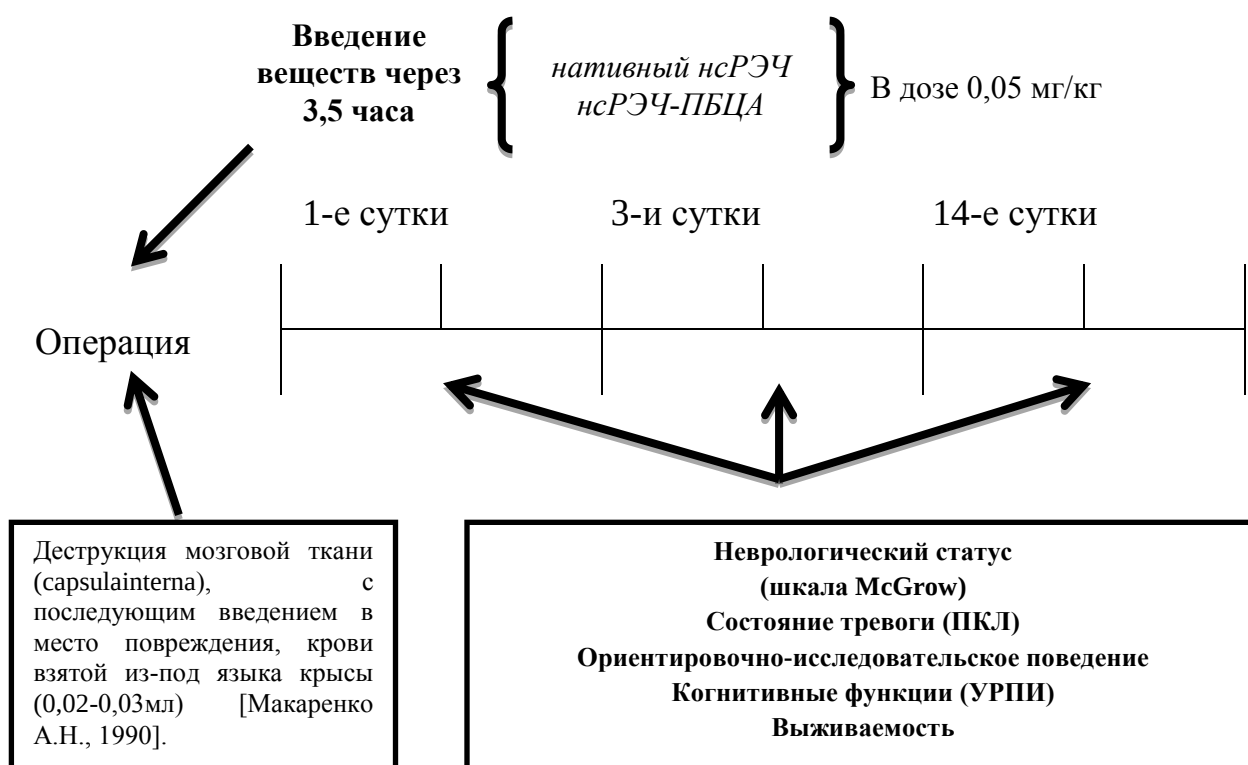


Рис. 5.4. Схема эксперимента по изучению нейропротекторных эффектов наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПБЦА НЧ у крыс с ИПГ.

Исследование неврологического дефицита и гибели крыс с ИПГ.

Установлено, что в группе ложнооперированных крыс количество животных с легкими неврологическими нарушениями (вялость движений, слабость конечностей, односторонний полуптоз, тремор) составляло от 12,5 до 25% в течение всего времени наблюдения. нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 оказывал значительное протекторное действие у крыс с ИПГ, уменьшая количество животных с неврологическими нарушениями примерно в 2 раза (табл. 5.2).

При регистрации тяжелых неврологических нарушений установлено, что у ложноожноперированных животных этих проявлений не наблюдалось. В группе крыс с ИПГ парезы, манежные движения, параличи развивались у 20-40% крыс (табл. 5.2). нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 в значительной степени (в 2 раза) ослаблял тяжелые проявления неврологических нарушений у крыс с ИПГ.

Таким образом, наносомальная форма нсРЭЧ на ПБЦА НЧ оказывала защитный эффект при регистрации неврологических дефицитов у крыс после

геморрагического инсульта, уменьшая количество животных как с легкими, так и с тяжелыми нарушениями.

Таблица 5.2.

Влияние нсРЭЧ на развитие неврологического дефицита и гибель крыс с ИПГ.

Группа крыс	<i>время после операции, сутки</i>					
	1-е		7-е		14-е	
	абс.по к.	отн.по к.	абс.пок.	отн.пок.	абс.пок.	отн.пок.
Количество животных с легкими нарушениями, %						
ЛО	1 /20	5	3/ 20	15	2/20	10
ИПГ	10/ 20	50	5/ 13	39	1/ 6	17
ИПГ+нсРЭЧ	4 /10	40	5/ 9	55	3 /7	43
ИПГ+нсРЭЧ-ПБЦА- ПС80	3/ 11	27	3/ 10	30	1 /9	11
Количество животных с тяжелыми нарушениями, %						
ЛО	0 /20	0	0/20	0	0/20	0
ИПГ	5 /20	25	8/ 13	62	5 /6	83
ИПГ+нсРЭЧ	1/ 10	10	2/ 9	22	3/ 7	43
ИПГ+нсРЭЧ-ПБЦА- ПС80	1/ 11	9	1/ 10	10*	2 /9	22*
Выживаемость, %						
ЛО	20 / 20	100	20/ 20	100	20/ 20	100
ИПГ	16 /20	80	13 / 20	65	6 / 20	30
ИПГ+нсРЭЧ	10 / 11	91	9 / 11	82	7 / 11	64
ИПГ+нсРЭЧ-ПБЦА- ПС80	11 / 12	92	10/ 12	83	9 / 12	75*

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы контроля.

Динамика выживания крыс с ИПГ.

Изучение динамики выживания крыс показало, что к 14-му дню наблюдения все ЛО крысы выжили, а в группе крыс с ИПГ выжило только 30% животных (табл. 5.2). На фоне повторного 3-х дневного введения нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 (0,05 мг/кг) к концу эксперимента выжило 75% крыс, что на 45% больше, чем в контрольной группе с ИПГ (табл. 5.2). Полученные данные по выживаемости животных свидетельствуют о выраженном протекторном действии наносомальной формы нсРЭЧ.

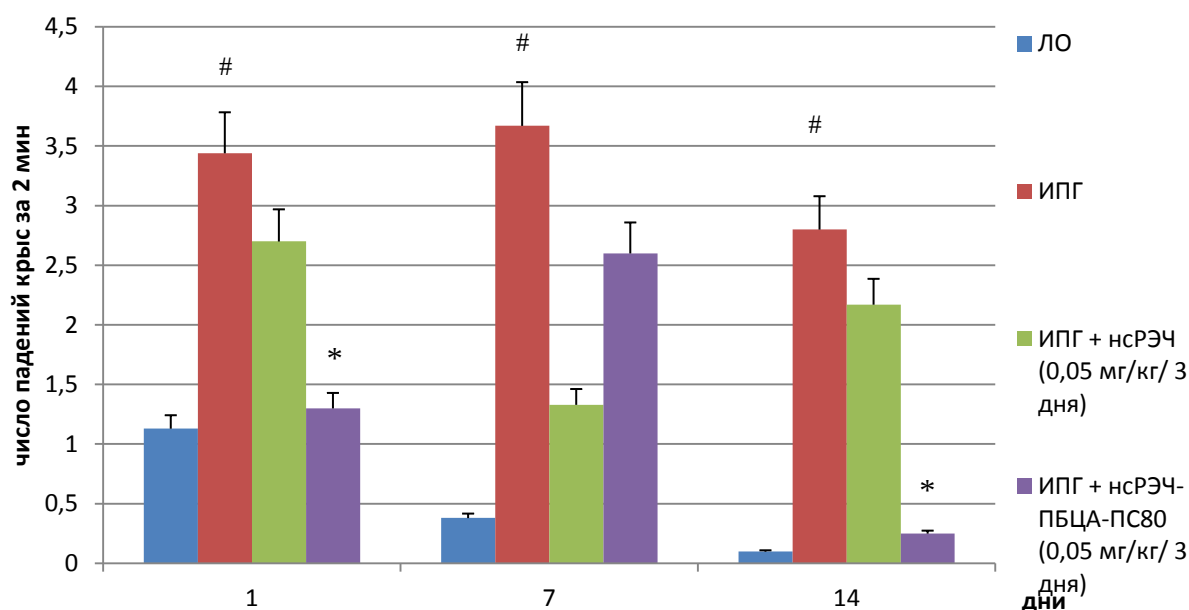


Рис. 5.5. Влияние нсРЭЧ на координацию движений крыс с ИПГ в тесте «вращающийся стержень».

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО;

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ГИ;

Влияние нсРЭЧ на координацию движений животных в тесте «вращающийся стержень».

Установлено, что у крыс с ИПГ по сравнению с ложнооперированными животными наблюдается значительное ухудшение координации движений, что проявляется статистически достоверным увеличением количества падений крыс с вращающегося стержня при регистрации в течение 2-х минут (рис. 5.5). На фоне повторного(3-х кратного) введения нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 у крыс отмечалось статистически достоверно уменьшение количества падений, особенно на 14-й день наблюдения.

Влияние нсРЭЧ на ориентировочно-исследовательское поведение крыс с ИПГ в открытом поле.

Установлено, что у крыс с ИПГ по сравнению с ЛО животными в первый день после операции наблюдается статистически достоверное снижение всех показателей поведения в открытом поле: горизонтальной и вертикальной активности, числа обследований отверстий и, особенно, снижение суммарных показателей двигательной активности (табл. 5.3).

Таблица 5.3.

Влияние нсРЭЧ на ориентировочно-исследовательское поведение крыс с ИПГ в открытом поле.

Группа животных	Горизонтальная двигательная активность	Вертикальная двигательная активность	Обследование отверстий	Груминг	Кол-во болюсов	Суммарная двигательная активность
1-е сутки						
ЛО	38,00 ± 5,87	8,63 ± 1,83	8,63 ± 1,42	1,75 ± 0,94	0,88 ± 0,65	46,63 ± 7,03
ИПГ	20,33 ± 5,24 #	3,11 ± 0,53 #	3,33 ± 0,77 #	2,00 ± 0,49	0,00 ± 0,00	23,44 ± 4,58 #
ИПГ + нсРЭЧ	20,10 ± 5,02	4,00 ± 1,33	5,20 ± 1,20	1,30 ± 0,33	0,40 ± 0,36	24,10 ± 4,36
ИПГ + нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80	35,00 ± 3,68 *	7,73 ± 1,46 *	7,64 ± 1,32 *	1,82 ± 0,46	1,55 ± 0,50 *	42,73 ± 4,53 *
7-е сутки						
ЛО	15,63 ± 3,28	2,00 ± 0,82	2,75 ± 0,49	0,38 ± 0,23	0,13 ± 0,11	17,63 ± 3,60
ИПГ	29,33 ± 9,41	2,78 ± 1,05	3,44 ± 0,93	1,22 ± 0,66	0,11 ± 0,10	32,11 ± 9,27
ИПГ + нсРЭЧ	42,00 ± 16,01	2,00 ± 0,67	3,33 ± 0,63	1,78 ± 0,33	0,22 ± 0,20	39,60 ± 14,97
ИПГ + нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80	20,70 ± 4,23	2,80 ± 0,95	4,20 ± 1,14	1,00 ± 0,23	1,90 ± 0,56 *	23,50 ± 4,91
14-е сутки						
ЛО	13,50 ± 2,90	1,13 ± 0,42	2,00 ± 0,60	0,00 ± 0,00	1,13 ± 0,35	14,63 ± 3,03
ИПГ	15,40 ± 5,27	1,20 ± 0,60	3,60 ± 1,76	0,00 ± 0,00	0,40 ± 0,33	16,60 ± 4,96
ИПГ + нсРЭЧ	24,86 ± 6,59	2,43 ± 0,82	3,00 ± 1,51	2,29 ± 0,67	0,86 ± 0,61	26,00 ± 7,75
ИПГ + нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80	27,13 ± 3,68	6,63 ± 0,96 *	6,25 ± 0,66	0,88 ± 0,35	2,63 ± 0,69 *	33,75 ± 3,99 *

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО;

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ИПГ.

нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 полностью нормализовал поведение крыс с ИПГ, восстанавливая все показатели поведения до уровня величин ЛО животных. На 14-е сутки наблюдения у ЛО крыс наблюдалась естественная для этого теста адаптация к условиям эксперимента, так называемое негативное обучение и регистрировалось снижение двигательной активности по сравнению с первой посадкой (1-е сутки). Иные закономерности наблюдались в группе крыс с ИПГ: снижение всех показателей активности в первый день регистрации, значительная активация на 7-е сутки и нормализация поведения в открытом поле к 14-м суткам наблюдения (табл. 5.3). нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 корректировал поведение крыс с ИПГ в открытом

поле в 1-е и 7-е сутки после операции. Нативный нсРЭЧ практически не оказывал влияния на поведение крыс с ИПГ в открытом поле на протяжении всего времени наблюдения. Таким образом, в отличие от нативного нсРЭЧ, нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80, обладал способностью оптимизировать поведение крыс с ИПГ в условиях методики открытого поля.

Влияние нсРЭЧ на поведение животных с ИПГ в условиях приподнятого крестообразного лабиринта.

Исследование уровня тревожности крыс в условиях методики ПКЛ показало, что в отличие от ЛО животных у крыс с ИПГ в 1-е и 14-е сутки после операции отмечалось значительное снижение времени нахождения на незащищенных открытых рукавах лабиринта (табл. 5.4).

Таблица 5.4.

Влияние нсРЭЧ на поведение животных с ИПГ в условиях приподнятого крестообразного лабиринта.

Группы животных	Лат. время (с)	Время провед. на центр. площадке (с)	Кол-во заходов в закрытые рукава	Кол-во заходов в открытые рукава	Время провед. в закрытых рукавах (с)	Время провед. в открытых рукавах (с)	Общее число переходов
1-е сутки							
ЛО	0,00 ± 0,00	16,63 ± 6,68	1,63 ± 0,43	1,63 ± 0,47	228,86 ± 36,66	52,14 ± 19,37	3,25 ± 0,68
ИПГ	1,89 ± 0,91	5,33 ± 3,10	1,11 ± 0,25	0,67 ± 0,31	288,33 ± 3,06	4,44 ± 2,41#	1,78 ± 0,31
ИПГ + нсРЭЧ	12,20 ± 7,08	59,50 ± 28,86	2,10 ± 0,70	1,40 ± 0,51	203,89 ± 36,31	19,22 ± 7,95*	3,50 ± 1,09
ИПГ + нсРЭЧ-ПБЦА-ПС 80	0,91 ± 0,87	8,18 ± 3,10	3,45 ± 1,24	3,00 ± 1,06	257,27 ± 18,31	33,64 ± 16,09	6,45 ± 2,07*
14-е сутки							
ЛО	0,63 ± 0,58	2,50 ± 2,34	4,00 ± 1,57	2,13 ± 0,76	275,00 ± 12,12	21,43 ± 10,80	6,13 ± 2,22
ИПГ	0,60 ± 0,54	4,00 ± 2,61	2,20 ± 0,52	2,20 ± 0,18	281,40 ± 4,51	14,00 ± 2,97	4,40 ± 0,54
ИПГ + нсРЭЧ	10,00 ± 8,51	5,71 ± 2,35	3,71 ± 1,06	3,86 ± 1,06	244,29 ± 11,80	38,33 ± 14,75	5,29 ± 1,37
ИПГ + нсРЭЧ-ПБЦА-ПС 80	0,63 ± 0,58	3,13 ± 1,96	4,25 ± 1,17	2,50 ± 0,47	286,50 ± 3,76	9,75 ± 2,51	6,75 ± 1,48

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО;

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ИПГ.

Подобное поведение свидетельствует о повышенной тревожности у крыс с ИПГ. В 1-е сутки наблюдения нативный нсРЭЧ и его наносомальная форма корректировали нарушенное у крыс с ИПГ поведение в ПКЛ,

увеличивая время, проведенное животными в открытых незащищенных рукавах лабиринта (табл. 5.4). На 14-е сутки наблюдения в группах крыс, получавших нсРЭЧ и его наносомальную форму, не было выявлено существенных различий в поведении между ложнооперированными крысами и крысами с ИПГ.

Таким образом, нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 почти полностью корректировал, а нативный РЭЧ умеренно снижал повышенную тревожность крыс с ИПГ в условиях методики ПКЛ.

Влияние нсРЭЧ на обучение УРПИ крыс с ИПГ.

Обучение животных УРПИ проводили через сутки после операции, а воспроизведение - через 6 часов, на 7-е и 14-е сутки после обучения. Изучение влияния веществ на обучение УРПИ показало, что животные во всех пяти группах обучились условному рефлексу, т.к. при его воспроизведении через 6 часов после обучения 100% животных помнили об ударе током в темной камере и не заходили туда в течение всего времени наблюдения (табл. 5.5).

Таблица 5.5.

Влияние нсРЭЧ на обучение УРПИ крыс с ИПГ.

Группа животных	Обучение	Воспроизведение рефлекса	
	Латентное время рефлекса (с)	Латентное время рефлекса (с)	Кол-во крыс не зашедших в темную камеру, %
1-е сутки			
ЛО	29,63 ± 20,14	180,00 ± 0,00	100
ИПГ	73,89 ± 25,49	180,00 ± 0,00	100
ИПГ + нсРЭЧ	75,30 ± 22,97	180,00 ± 0,00	100
ИПГ + нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80	29,64 ± 15,15	180,00 ± 0,00	100
7-е сутки			
ЛО		180,00 ± 0,00	100
ИПГ		108,63 ± 25,85 #	50#
ИПГ + нсРЭЧ		180,00 ± 0,00	55
ИПГ + нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80		139,70 ± 19,57	70
14-е сутки			
ЛО		159,38 ± 19,29	87,5
ИПГ		98,00 ± 30,52	40#
ИПГ + нсРЭЧ		120,00 ± 26,78	57
ИПГ + нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80		126,25 ± 24,79	62,5

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО;

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ИПГ.

При воспроизведении УРПИ через 7 дней после обучения в группе ложнооперированных животных все 100% крыс помнили о ситуации и не заходили в темную камеру, где получили обучающий удар током, а в контрольной группе крыс с ИПГ только 50% животных осуществляли рефлекс пассивного избегания. Сходные результаты были получены на 14-е сутки: в группе ложнооперированных животных 87% крыс осуществляли рефлекс и только 40% - в группе животных с ИПГ (табл.5.5). Полученные результаты свидетельствуют о развитии у крыс с ИПГ нарушений памяти.

нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 предупреждали развитие амнезии УРПИ у крыс с ИПГ, увеличивая количество животных, осуществляющих рефлекс до 70%. Нативный нсРЭЧ не обладал защитным эффектом.

Таким образом, у крыс с ИПГ, обученных УРПИ при его воспроизведении на 7-е и 14-е сутки после обучения, наблюдалось ослабление памятного следа, а у 50-60% животных наблюдалось развитие амнезии. нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80 в значительной степени ослабляли нарушения памяти, вызванные ИПГ, существенно увеличивая количество животных осуществляющих УРПИ.

В результате проведенных исследований установлено, что наносомальная форма нсРЭЧ на основе ПБЦА НЧ оказывает протекторный эффект у крыс после геморрагического инсульта, уменьшая количество животных как с легкими, так и с тяжелыми неврологическими нарушениями, улучшает координацию движений в тесте вращающегося стержня, повышает выживаемость животных после перенесенного геморрагического инсульта. Наносомальная форма нсРЭЧ на ПБЦА НЧ улучшает ориентировочно-исследовательскую реакцию и двигательную активность крыс с ИПГ в открытом поле. Кроме того, нсРЭЧ-ПБЦА-ПС80, обладает способностью предупреждать амнезию УРПИ, развившуюся у животных после инсульта.

5.4. Исследование нейропротекторных свойств наносомальной формы нсРЭЧ-ПЛГА на модели интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ) у крыс.

Моделирование локального кровоизлияния в головном мозге проводилось согласно процедуре, описанной в разделе «материалы и методы».

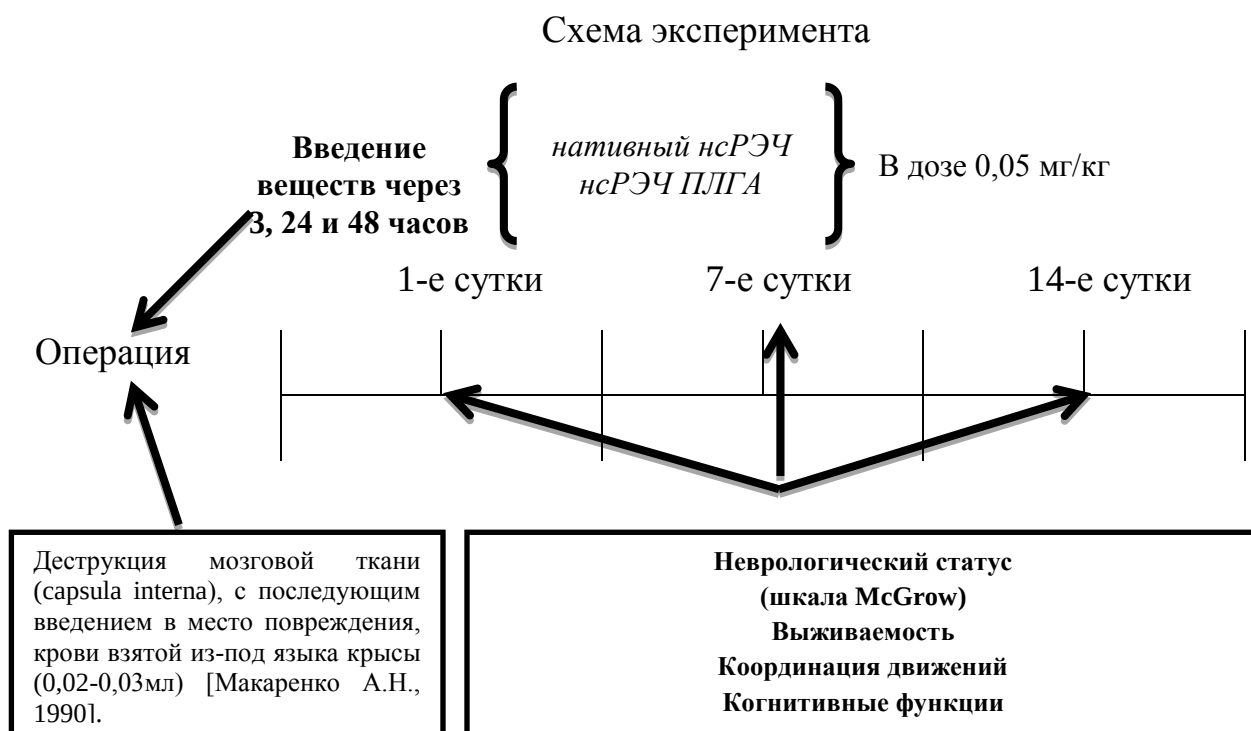


Рис. 5.6. Схема эксперимента по изучению нейропротекторных эффектов наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПЛГА НЧ у крыс с ИПГ.

Исследование динамики выживания крыс с ИПГ.

Изучение динамики выживания крыс показало, что к 7-му дню наблюдения все ЛО животные выжили (рис. 5.7). На фоне повторного 3-х дневного введения наносомальной формы нсРЭЧ на ПЛГА НЧ, модифицированной 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.

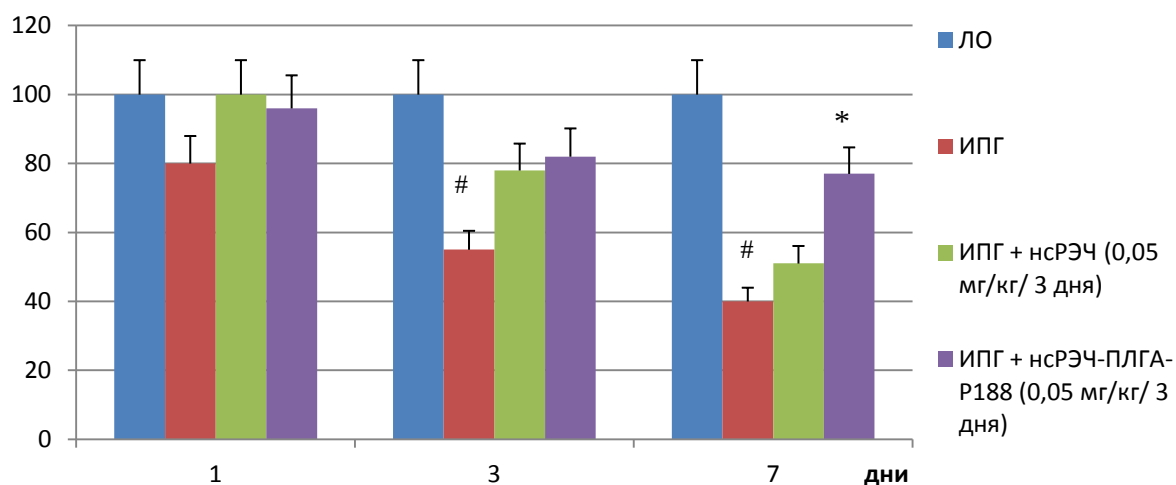


Рис. 5.7. Влияние нсРЭЧ на выживаемость крыс с ИПГ; по вертикали – количество выживших животных в %, по горизонтали – сутки после операции, ЛО – ложнооперированные животные, ИПГ – крысы с интрацеребральной посттравматической гематомой;

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО; * - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ИПГ (точный критерий Фишера).

Исследование неврологического дефицита у крыс с ИПГ.

Проведенные исследования показали, что у ЛО животных на 7-е сутки после операции не наблюдались тяжелые неврологические нарушения - маневные движения, парезы, параличи. Такие нарушения отмечались в контрольной группе крыс с ИПГ у 50% животных (рис. 5.8). Раствор нсРЭЧ не оказывал существенного влияния на указанные проявления неврологического дефицита у крыс с ИПГ, отмечалась лишь тенденция ослабления нарушений. В группе животных с ИПГ, получавших нсРЭЧ-ПЛГА-Р188 наблюдалось статистически достоверное уменьшение количества животных с тяжелым неврологическим дефицитом до 7,14%. Полученные данные свидетельствуют о протекторном эффекте наносомальной формы.

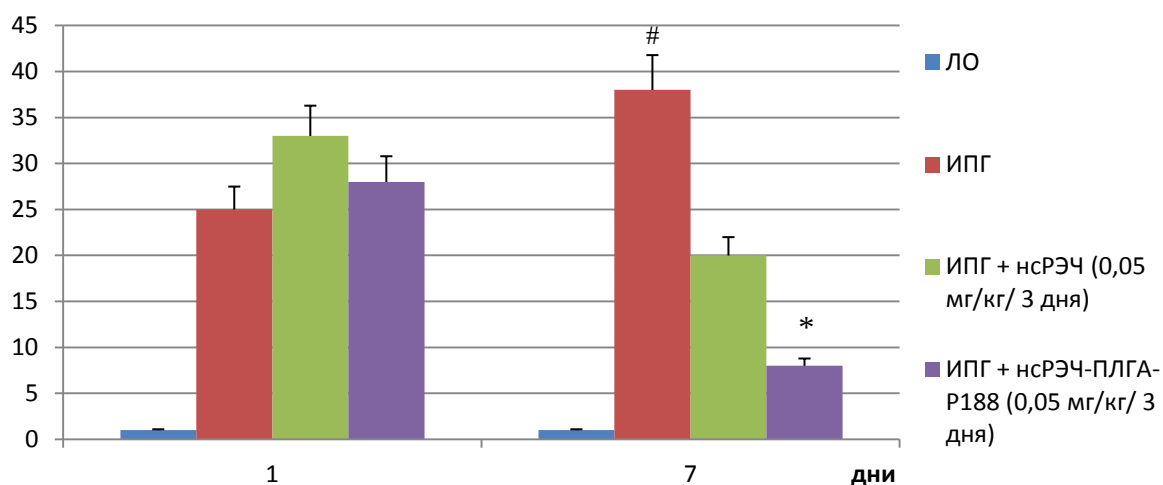


Рис. 5.8. Влияние нсРЭЧ на проявление тяжелых неврологических нарушений у крыс с ИПГ; по вертикали – количество животных с тяжелыми неврологическими нарушениями в %, по горизонтали – сутки после операции, ЛО – ложнооперированные животные, ИПГ – крысы с интрацеребральной посттравматической гематомой;

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО; * - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ИПГ (точный критерий Фишера).

Изучение влияния нсРЭЧ на координацию движений у крыс с ИПГ.

Координацию движений у крыс с ИПГ исследовали в тесте «вращающийся стержень». Установлено, что у крыс с ИПГ в сравнении с ЛО животными наблюдалось значительное ухудшение координации движений, характеризующееся статистически достоверным увеличением числа падений крыс с вращающегося стержня при регистрации в течение 2-х минут на 7-е сутки после обучения (табл. 5.6). На фоне повторного 3-х дневного в/в введения нсРЭЧ-ПЛГА-Р188 в дозе 0,05 мг/кг у крыс отмечалось тенденция к уменьшению числа падений с вращающегося стержня на 7-е сутки после обучения по сравнению с контрольной группой крыс с ИПГ.

Таким образом, нсРЭЧ-ПЛГА-Р188 ослаблял нарушения координации движений у крыс с ИПГ в тесте вращающийся стержень на 7-е сутки наблюдения.

Таблица 5.6.

Влияние нсРЭЧ на координацию движений у крыс с ИПГ в тесте «вращающийся стержень».

Группа крыс	<i>время после операции, сут.</i>	
	1-е (обучение)	7-е (воспроизведение)
	<i>Число падений ($M \pm SEM$)</i>	
Контроль ЛО	0,40 $\pm$ 0,21	0,20 $\pm$ 0,13
Контроль ИПГ	3,71 $\pm$ 0,68 [#]	4,75 $\pm$ 2,48 [#]
ИПГ + нсРЭЧ	3,63 $\pm$ 0,84	0,80 $\pm$ 0,44
ИПГ + нсРЭЧ-ПЛГА-Р188	7,13 $\pm$ 1,02*	2,07 $\pm$ 0,76

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО;

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ИПГ.

Изучение влияния нсРЭЧ на обучение УРПИ у крыс с ИПГ.

Изучение влияния тестируемых форм на обучение УРПИ показало, что животные во всех исследуемых группах обучились условному рефлексу, т.к. при его воспроизведении на следующие сутки все 100% крыс помнили об ударе током в темной камере и не заходили туда в течение всего времени наблюдения (рис. 5.9).

При воспроизведении УРПИ через 7 дней после обучения в группе ЛО животных все 100% крыс помнили о ситуации и не заходили в темную камеру, где получили обучающий удар током, а в контрольной группе крыс с ИПГ только 50% животных осуществляли рефлекс пассивного избегания. Полученные результаты свидетельствуют о развитии у крыс с ИПГ нарушений памяти. нсРЭЧ-ПЛГА-Р188 предупреждал развитие амнезии УРПИ у крыс с ИПГ, повышая количество животных, осуществлявших рефлекс на 7-е сутки до 100% и латентное время осуществления рефлекса до $180 \pm 0,00$ с. У животных с ИПГ, получавших нсРЭЧ отмечалась лишь тенденция к увеличению числа животных, осуществлявших рефлекс по сравнению с контрольной группой.

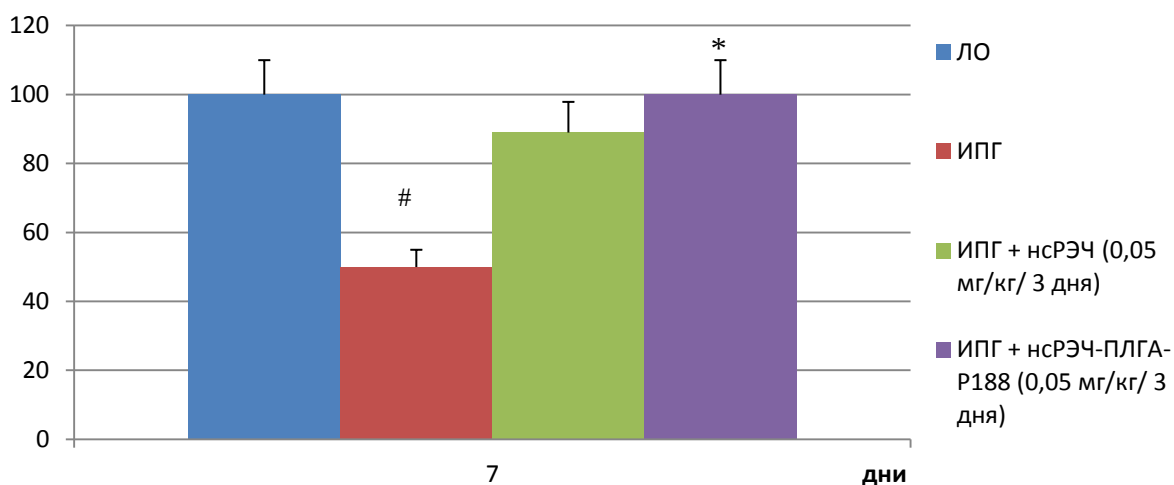


Рис. 5.9. Влияние нсРЭЧ на воспроизведение условной реакции пассивного избегания через 7 дней после обучения у крыс с ИПГ; по вертикали – количество животных, не зашедших в темную камеру в %, по горизонтали – сутки после операции, ЛО – ложнооперированные животные, ИПГ – крысы с интрацеребральной посттравматической гематомой;

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО; * - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ИПГ (точный критерий Фишера).

Таким образом, нсРЭЧ-ПЛГА-Р188 проявлял антиамнестические свойства, в значительной степени ослабляя нарушение воспроизведения УРПИ у крыс с ИПГ.

Исследование влияния наносомальной формы нсРЭЧ на объем зоны повреждения мозга у крыс с ИПГ.

Морфометрические исследования объема поврежденной зоны мозга показали, что у контрольной группы крыс с ИПГ наблюдалось значительное повреждение тканей мозга (табл. 5.10) объемом в среднем $17,49 \pm 4,94 \text{ мм}^3$. В группе крыс, получавших трехкратно нсРЭЧ-ПЛГА-Р188 (0,05 мг/кг), площадь очага поражения была достоверно значительно меньше и составляла $5,01 \pm 1,9 \text{ мм}^3$.

Протекторный эффект наносомальной формы нсРЭЧ рассчитывали с использованием коэффициента эффективности защиты (КЭЗ) по формуле:

$$\text{КЭЗ} = (V_0 - V_v) / V_0 \times 100 \%; \text{ КЭЗ} = (17,49 - 5,01) / 17,49 \times 100\% = 71,36 \%, \text{ где}$$

V_o -объем повреждения мозга у крыс с ИПГ; V_v - объем повреждения мозга у крыс с ИПГ, получавших наносомальную форму нсРЭЧ. КЭЗ составил 71,36%, что свидетельствует о высокой протекторной активности наносомальной формы.

Таблица 5.7.

Влияние наносомальной формы нсРЭЧ на объем зоны повреждения мозга крыс с ИПГ на 7-е сутки после операции.

Группа крыс	Суммарный объем зоны повреждения, мм ³
Контроль ЛО	0,00±0,00
Контроль ИПГ	17,49±4,94#
ИПГ + нсРЭЧ-ПЛГА-P188	5,01±1,47*

Примечание: ЛО-ложнооперированные животные; # - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ЛО; * - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы крыс с ИПГ (t критерий Стьюдента).

На рисунке 5.10. представлены срезы головного мозга крыс с ИПГ в области наибольшего поражения. 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).

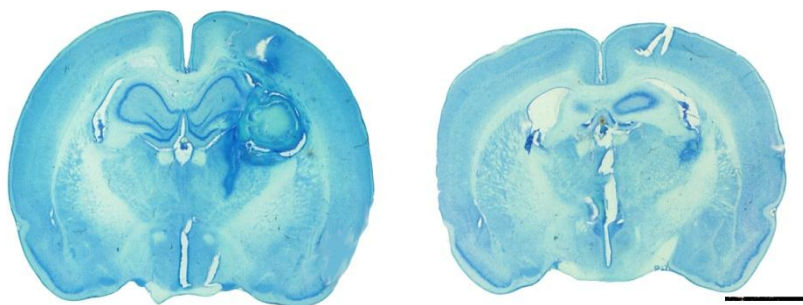


Рис. 5.10. Сравнение максимальной зоны повреждения у крыс с ИПГ на срезах мозга, окрашенных метиленовым синим.

Примечание: масштаб 3 мм. Слева на право: контроль, нсРЭЧ-ПЛГА-P188.

5.5. Изучение влияния наносомальной формы нсРЭЧ на эритропоэз.

Из данных литературы известно, что снижение содержания сиаловых кислот в молекуле нсРЭЧ определяет его более короткий период полувыведения из плазмы крови (Erbaytaktar S., 2003), а также снижение

средства к рецепторам, отвечающим за гемопоэтические функции (Etcheverrigaray M., 2011). Однако, можно полагать, что полимерная основа наночастиц может определенным образом стабилизировать молекулу нсРЭЧ, пролонгируя циркуляцию в кровотоке, что может проявиться избыточной стимуляцией эритропоэза и, соответственно, повышением тромбообразования. В этой связи представлялось необходимым изучить влияние наносомальной формы нсРЭЧ на эритропоэз.

Как показал подсчет числа ретикулоцитов в крови у крыс (рис. 5.11), РЭЧ (препарат Эральфон[®], применяемый для коррекции анемий) увеличивает гемопоэз при внутривенном и внутрибрюшинном введении в дозе 5000 МЕ, тогда как наносомальная форма нсРЭЧ в эквивалентной дозе не вызывает увеличения числа молодых кровяных клеток у крыс по сравнению с контрольной группой, получавшей физиологический раствор.

Таким образом, на фоне повторного 3-х дневного внутривенного и внутрибрюшинного введения наносомальной формы нсРЭЧ в дозе, эквивалентной 5000 МЕ/кг РЭЧ, не было отмечено увеличения числа молодых кровяных клеток в крови у крыс.

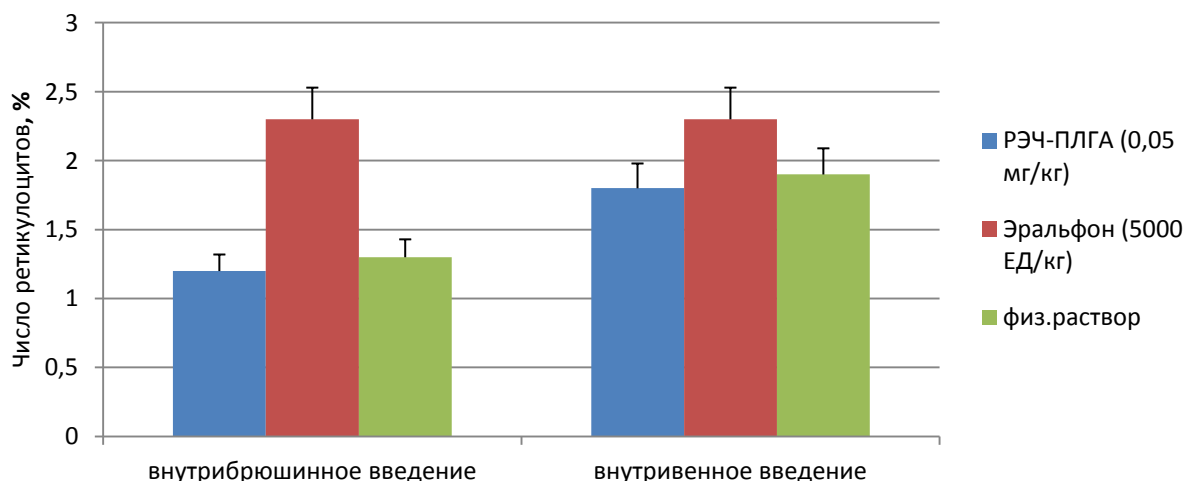


Рис. 5.11. Влияние РЭЧ (препарат Эральфон) и наносомальной формы нсРЭЧ при различных способах введения на кроветворение у крыс.

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии эритроцитоза при использовании наносомальной формы нсРЭЧ.

Заключение.

Результаты проведенных исследований наносомальных форм нсРЭЧ на ПБЦА и ПЛГА наночастицах с модифицированной поверхностью свидетельствует об эффективности использованной технологий для доставки нсРЭЧ в мозг животных. Подтверждением этому являются выявленные у наносомальных форм нсРЭЧ нейropsychofarmacological свойства. Показано, что наносомальные формы нсРЭЧ обладает нейропротективными свойствами при внутривенном введении. На модели геморрагического инсульта у крыс установлена способность наносомальных форм нс РЭЧ оказывать выраженный нейропротективный эффект, проявляющийся в предотвращении гибели животных, уменьшении неврологических дефицитов, улучшении памяти у животных, перенесших инсульт. Нейрогистологический анализ показал, что наносомальная форма нсРЭЧ на основе ПЛГА наночастиц значительно уменьшает объем поражения мозга у крыс после геморрагического инсульта. Выявленная в настоящем исследовании способность наносомальной формы нсРЭЧ на основе ПБЦА наночастиц увеличивать в мозге животных экспрессию мРНК нейротрофинов BDNF и NGF в значительной степени определяет механизм его нейропротекторного действия.

Полученные результаты открывают перспективу для дальнейшего расширенного доклинического исследования наносомальной формы нсРЭЧ в качестве потенциального нейропротекторного средства.

Глава 6. Исследование наносомальной формы феназепама

6.1. Изучение анксиолитического действия феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.

Изучение анксиолитического действия ФЕН-ПБЦА-ПС80 в сравнении с субстанцией ФЕН в тесте конфликтной ситуации.

В контрольной группе крыс количество наказуемых взятий воды в тесте конфликтной ситуации составило $55 \pm 13,75$. Введение субстанции ФЕН приводило к значительному увеличению (в 7,7 раза в дозе 0,5 мг/кг и в 11,4 раз в дозе 1 мг/кг) числа наказуемых взятий воды. Введение ФЕН-ПБЦА-ПС80 также увеличивало число наказуемых взятий воды (в 9,44 раза в дозе 0,5 мг/кг и в 15,1 раза в дозе 1 мг/кг) (рис. 6.1).

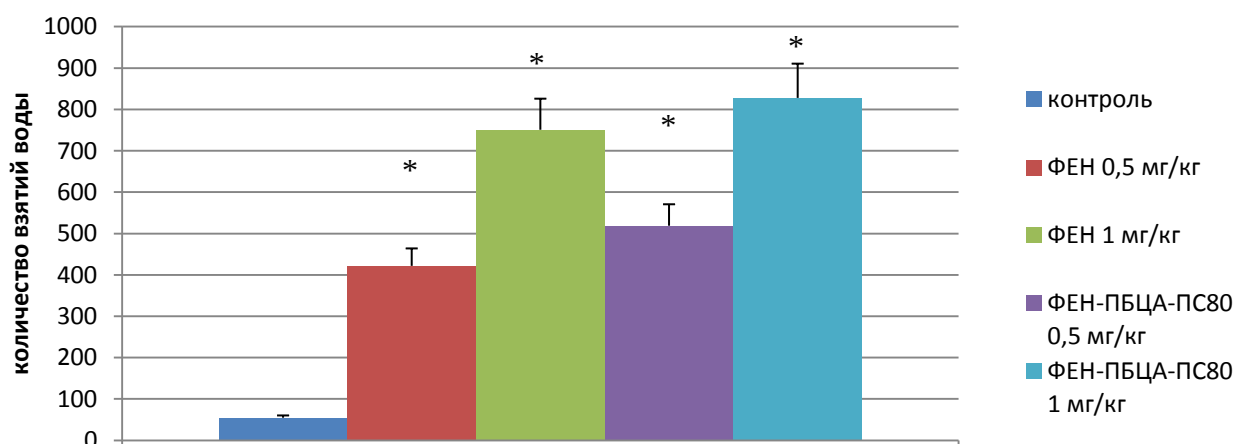


Рис. 6.1. Влияние ФЕН-ПБЦА-ПС80 и ФЕН в субстанции на количество наказуемых взятий воды в тесте конфликтной ситуации.

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от контрольной группы.

Изучение анксиолитического действия ФЕН-ПБЦА-ПС80 в сравнении с субстанцией ФЕН в тесте приподнятого крестообразного лабиринта.

В контрольной группе мышей среднее количество выходов в открытые рукава ПКЛ составило 0,43, а время пребывания в них – 5,14 сек., число свешиваний с открытых рукавов составило 0,29, а количество выходов в

закрытые рукава – 2,29. Полученные данные свидетельствуют о том, что животные находятся в стрессовом состоянии.

Феназепам в изученных дозах 0,1; 0,5 и 1 мг/кг вызывал достоверное увеличение числа выходов в открытые рукава лабиринта и времени пребывания в них, повышал число свешиваний с открытых рукавов и уменьшал количества выходов в закрытые рукава (табл. 6.1). Выраженность анксиолитического эффекта феназепама в субстанции зависела от дозы препарата: с повышением дозы от 0,1 до 1,0 мг/кг эффект усиливался. Так, в дозе 0,1 мг/кг феназепам в субстанции увеличивал время, проведенное в открытых рукавах в 6,3 раза, в дозе 0,5 мг/кг – в 7,9 раза, а в дозе 1,0 мг/кг – в 11,2 раза. Максимальный эффект феназепам в субстанции оказывал в дозе 1 мг/кг, когда наблюдалось увеличение выходов в открытые рукава в 6 раз и времени пребывания в них в 11 раз, повышение числа свешиваний в 7 раз и уменьшение количества выходов в закрытые рукава в 2 раза.

Таблица 6.1.

Влияние ФЕН-ПБЦА-ПС80 в сравнении с субстанцией ФЕН на показатели тревожности в тесте ПКЛ.

Вводимые вещества	Число выходов в открытые рукава	Время в открытых рукавах (сек)	Число свешиваний	Число выходов в закрытые рукава
Контроль (0,9 % р-р NaCl)	0,43 ± 0,09	5,14 ± 1,78	0,29 ± 0,12	2,29 ± 0,1
ФЕН 0,1 мг/кг, в/в	3,27 ± 0,48*	32,3 ± 3,16*	2,66 ± 0,61*	0,64 ± 0,18*
ФЕН 0,5 мг/кг, в/в	2,57 ± 0,48*	41,1 ± 5,17*	2,06 ± 0,52*	1,1 ± 0,21*
ФЕН 1 мг/кг в/в	2,43 ± 0,75*	57,8 ± 6,77*	1,86 ± 0,41*	1,28 ± 0,41*
ФЕН-ПБЦА-ПС 80 0.1 мг/кг, в/в	2,53 ± 0,16*	39,16 ± 5,18*	2,11 ± 0,24*	1,1 ± 0,09*
ФЕН-ПБЦА-ПС 80 0.5 мг/кг, в/в	2,73 ± 0,18*	55,86 ± 7,14*	2,12 ± 0,47*	1,3 ± 0,22*
ФЕН-ПБЦА-ПС 80 1 мг/кг, в/в	2,57 ± 0,89*	70,86 ± 4,84*	2,29 ± 0,52*	1,28 ± 0,41*

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от контрольной группы.

Выраженность анксиолитического эффекта ФЕН-ПБЦА-ПС80 зависела от дозы препарата: с повышением дозы от 0,1 до 1,0 мг/кг эффект усиливался. Так, в дозе 0,1 мг/кг ФЕН-ПБЦА-ПС80, увеличивал время, проведенное в открытых рукавах в 7,6 раза, в дозе 0,5 мг/кг – в 10,9 раза и в

дозе 1,0 мг/кг – в 13,7 раза. Максимальный эффект ФЕН-ПБЦА-ПС80 оказывал в дозе 1 мг/кг. По выраженности анксиолитического эффекта ФЕН-ПБЦА-ПС80 несколько превосходит ФЕН в субстанции, однако, различия не носят достоверного характера.

6.2. Изучение антиагрессивного эффекта феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.

В тесте немотивированной агрессивности – драки на электродном полу – у контрольных мышей порог болевой реакции составил $6,13 \pm 1,73$ В, порог агрессивности – $22,5 \pm 4,96$ В, судорожные проявления наблюдались при $25,5 \pm 1,93$ В. Полученные данные свидетельствуют об агрессивном поведении животных, спровоцированном электрическим током.

При использовании ФЕН в субстанции в дозе 2 мг/кг порог болевой реакции животных увеличился в 1,9 раз, порог агрессивной реакции повысился в 1,2 раза, а порог судорожных реакций увеличился в 1,25 раз (табл. 6.2). Выявленная способность ФЕН повышать пороги свидетельствует об антиагрессивном и противосудорожном действии феназепама в субстанции.

Таблица 6.2.

Влияние ФЕН-ПБЦА-ПС80 и субстанции ФЕН на агрессивное поведение в тесте «драки мышей».

Показатели поведения	Контроль (0,9 % р-р NaCl)	ФЕН-ПБЦА-ПС80 (2 мг/кг, в/в)	ФЕН в субстанции (2 мг/кг, в/в)
Порог болевой реакции	$6,13 \pm 1,73$	$23,5 \pm 6,18^*$	$11,88 \pm 4,22^*$
Порог агрессивной реакции	$22,5 \pm 4,96$	$38,8 \pm 4,51^*$	$36,5 \pm 1,29^*$
Порог судорожной реакции	$25,5 \pm 1,93$	$40,13 \pm 1,29^*$	$31,88 \pm 1,81^*$

* - различие с контролем достоверно при $p < 0,05$

После введения ФЕН-ПБЦА-ПС80 в дозе 2 мг/кг порог болевой реакции животных увеличился в 3,8 раз, а порог агрессивной реакции повысился в 1,7 раз, порог судорожных реакций увеличился в 1,6 раза.

Таким образом, наносомальная форма феназепама не уступает феназепаму в субстанции по выраженности антиагрессивного действия.

6.3. Изучение противосудорожного эффекта феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.

Изучение противосудорожного действия наносомальной формы феназепама в сравнении с субстанцией феназепама проводили в опытах на крысах в тесте антагонизма с коразолом и при использовании методики первично-генерализованных судорог, вызванных бемегридом, используя ЭЭГ анализ судорожной активности в различных структурах мозга.

Субстанция феназепама, также как и наносомальная форма в 100% случаях блокировали судороги после подкожного введения коразола, в то время как в контрольной группе при введении аналогичной дозы коразола в 90% наблюдались тонико-клонические судороги (рис. 6.2).

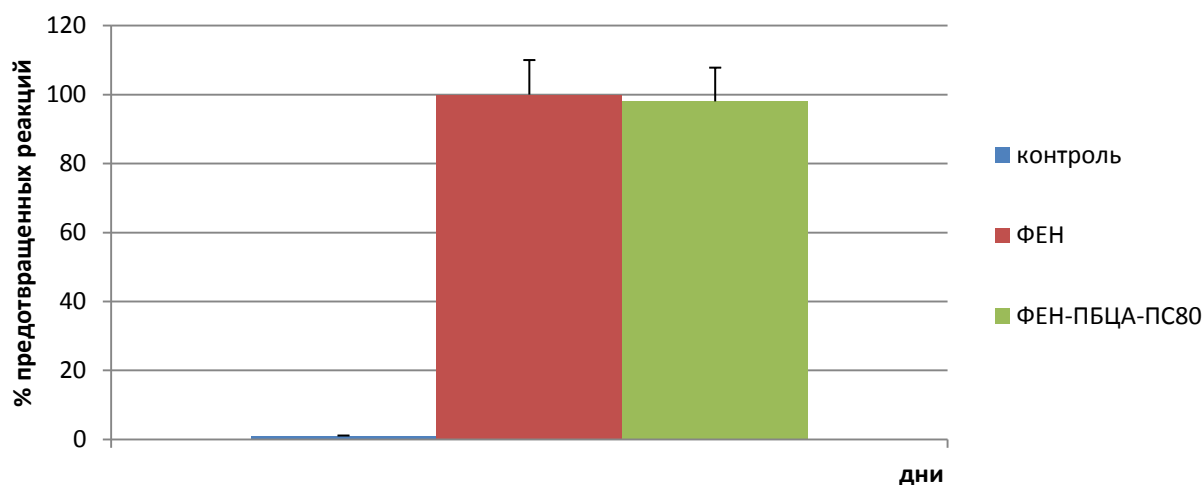


Рисунок 6.2. Противосудорожная активность ФЕН-ПБЦА-ПС80 и субстанции ФЕН в дозе 1 мг/кг в тесте антагонизма с коразолом у крыс.

В фоновых электрограммах всех исследуемых структур регистрировалась дизритмичная активность с наличием быстрых и медленных волн амплитудой от 10 до 80 мкВ. Пароксизмальная активность отсутствовала. На рисунке 6.3 представлены электрограммы крысы, зарегистрированные до введения бемегрида. Можно увидеть, что в

электрограммах пароксизмальная активность отсутствует во всех исследуемых структурах, отмечаются лишь отдельные острые волны, незначительно превышающие по амплитуде фоновую активность.

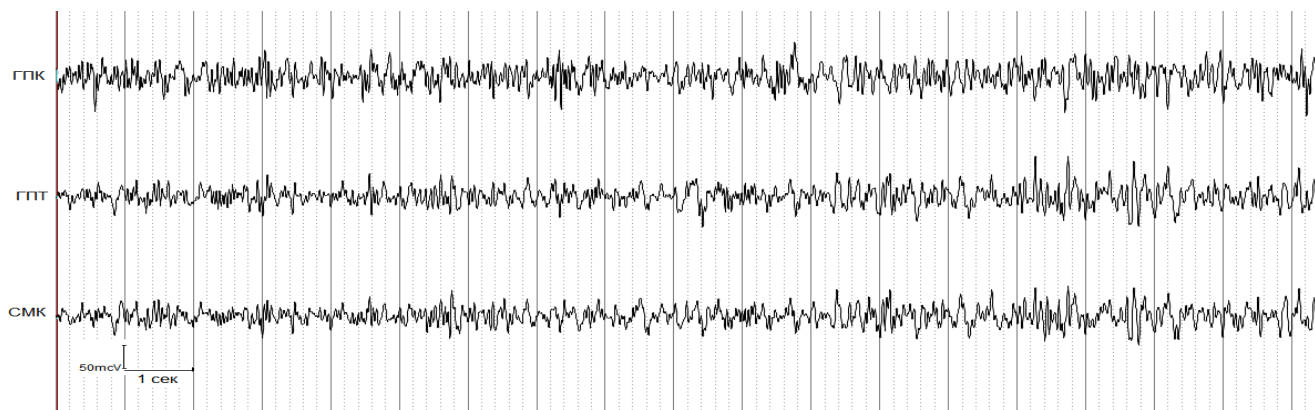


Рис. 6.3. Фоновая электрограмма крысы.

Сокращения: ГПК-гиппокамп, ГПТ-гипоталамус, СМК-сенсомоторная кора.

Через 10 минут после введения бемегида в дозе 10 мг/кг во всех исследуемых структурах появляются эпилептиформные разряды высокоамплитудных острых и медленных волн, амплитудой более 200 мкВ, длительностью от 0,3 до 2,5 сек (рис. 6.4). Число разрядов за минуту составило в среднем $12,3 \pm 4,6$, а длительность разрядов за минуту составила $6,1 \pm 0,4$ с. Этот эффект сохранялся на протяжении 30 минут.

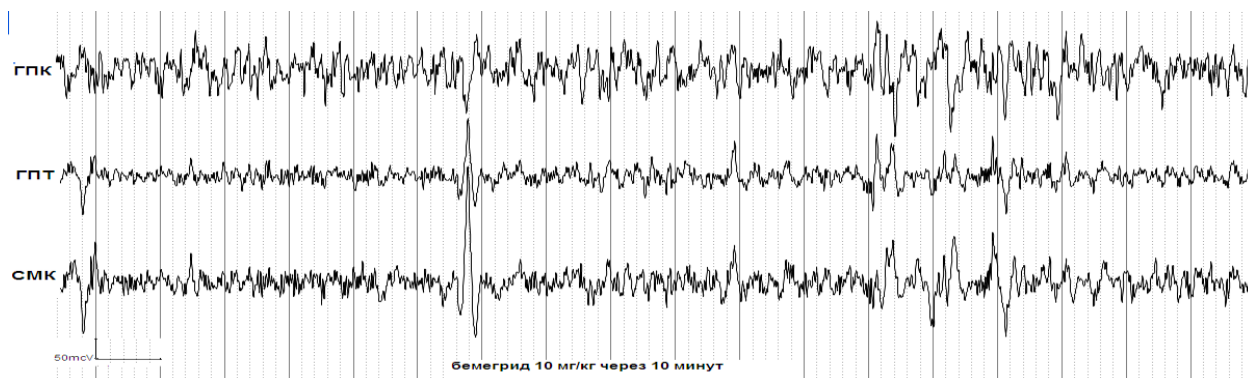


Рис. 6.4. Электрограммы крысы, зарегистрированные через 10 минут после введения бемегида.

Раствор субстанции феназепама (1 мг/кг), введенный за 30 минут до бемегида, ослаблял эффекты бемегида: число разрядов за минуту составило $3,2 \pm 0,5$, а длительность $0,5 \pm 0,08$ с. На рисунке 6.5 представлены

электрограммы крысы, зарегистрированные через 10 минут после введения бемегида на фоне введения субстанции феназепама. Видно, что пароксизмальная активность представлена в виде отдельных групп медленных волн, незначительно превышающих по амплитуде фоновую активность.

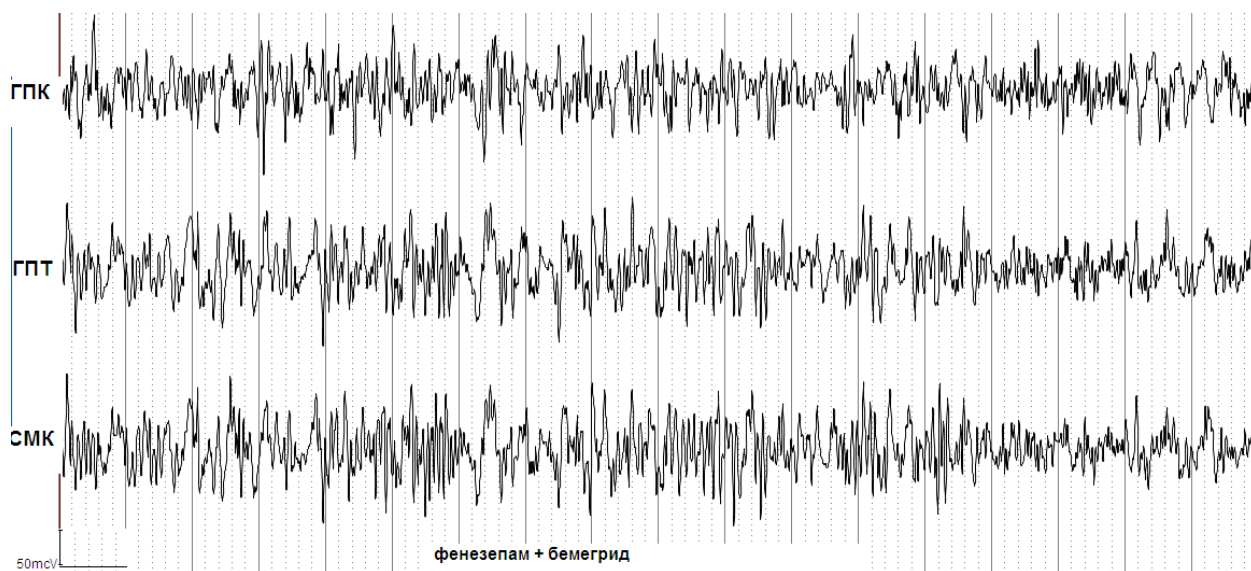


Рис. 6.5. Электрограммы крысы, зарегистрированные через 10 минут после введения бемегида на фоне действия субстанции феназепама.

Предварительное введение наносомальной формы феназепама практически полностью устраняло появление эпилептиформной активности и значительно увеличивало латентное время появления эпилептиформных волн (рис. 6.6). Число разрядов в минуту составляло $1,1 \pm 0,07$, т.е. в 11 раз меньше, чем в контроле, а длительность $0,45 \pm 0,07$ с, т.е. в 13 раз меньше, чем в контроле.

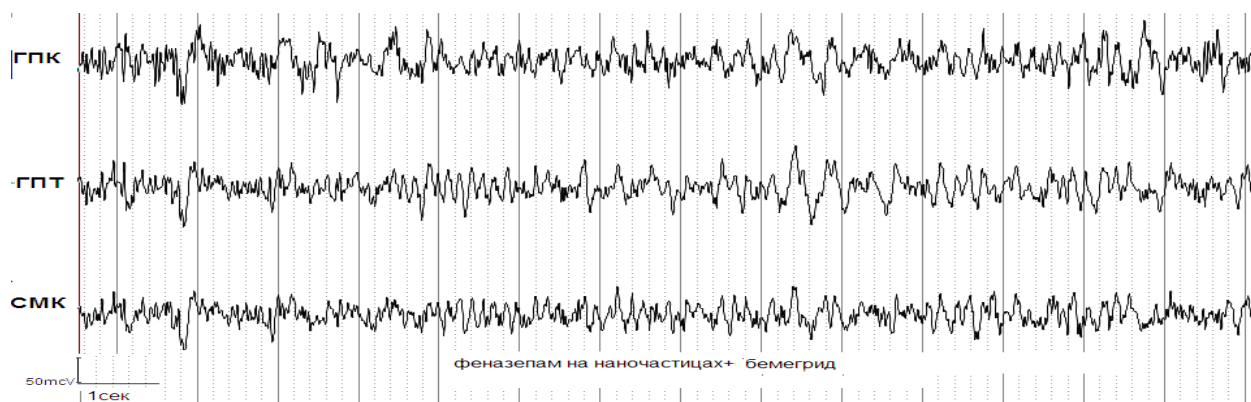


Рис. 6.6. Электрограммы крысы, зарегистрированные через 10 минут после введения бемегида на фоне действия наносомальной формы феназепама.

Таким образом, наносомальная форма феназепама обладает выраженной противосудорожной активностью, несколько превосходящей феназепам, что проявлялось в увеличении латентного время появления первых эпилептических приступов и уменьшении числа приступов.

6.4. Изучение седативного действия феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.

Изучение седативного действия наносомальной формы феназепама в сравнении с субстанцией ФЕН проводили в тесте открытого поля. При введении ФЕН в субстанции в дозе 1 мг/кг наблюдалось существенное уменьшение, по сравнению с контролем, числа пересеченных мышами квадратов (в 7 раз), количества вертикальных стоек (в 5 раз) и количества обследованных отверстий (в 15 раз) в открытом поле, что свидетельствует о его выраженном седативном действии. ФЕН-ПБЦА-ПС80 практически не вызывал снижения числа пересеченных квадратов и числа вертикальных стоек (табл.6.3).

Таблица 6.3.

Влияние ФЕН-ПБЦА-ПС80 в сравнении с ФЕН в субстанции на поведение крыс в тесте открытого поля.

Показатели поведения	Контроль (0,9 % р-р NaCl)	ФЕН-ПБЦА-ПС80 (1 мг/кг, в/в)	ФЕН в субстанции (1 мг/кг, в/в)
Число горизонтальных перемещений	20,17 ± 2,14	19,07 ± 3,11	10,8 ± 2,05*
Число вертикальных перемещений	9,33 ± 1,03	10,12 ± 1,58	4,8 ± 1,47*
Число обследованных отверстий	12,33 ± 1,21	14,19 ± 2,6	2,8 ± 2,17*

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от контрольной группы.

Полученные данные позволяют сделать вывод о том, что ФЕН-ПБЦА-ПС80 в дозе 1 мг/кг не обладает седативным действием, тогда как субстанция феназепама в аналогичной дозе обладает выраженным седативным эффектом.

6.5. Изучение миорелаксанта́ного действия феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы в сравнении с феназепамом в субстанции.

В опытах на крысах ФЕН в субстанции в дозе 1 мг/кг вызывал падение со стержня 50% крыс с латентным периодом 11,2 с, а в дозе 2 мг/кг – 80% животных с латентным периодом - 4,1 с. Наносомальная форма феназепама в дозах 1 и 2 мг/кг практически не оказывала миорелаксанта́ного действия- количество крыс, неспособных удержаться на вращающемся стержне составило 10%.

В опытах на мышах при использовании ФЕН в субстанции в дозе 1 мг/кг наблюдалось падение со стержня 50% мышей с латентным периодом 8,4 с, а в дозе 2,5 мг/кг – 90% животных с латентным периодом 2,8 с. В дозе 5 мг/кг ФЕН в субстанции оказывал еще более выраженное миорелаксанта́ное действие. У животных наблюдалось расслабление задних конечностей и 50% животных не были способны перемещаться даже на плоской поверхности (лабораторном столе). Наносомальная форма феназепама в дозе 1 мг/кг не вызывала нарушения координации движений; в дозе 2,5 мг/кг ФЕН-ПБЦА-ПС80 вызывал нарушение координации движений у 20% мышей при первой посадке и у 10% мышей при второй посадке. В дозе 5 мг/кг ФЕН-ПБЦА-ПС80 вызывал нарушение координации движений у 70% мышей.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что наносомальная форма феназепама обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и противосудорожным действием, аналогичным действию ФЕН в субстанции, однако, в отличие от ФЕН в субстанции, в терапевтическом диапазоне доз не обладает седативным и миорелаксанта́ным действием (рис. 6.7).

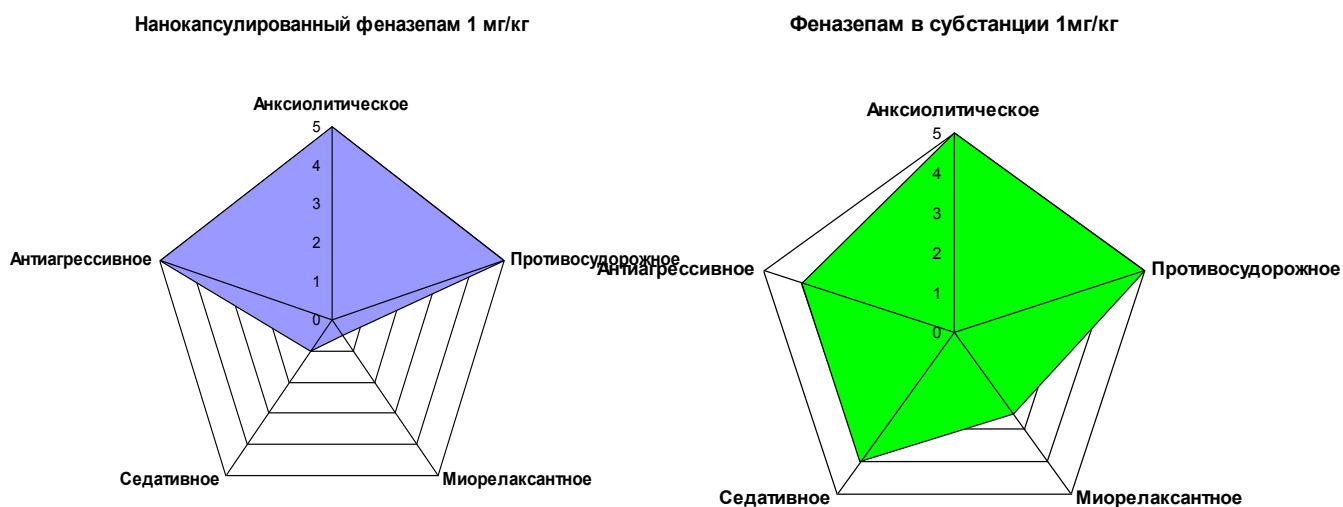


Рисунок 6.7. Сравнительный фармакологический спектр наносомальной формы феназепама и феназепама в субстанции в дозе 1 мг/кг.

6.6. Исследование механизма действия феназепама, включенного в ПБЦА наночастицы с использованием блокаторов бензодиазепиновых и ГАМК-А рецепторов.

С целью выяснения вопроса о возможном вовлечении ГАМК-бензодиазепинового рецепторного комплекса в реализацию анксиолитического действия наноразмерной формы феназепама были использованы фармакологические анализаторы – флумазенил и бикикуллин. Флумазенил - этил-8-фтор-5,6-дигидро-5-метил-6-оксо-4Н-имидазо[1,5-а-1,4] бензодиазепин-3-карбоксилат является конкурентным блокатором специфических бензодиазепиновых рецепторов и устраняет все центральные эффекты бензодиазепиновых транквилизаторов: анксиолитический, снотворный, седативный и миорелаксantный, а также способствует восстановлению дыхания и сознания при передозировке бензодиазепинов. Бикикуллин - алкалоид, выделяемый из растения *Dicentra cucullaria*, является антагонистом ГАМК-А рецепторов и снижает центральные эффекты бензодиазепиновых анксиолитиков.

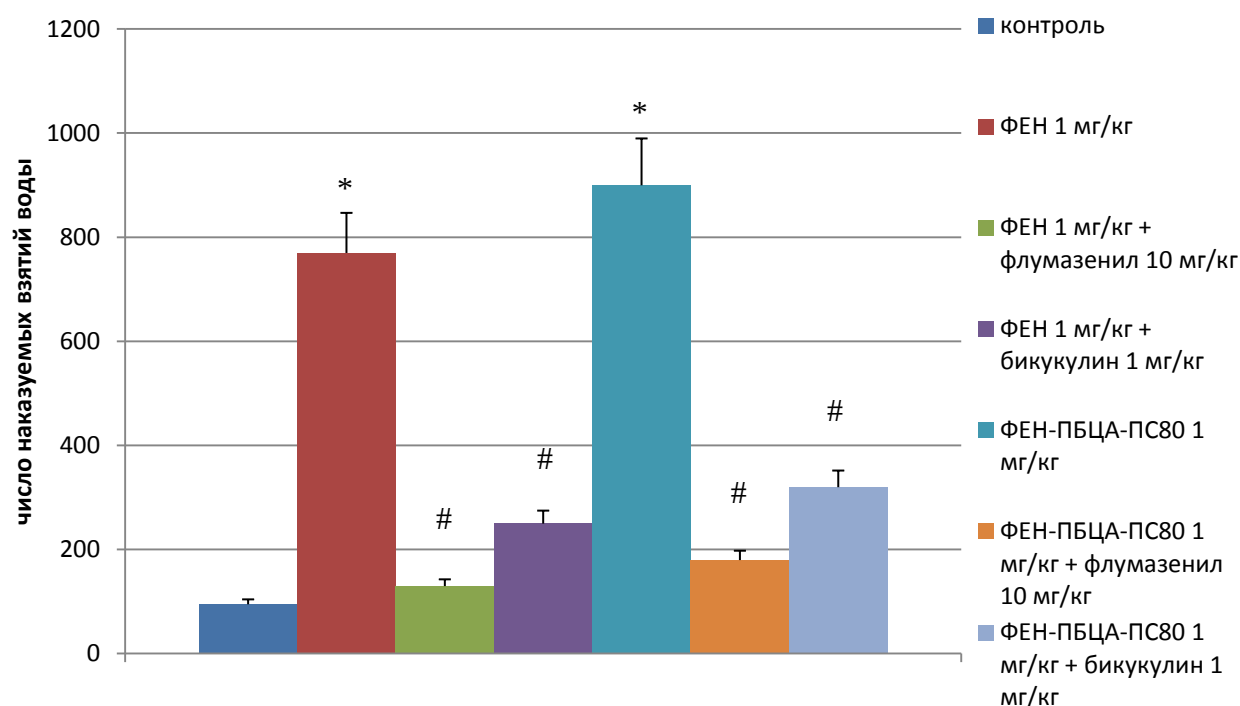


Рис. 6.8. Анксиолитический эффект ФЕН и ФЕН-ПБЦА-ПС80 в тесте конфликтной ситуации на фоне введения флумазенила и бикикуллина.

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от контрольной группы; добавить ФЕН ПБЦА ПС 80

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы препарата без антагониста.

В ходе проведенного исследования установлено, что флумазенил (10 мг/кг, в/нб), введенный после субстанции ФЕН (1 мг/кг), достоверно снижает анксиолитический эффект как ФЕН в субстанции, так и ФЕН в составе наносомальной формы, о чем свидетельствует значительное уменьшение (более чем в 6 раз) числа наказуемых взятий воды по сравнению с показателями одних веществ (рис. 6.8). Бикикуллин (1 мг/кг, в/нб) также ослабляет анксиолитический эффект феназепама и ФЕН-ПБЦА-ПС80 (рис. 6.8), но его эффект был менее выражен, чем эффект флумазенила. Полученные данные позволяют предположить, что в реализацию анксиолитического действия наносомальной формы феназепама также как и в механизм действия ФЕН в субстанции вовлекаются бензодиазепиновые и ГАМК-А рецепторы.

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

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

Эксперименты *in vitro*. Результаты сравнения динамики специфического связывания и величин IC_{50} двух серий экспериментов в условиях *in vitro* представлены на рис. 6.9. 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 *in vitro* свидетельствуют о том, что включение феназепама в ПБЦА наночастицы не изменяет способности феназепама специфически связываться с БДЗ-рецепторами мозга.

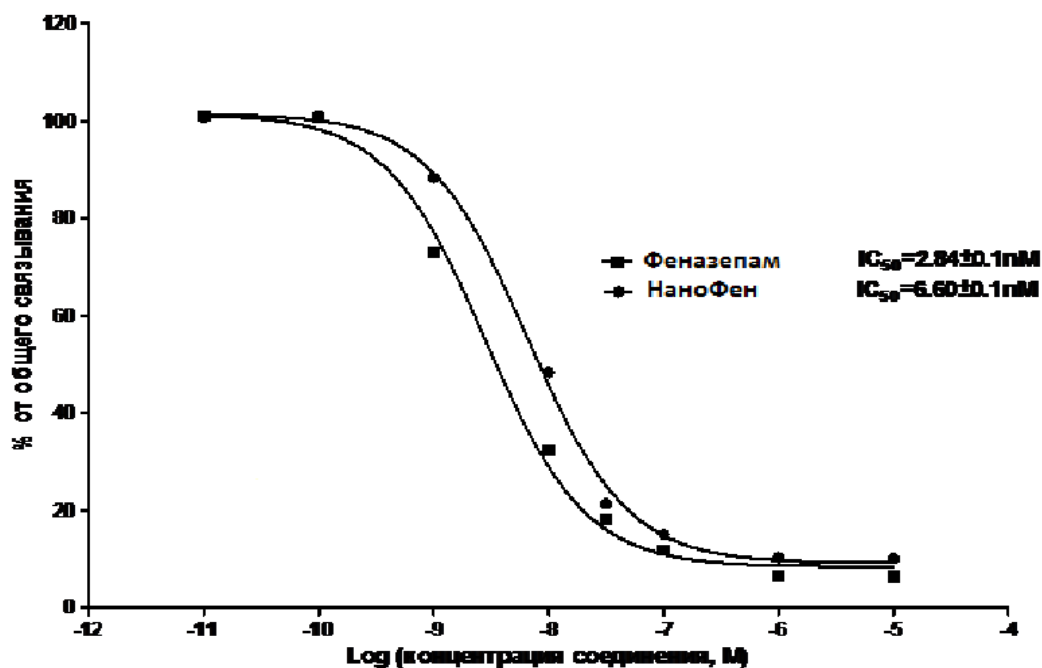


Рис. 6.9. Влияние ФЕН и НаноФен (ФЕН-ПБЦА-ПС80) на связывание [N-метил- 3H] флунитразепама мембранами гиппокампа крыс *in vitro*.

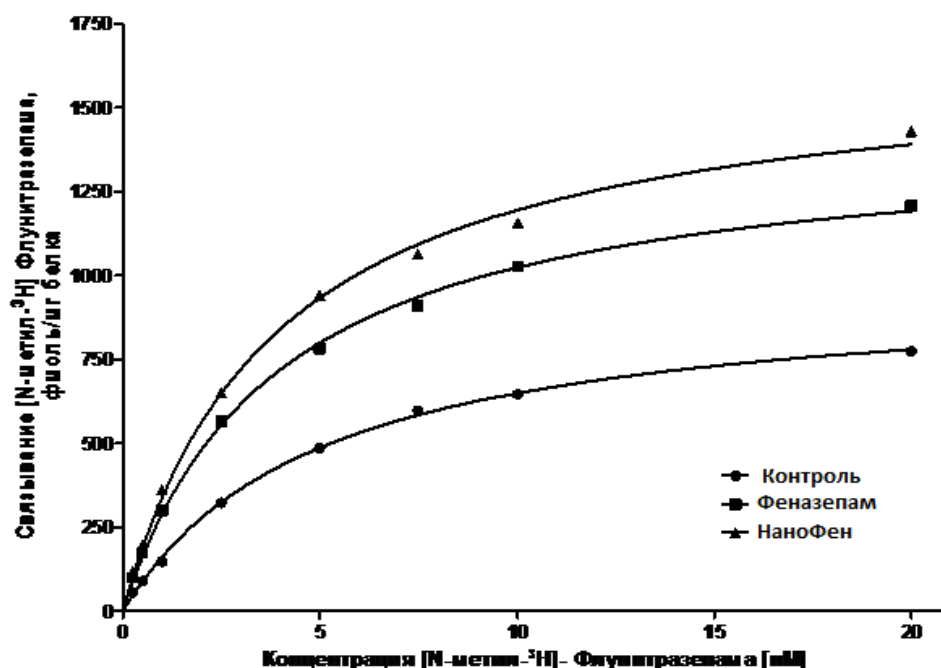


Рис. 6.10. Сравнительное влияние субхронического введения ФЕН (1 мг/кг, 5 дней) и НаноФен (ФЕН-ПБЦА-ПС80) (1 мг/кг, 5 дней) на характеристики радиолигандного связывания с мембранами гиппокампа крыс *ex vivo*.

Эксперименты *ex vivo*. Результаты изучения состояния БДЗ-рецепторов после 5-кратного системного введения ФЕН и ФЕН-ПБЦА-ПС80 представлены на рис. 6.10. Эффекты обоих веществ описываются классическими кривыми насыщения, указывающими на монотонное и моноцентрическое связывание лиганда. При этом, обе экспериментальные кривые лежат существенно выше, чем в контрольной группе сравнения.

Количественные параметры рецепторного связывания, рассчитанные по программе *Graphpad Prism 4 Demo*, приведены в табл. 6.4, из которой следует, что под влиянием субхронического введения 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]-флунизотразепаму); во-вторых, возрастают величины B_{max} , отражающие плотность мест связывания лиганда. Причём, под влиянием ФЕН количество рецепторов увеличивается на 46% ($p < 0.01$), а под воздействием ФЕН-ПБЦА-ПС80 – на 70% ($p < 0.01$). При этом

действие ФЕН-ПБЦА оказывается заметно эффективнее ($p < 0.05$).

Таблица 6.4.

Характеристики рецепторного связывания ФЕН и ФЕН-ПБЦА-ПС80 с бензодиазепиновыми рецепторами гиппокампа крыс после субхронического введения (1 мг/кг/день *5) *ex vivo*.

Группы	B_{max}		Kd	
	(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%

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от контрольной группы;

- ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ФЕН;

Заключение.

При изучении спектра фармакологических эффектов наносомальной формы феназепама было установлено, что она обладает выраженным анксиолитическим эффектом в тесте приподнятого крестообразного лабиринта, аналогичным эффекту ФЕН в субстанции, который является дозозависимым и усиливается при повышении дозы от 0,1 до 1,0 мг/кг. По выраженности анксиолитического эффекта наносомальная форма даже несколько превосходит ФЕН в субстанции, однако, различия не носят достоверного характера. Наряду с анксиолитическим эффектом наносомальная форма и ФЕН в субстанции обладают сходным антиагрессивным эффектом в тесте «драки» пары мышей на электродном полу и противосудорожным эффектом в тестах антагонизма с коразолом и бемегридом. В тоже время, наносомальная форма в сравнении с ФЕН в субстанции не обладает в терапевтических дозах седативным и миорелаксантным действием. В высокой дозе (5 мг/кг) ФЕН-ПБЦА-ПС80 оказывает значительно меньшее миорелаксантное действие (нарушение координации движений у 70% животных), чем феназепам в субстанции (нарушение координации у 100% животных, расслабление задних конечностей и неспособность передвижения даже на плоской поверхности).

Таким образом, ФЕН-ПБЦА-ПС-80, в сравнении с ФЕН в субстанции, обладает выраженным анксиолитическим, антиагрессивным и противосудорожным действием, аналогичным действию ФЕН в субстанции, однако, в отличие от ФЕН в субстанции, в терапевтических дозах не обладает седативным и миорелаксantным действием.

Для объяснения вышеуказанных эффектов ФЕН-ПБЦА-ПС80, нами были проведены исследования, которые позволяют предположить, что в реализацию анксиолитического действия ФЕН-ПБЦА-ПС80, также как и в действие ФЕН в субстанции вовлекаются бензодиазепиновые и ГАМК-А рецепторы. Об этом свидетельствует тот факт, что флумазенил - антагонист бензодиазепиновых рецепторов достоверно снижает анксиолитическое действие ФЕН-ПБЦА-ПС80. Наряду с этим, достоверно снижает анксиолитическое действие феназепама бикикуллин - антагонист ГАМК-А рецепторов. Полученные данные свидетельствуют о том, что фармакологические эффекты ФЕН-ПБЦА-ПС80 реализуются через бензодиазепиновые рецепторы, которые аллостерически связаны с ГАМК-А рецепторами.

Результаты проведенных исследований по изучению рецепторного связывания в условиях *in vitro* подтвердили предположение о том, что действие ФЕН-ПБЦА-ПС80 опосредуется через БДЗ-рецепторы. При этом установлено, что ПБЦА наночастицы не влияют на способность феназепама специфически связываться с БДЗ-рецепторами мозга. Выявленное в экспериментах *ex vivo* существенное возрастание константы B_{max} при субхроническом введении ФЕН-ПБЦА-ПС80 свидетельствует об увеличении плотности участков связывания феназепама в структуре БДЗ-рецепторов гиппокампа. Таким образом, некоторое повышение фармакологической активности ФЕН-ПБЦА-ПС80, можно отчасти объяснить его более полным связыванием с БДЗ-рецепторами мозга.

Глава 7. Исследование наносомальной формы паклитаксела.

Как отмечалось в обзоре литературы, паклитаксел является высокоэффективным химиотерапевтическим препаратом с относительно широким спектром противоопухолевой активности. Однако, клиническая эффективность паклитаксела существенно снижается при лечении злокачественных новообразований, экспрессирующих один из факторов лекарственной резистентности - Р-gr. Паклитаксел является субстратом Р-gr, что приводит к существенному снижению его концентрации в опухолевых клетках, продуцирующих этот белок. Повысить внутриклеточное содержание паклитаксела в резистентных опухолевых клетках представляется возможным путем создания его наноразмерных форм.

7.1. Исследование внутриклеточного накопления наночастиц в высокорезистентных клетках Jurkat WT.

Для подтверждения проникновения наночастиц в высокорезистентные клетки Jurkat WT было проведено микроскопическое исследование. Флуоресцентная микроскопия показала, что ПЛГА-НЧ с флуоресцентным (FITC) кумарином-6 захватываются клетками Jurkat WT. После инкубации клеток с НЧ, мечеными кумарином-6, наблюдается интенсивная флуоресценция НЧ.

При микроскопическом рассмотрении клеток через пропидий йодид фильтр ядра окрашены в красный цвет (рис. 7.1. А). Флуоресценция кумарина-6 наблюдается как вокруг ядер так и в самих ядрах (рис. 7.1. Б), что указывает на захват клетками Jurkat WT меченых наночастиц. При наложении первых двух изображений четко видно расположение наночастиц относительно ядер (рис. 7.1.В).

После инкубации клеток с НЧ, мечеными кумарином-6, наблюдается интенсивная флуоресценция как ПЛГА НЧ без Р188, так и ПЛГА НЧ с Р188. При этом, флуоресценция ПЛГА НЧ без Р188, меченых кумарином-6, наблюдается преимущественно вокруг клеточных ядер (рис. 7.1. Г) (красные

ядра окрашены пропидия йодидом), тогда как интенсивная флуоресценция ПЛГА НЧ, покрытых Р188, наблюдается как в цитоплазме, так и в самих ядрах высокорезистентных клеток Jurkat WT (рис. 7.1. Д).

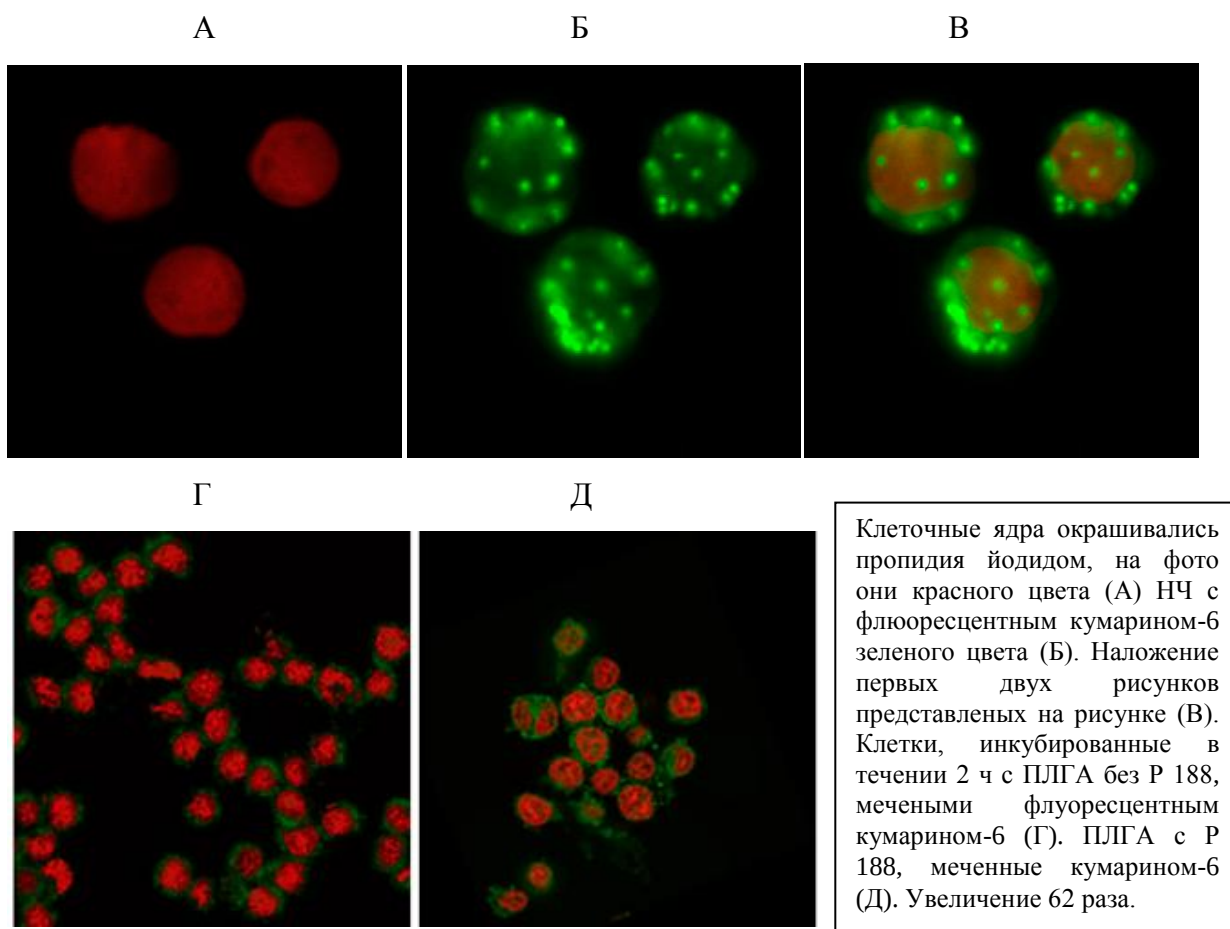


Рис. 7.1. Внутриклеточное распределение наночастиц в клетках Jurkat WT.

Проникновение наночастиц в Jurkat WT клетки свидетельствует о преодолении системы Р-гр, поэтому следующей задачей настоящего исследования явилось изучение цитотоксической активности наносомальной формы паклитаксела.

7.2. Определение цитотоксической активности различных форм паклитаксела в МТТ тесте пролиферативной активности клеток.

МТТ-тест основан на способности дегидрогеназ живых клеток превращать бледно-желтый водорастворимый 3-(4,5-диметилтриазол-2-ил)2,5-дифенил-2-Н-тетразолия бромид (МТТ) в нерастворимые в воде голубые кристаллы формазана. При этом количество образовавшегося формазана прямо пропорционально числу выживших клеток.

В МТТ тесте экспериментальные формы паклитаксела тестировались в диапазоне концентрации от 10^{-7} до 10^{-4} . Наночастицы плацебо не проявляли цитотоксический эффект (данные не представлены). ИК₅₀ определяли графически.

В МТТ тесте раствор паклитаксела в диапазоне концентрации от $5 \cdot 10^{-7}$ до $1 \cdot 10^{-4}$ не достигал ИК₅₀. При этом процент клеток, сохранивших жизнеспособность, превысил 100%, что свидетельствует об отсутствии цитотоксической активности раствора паклитаксела в отношении Jurkat WT клеток. Очевидно, что в больших разведениях паклитаксел неэффективен. В связи с этим, эффективность наносомальных препаратов начали изучать с концентрации $6,8 \cdot 10^{-7}$ М.

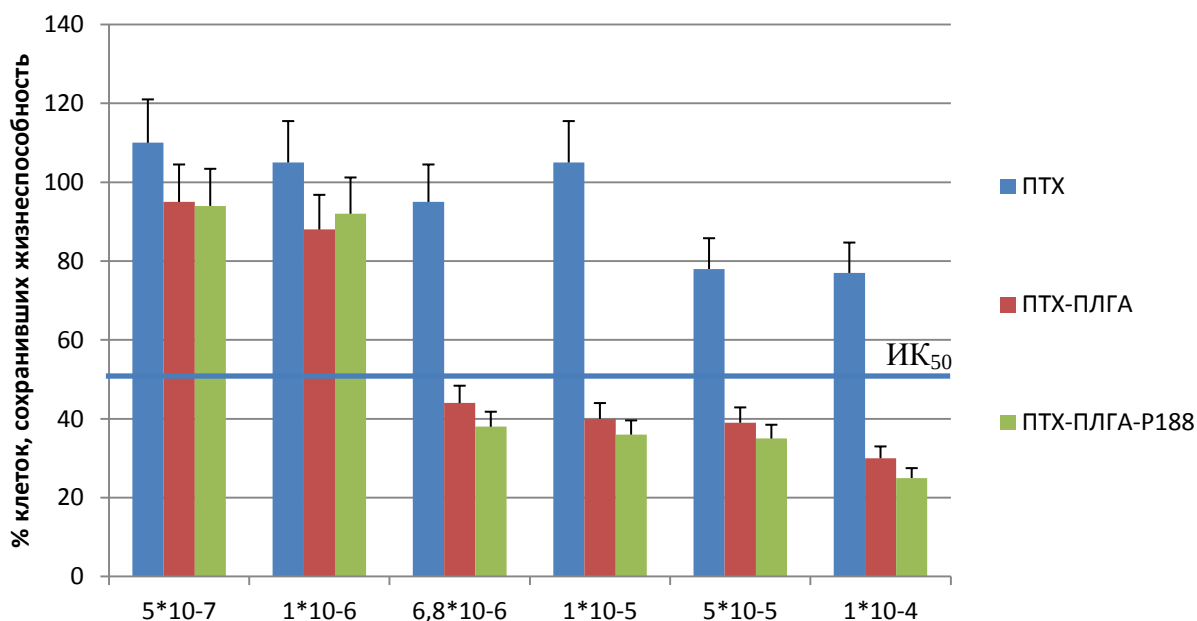


Рис. 7.2. Цитотоксическая активность различных форм паклитаксела в отношении клеток Jurkat WT в МТТ тесте.

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от контрольной группы.

Наносомальная форма паклитаксела на основе ПЛГА НЧ, модифицированная Р188 (ПТХ-ПЛГА-Р188) достигала ИК₅₀ в концентрации $6,8 \cdot 10^{-6}$ и выше; % выживших клеток в зависимости от тестируемых концентрации составил 45% при концентрации $6,8 \cdot 10^{-6}$ и 30% при концентрации $1 \cdot 10^{-4}$. Таким образом, ПТХ-ПЛГА-Р188 в отличие от

раствора паклитаксела (ПТХ) оказывает цитотоксический эффект в низком диапазоне концентраций. Наибольшей цитотоксической активностью обладал ПТХ-ПЛГА-P188; ИК₅₀ достигалось в концентрации $6,8 \cdot 10^{-6}$, при этом 39% клеток сохранило жизнеспособность. В самой высокой из исследуемых концентрации $1 \cdot 10^{-4}$ только 25% клеток сохранило жизнеспособность (рис.7.2).

Для наносомальных форм паклитаксела значение ИК₅₀ равно $6,8 \cdot 10^{-6}$ М, т.е. ниже терапевтической дозы *in vivo* – $1 \cdot 10^{-5}$ М. В более низких концентрациях 10^{-6} М и $5 \cdot 10^{-7}$ М жизнеспособность сохранило от 80 до 90% клеток, что подтверждает отсутствие цитотоксического эффекта у паклитаксела при больших разведениях.

7.3. Определение противоопухолевой активности различных форм паклитаксела на модели аденокарциномы Ca755 у мышей линии C57BL6.

Оценку противоопухолевой активности наносомальной формы паклитаксела проводили на резистентной опухоли - аденокарциноме Ca755 у мышей. Результаты определения продолжительности жизни на модели аденокарциномы молочной железы Ca755 у мышей линии C57BL6 представлены в таблице 7.1.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что только при введении ПТХ-ПЛГА-P188 статистически достоверно увеличивается продолжительность жизни мышей C57BL6. При этом противоопухолевый эффект носит дозозависимый характер.

Увеличение продолжительности жизни на 25% и более считается показателем терапевтической эффективности тестируемого вещества [Трещалина Е.М., 2012]. На основании этого можно заключить, что ПТХ-ПЛГА-P188 оказала выраженный цитостатический эффект в отношении аденокарциномы молочной железы во всех трех тестируемых дозах, тогда как стандартная форма ПТХ подобным эффектом не обладала.

Таблица 7.1.

Влияние ПТХ и ПТХ-ПЛГА-Р188 на продолжительность жизни мышей линии C57BL6.

Препарат	Доза (мг/кг)	Дни введения препарата после прививки опухоли	Средняя продолжительность жизни (дни)	Увеличение продолжительности жизни (%)
Контроль (физиологический раствор)	-	3,5 и 7	23,9 ±0,98	-
ПТХ (стандартная форма)	15	3,5 и 7	25,6±1,05	7,1
	10	3,5 и 7	25,1±1,31	5,0
	7,5	3,5 и 7	24,2±0,89	0,8
ПТХ-ПЛГА-Р188	15	3,5 и 7	40,9±2,1*	71,1
	10	3,5 и 7	38,2±1,94*	59,8
	7,5	3,5 и 7	35,6±0,91*	48,9

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от контрольной группы.

Результаты влияния тестируемых форм паклитаксела на рост опухоли представлены в таблице 7.2.

Активными в противоопухолевом отношении считаются дозы препаратов, вызывающие торможение роста опухоли $\geq 70\%$ продолжительностью не менее 7 дней после окончания лечения [Трещалина Е.М., 2012]. Анализируя терапевтическое действие тестируемых форм паклитаксела, можно отметить, что по показателю «торможение роста опухоли» ПТХ-ПЛГА-Р188 проявила эффективность во всех трех экспериментальных дозах. При этом выраженный эффект сохранялся на протяжении всего периода наблюдения, что в определенной мере обусловлено постепенной биodeградацией наночастиц и выходом из них паклитаксела. ПТХ тормозил рост опухоли, однако показатель ТРО находился в диапазоне от 40,8 до 4,3 %, тогда как для ПТХ-ПЛГА-Р188 этот показатель составил от 94,3 до 75,2 %.

Таблица 7.2.

Влияние ПТХ и ПТХ-ПЛГА-P188 на рост аденокарциномы молочной железы у мышей линии C57BL6.

Препарат	Доза (мг/кг)	Объем опухоли (мм ³ , M±m), (ТРО, %)			
		Дни от начала эксперимента			
		8	11	14	21
Контроль (физ. раствор)	0	2896±356	6228±708	9490±899	28218±3140
ПТХ (стандартная форма)	15	1713±119 (40,8)	3999±367 (35,7)	7352±657 (22,5)	25469±2046 (9,7)
	10	1802±133 (37,7)	4223±394 (32,1)	7594±711 (19,9)	26253±2438 (6,9)
	7,5	1998±169 (31)	5050±480 (18,9)	8556±798 (9,8)	26984±2567 (4,3)
ПТХ-ПЛГА-P188	15	235±23* (91,8)	350±32* (94,3)	1228±103* (87,1)	6123±593* (78,3)
	10	404±51* (86)	575±59* (90,7)	1374±138* (85,5)	6539±612* (76,9)
	7,5	498±56* (82,8)	785±64* (87,4)	1825±163* (80,7)	6985±702* (75,2)

* - ($p \leq 0.05$) – статистически достоверное отличие от группы ПТХ;

Сокращения: ТРО-торможение роста опухоли.

Заключение.

Создание наносомальных форм цитостатиков позволяет решить одну из основных проблем современной химиотерапии – повысить эффективность лечения и снизить системную токсичность. Решение этой проблемы может быть достигнуто посредством включения ЛВ в различные системы доставки. В нашем исследовании продемонстрирована возможность создания наносомальной формы цитостатика из группы таксанов - паклитаксела. Предложенный способ солюбилизации паклитаксела позволил исключить из состава лекарственной формы высокотоксичный Cremophor EL®.

Паклитаксел является субстратом Р-гр, что существенно лимитирует его применение в лечении высокорезистентных опухолей.

В работе методом флуоресцентной микроскопии была показана возможность проникновения и внутриклеточного накопления наночастиц в высокорезистентных клетках Т-лимфобластного лейкоза (Jurkat WT), что в определенной мере объясняется способностью наносомальной формы,

модифицированной Р 188, ингибировать функцию Р-гр. Кроме того, наносомальная форма паклитаксела проявила выраженный противоопухолевый эффект в отношении резистентной аденокарциномы молочной железы у мышей линии C57BL6. В свою очередь, выявленный эффект является результатом проникновения паклитаксела в клетки аденокарциномы, экспрессирующие Р-гр. Существенную роль в этом процессе играет плуроник Р188, применяемый для модификации поверхности наночастиц. Известно, что плуроник Р188 индуцирует конформационные изменения, приводящие к снижению сродства Р-гр для лекарственных веществ и АТФ, а также вызывает внутриклеточное снижение АТФ, необходимое для функционирования системы Р-гр [Thomas H., 2003]. Полученные нами результаты коррелируют с данными Vauthier C. и соавт. о способности полибутилцианоакрилатных наночастиц, покрытых ПС80, обеспечивать транспорт доксорубина в резистентные опухолевые клетки [Vauthier C., 2003].

Глава 8. Изучение проникновения наночастиц через гематоэнцефалический барьер в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

8.1. Изучение способности наночастиц проникать через ГЭБ в эксперименте *in vitro*.

Известно, что при патологических процессах, таких как нейродегенеративные заболевания, опухоли головного мозга и черепно-мозговые травмы происходит нарушение структуры и функционирования ГЭБ, приводящее к увеличению его проницаемости для различных веществ [Weiss N., 2009]. Однако, даже в условиях повышенной проницаемости всего лишь 5% лекарственных препаратов способны проходить через ГЭБ [Pardridge W. M., 2002]. Таким образом, для создания высокоэффективных препаратов, направленных на лечение заболеваний ЦНС, необходимо обеспечить проникновение ЛВ через ГЭБ. В этой связи при разработке наносомальных форм ЛВ для лечения патологий ЦНС необходимо исследовать их способности проходить через ГЭБ на моделях *in vitro* с использованием морфофункционального базиса ГЭБ – эндотелиальных клеток.

Особую роль ГЭБ как высокоспециализированной физиологической системы, поддерживающей гомеостаз нервной ткани, определяют фенотипические особенности эндотелиальных клеток - наличие межклеточных плотных контактов, экспрессия транспортеров обратного очистительного транспорта, низкий уровень пиноцитоза и малое количество фенестр [Nag S., 2003]. В процессе онтогенеза первым спутником эндотелиальных клеток является радиальная глия, часть клеток которой в ходе эмбриогенеза трансформируются в звёздчатые астроциты [Ribatti D., 2007]. Являясь своеобразным шлюзом между кровеносным руслом и нервной тканью, астроцитарная глия находится в тесном контакте с аблюминальной поверхностью эндотелиальных клеток и может эпигенетически индуцировать образование специфического барьерного фенотипа церебральным

эндотелием. При этом совместное культивирование эндотелиальных клеток с астроцитами приводит к повышению синтеза белков плотных контактов [Sobue K., 1999], частичному восстановлению уровня экспрессии гамма-глутамилтранспептидазы [Engelhardt B., 2003], специфических транспортеров гексоз и транспортеров обратного очистительного транспорта, в частности P-gr [Régina A., 2001].

8.1.1. Моделирование гематоэнцефалического барьера.

На сегодняшний день выделяют три основных типа моделей гематоэнцефалического барьера *in vitro*: монокультуры, двумерные модели и динамические.

Конструкция моделей-монокультур основывается на упрощенном представлении структуры барьера и представляет собой эндотелиальные клетки, культивируемые на полупроницаемой мембране пластиковой вставки Transwell. Достоинствами этой конструкции является её простота, возможность тестирования большого количества веществ вне зависимости от их химической природы в короткие сроки и ограничивается только доступностью источника эндотелиальных клеток [Grant G., 1998; Berezowski V., 2004]. Однако церебральные эндотелиальные клетки в отсутствии естественного микроокружения теряют многие из ключевых свойств (полноценно развитые плотные контакты), обуславливающих их барьерный фенотип, что ведет к увеличению проницаемости [Grant G., 1998]. Не физиологичным является и то, что эндотелиальные клетки оказываются подвержены влиянию компонентов сыворотки не только с люминальной, но и с аблюминальной стороны. Как следствие, происходит ускорение дедифференцировки клеток, особенно при их длительном культивировании и росте числа пассажей. В отсутствии антимитотических факторов (ламинин, давление потока среды) наблюдается тенденция к образованию мультислоев эндотелиальными клетками в результате их ненаправленного роста [Ziegler T., 1999; Cucullo L., 2002].

Двумерная модель основана на применении глиальных клеток в качестве необходимого строительного блока для конструирования модели, воспроизводящей условия *in vivo*. Совместное культивирование с астроцитами способствует развитию плотных контактов эндотелиальными клетками, целостных (непрерывных) по всему периметру клеточной мембраны, стимулирует экспрессию специфических маркеров церебральных эндотелиоцитов [Lattera J., 1990]. Подобные эффекты влияния астроцитов могут реализоваться при совместном культивировании, когда эндотелиоциты и астроциты разделены мембраной Transwell, радиус пор которой определяет наличие или отсутствие физического контакта между ними. Главным недостатком ее является статичность, отсутствие сил, имитирующих ток крови в сосудах. Эту проблему призваны решать динамические модели, воспроизводящие комплекс химических и физических взаимодействий, характерных для условий *in vivo*.

В естественных условиях эндотелиальные клетки постоянно подвержены давлению потока, тангенциальной силе, создаваемой потоком крови при ее движении вдоль апикальной поверхности мембраны клеток. Церебральные эндотелиоциты, культивируемые в условиях турбулентного потока, характеризуются большим количеством микрофиламентов [Ballermann B., 1998]; увеличивается экспрессия белков плотных контактов. Таким образом, биомеханические силы, генерируемые током крови, вносят значительный вклад в формирование свойств ГЭБ и для их реализации *in vitro*. В значительной степени масштабность использования динамических моделей ГЭБ сдерживают особенности их конструкции, требующие больше технических навыков и времени для подготовки данной системы к работе. Кроме того, изучение кинетики распределения веществ внутри искусственных капилляров осложняется пульсирующим током среды.

При моделировании ГЭБ одним из главных параметров является выбор клеточной культуры. Для моделирования используют как первичные культуры эндотелиальных клеток из мозга млекопитающих, так и клетки не

церебрального происхождения [Wilhelm I., 2011]. Наиболее доступный ресурс эндотелиальных клеток – большая вена пуповины человека. Этот источник, занимающий промежуточное положение между крупными сосудами (аортой) и микроваскулярными, обладает рядом преимуществ, к которым можно отнести: простоту выделения первичной культуры, широкий спектр выбора антител, специфически взаимодействующих с антигенными детерминантами, презентированными на клетках. Таким образом, эндотелиальные клетки пуповинного происхождения – подходящая модель для изучения архитектуры и формирования межклеточных контактов, а также изучения проницаемости лекарственных препаратов [Langford D., 2005, Wilhelm I., 2011].

Используемая нами в исследовании модель гематоэнцефалического барьера основана на кокультивировании первичной монослойной культуры эндотелиоцитов пупочной вены человека (HUVEC) и аллогенных астроцитов на полупроницаемых вставках Transwell® для индуцирования барьерных функций (рис. 8.1)

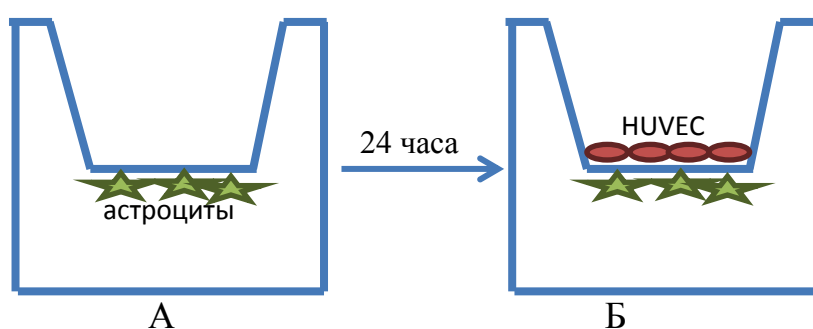


Рис. 8.1. Схема кокультивирования эндотелиоцитов с астроцитами. (А) На нижнюю поверхность мембраны высаживают астроциты; (Б) Через 24 часа на верхнюю поверхность – эндотелиоциты (HUVEC).

В качестве низкомолекулярных трейсеров для оценки параклеточной и трансклеточной проницаемости использовали флуоресцеин натрия и родамин 123 в конечной концентрации 20 мкг/мл.

Верификация клеточных культур.

На первом этапе исследования проводили верификацию полученной первичной культуры эндотелиоцитов из пупочной вены человека (рис. 8.2) и культуры астроцитов. Чистоту культур эндотелиоцитов оценивали по типичной для эндотелиальных клеток морфологии с помощью фазово-контрастной микроскопии и по экспрессии специфического маркера – фактора фон Виллебранда (vWb), а также по способности эндотелиоцитов поглощать липопротеины низкой плотности за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза. Кроме того, эндотелиальные клетки ГЭБ характеризуются протяженными и непрерывными плотными контактами, которые образуют белки трех семейств: клаудины, окклюдины и белки адгезии.

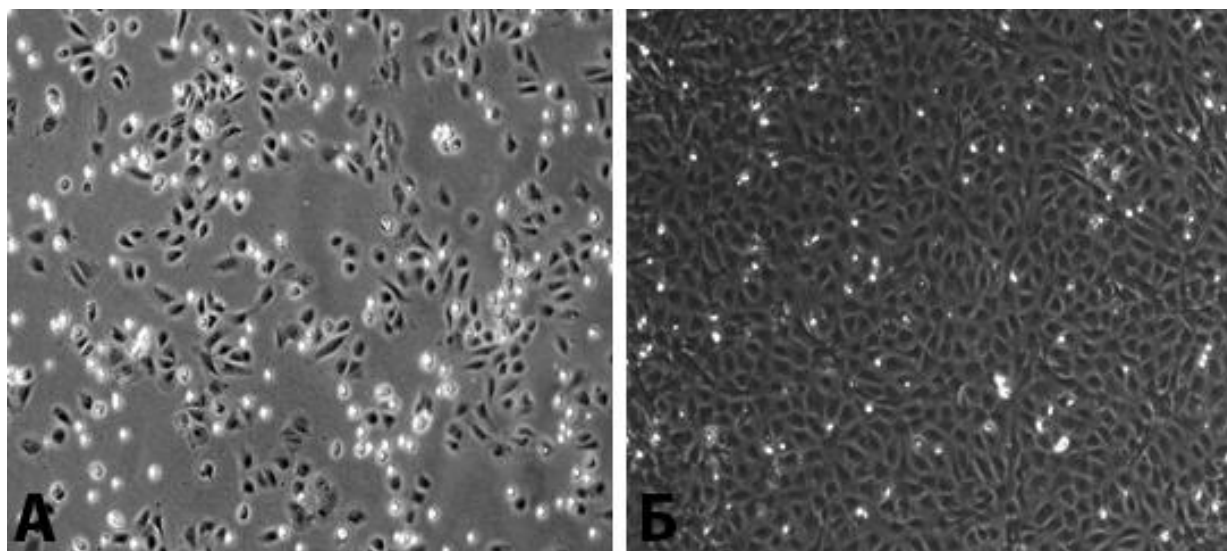


Рис. 8.2. Выделение эндотелиоцитов из пупочной вены человека. (А) Эндотелиоциты через 24 часа после выделения; (Б) Эндотелиоциты через неделю после выделения; увеличение x400

Фактор фон Виллебранда является одним из основных маркеров, синтезируемых эндотелиальными клетками и опосредующий их адгезию к стенкам сосудов в физиологических условиях. Иммуноцитохимический анализ показал, что полученные клетки экспрессируют фактор фон Виллебранда, визуализируя тельца Вейбеля-Паладе (рис. 8.3А). Кроме того, полученная первичная культура характеризуется способностью захватывать липопротеин низкой плотности после 4 часов инкубации, который

накапливается во внутриклеточном пространстве (рис. 8.3 Б). Практически все эндотелиоциты захватывали липопротеин низкой плотности и экспрессировали vWb, что свидетельствовало о чистоте полученной культуры. Также, эндотелиоциты из пупочной вены человека были охарактеризованы иммуноцитохимическим анализом на синтез белков плотных контактов ZO-1 и β -катенин (рис. 8.3 В, Г).

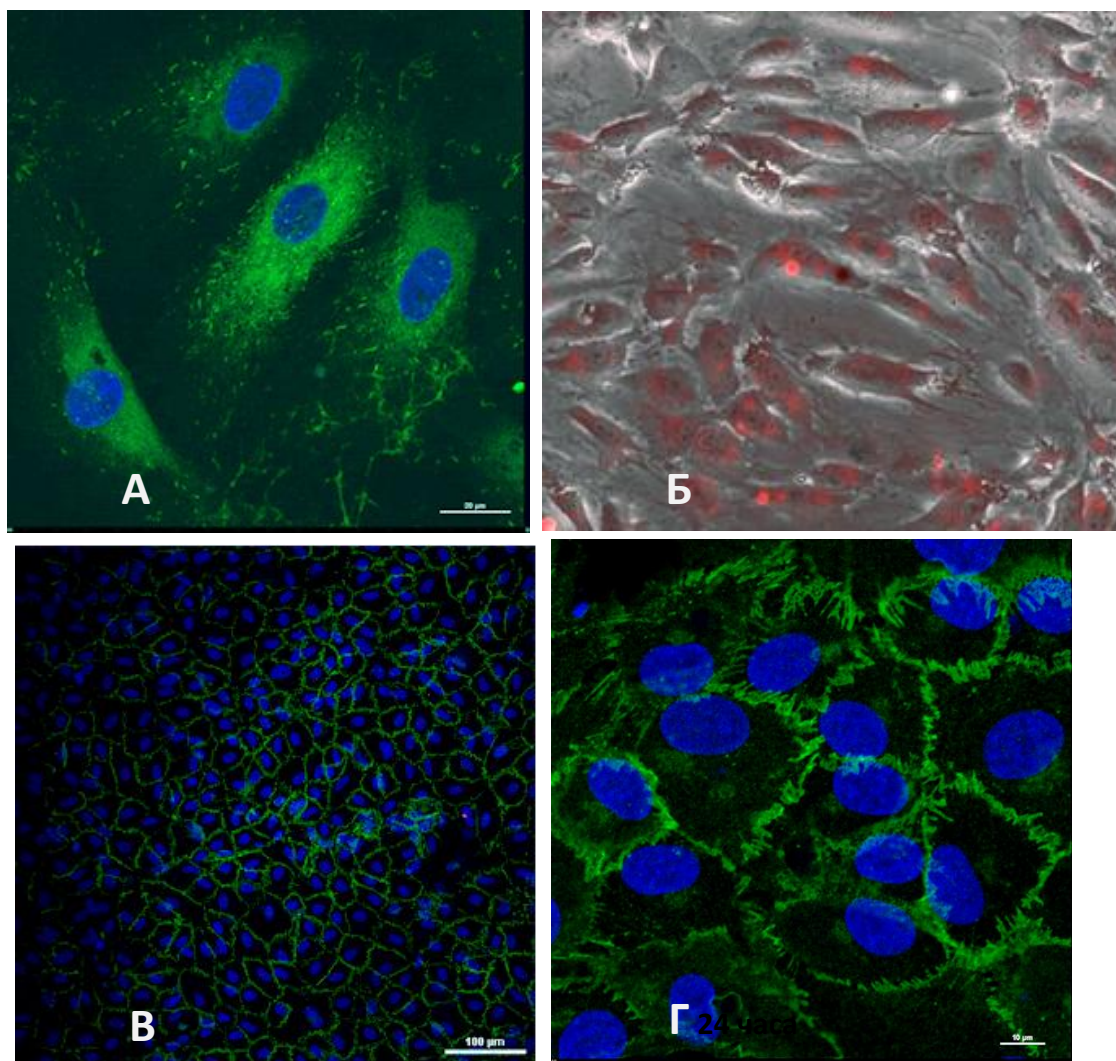


Рис. 8.3. Иммуноцитохимический анализ первичной культуры эндотелиоцитов из пупочной вены человека. (А) Экспрессия фактор фон Виллебранда, визуализация телец Вейбеля-Паладе (зеленый); (Б) Поглощение клетками липопротеина низкой плотности (красный); увеличение $\times 600$; (В) Экспрессия ZO-1 – белка плотных контактов после кокультивирования с астроцитами (зеленый); (Г) Экспрессия β -катетина эндотелиоцитами (зеленый). Ядра докрашены DAPI (синий).

Первичную культуру клеток астроцитов характеризовали по главному маркеру астроцитов – глиофибриллярному кислому протеину (GFAP). По результатам проведенного иммуноцитохимического анализа культуры клеток астроцитов из эмбрионального мозга человека, доля GFAP-положительных клеток после нескольких пассажей в культуре составила практически 100 % (рис. 8.4).

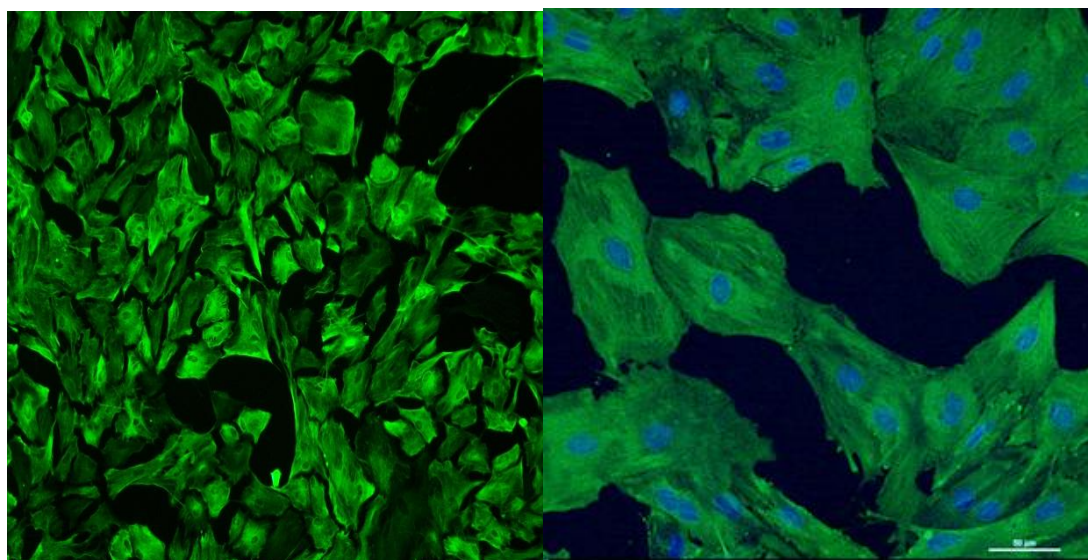


Рис. 8.4. Иммуноцитохимический анализ человеческих астроцитов.

(А) GFAP- позитивные астроциты в культуре; увеличение $\times 400$; (Б) Визуализация промежуточных филаментов в цитоплазме человеческих астроцитов. Ядра докрашены DAPI.

Изучение способности наночастиц проникать через ГЭБ.

Необходимым условием для оценки проницаемости наночастиц через ГЭБ является образование клетками монослоя сформированных плотных контактов, чтобы исключить параклеточное прохождение исследуемых веществ. Маркером параклеточного прохождения является флуоресцеин натрия. Параклеточная проницаемость веществ ограничивается эндотелиоцитами головного мозга преимущественно за счет высокой экспрессии белков плотных контактов, граничное положение которых между апикальными и базолатеральными поверхностями клетки определяет их роль в ограничении латерального межклеточного пространства, межклеточной диффузии растворов (барьерная функция) [Deli M., 2005; Abbott N., 2006;

Azzi S., 2013]. Вследствии этого флюоресцеин натрия практически не проходит через гематоэнцефалический барьер.

Одним из критериев конfluenceности монослоя является трансэндотелиальное сопротивление, максимальное значение которого у эндотелиоцитов детектировалось на 10-ый день кокультивирования с астроцитами и составило 34 Ом*см² (рис. 8.5). После десятого дня кокультивирования наблюдалось снижение TEER (трансэндотелиальное сопротивление). При этом, по сравнению с контролем – клетками эндотелиоцитов, наблюдается увеличение TEER в 5 раз. В эксперименте по оценке проницаемости использовали только те трансвеллы, TEER которых составило более 30 Ом*см². По окончании эксперимента измеряли TEER, чтобы исключить неспецифическое повреждения клеточного монослоя в результате воздействия исследуемых препаратов или оксидативного стресса, что могло повлиять на значения коэффициента проницаемости. Измерение показало, что в течение эксперимента не происходило изменения трансэндотелиального сопротивления более чем на 5%.

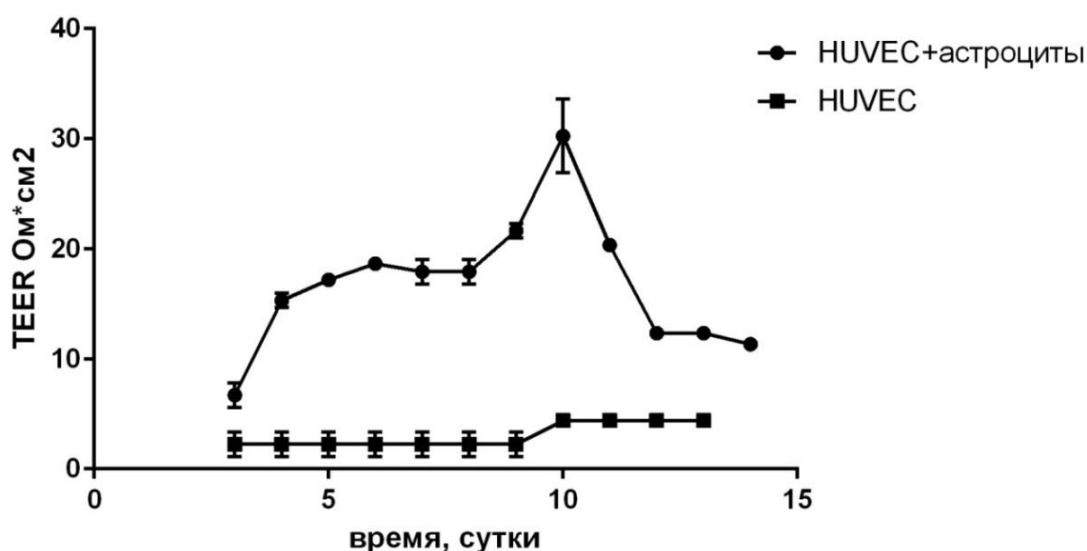


Рис. 8.5. Динамика изменения трансэндотелиального сопротивления при кокультивировании HUVEC с астроцитами и без.

Наряду с измерением трансэндотелиального сопротивления оценивали проницаемость монослоя эндотелия для веществ с известной молекулярной

массой. Флуоресцеин натрия ($M=376$ Да) – наиболее часто используемый гидрофильный низкомолекулярный трейсер для определения параклеточного транспорта, который характеризуется низкой проницаемостью через ГЭБ [Eigenmann D.E., 2013]. Значение коэффициента проницаемости от 1 до 12×10^{-6} см/сек для флуоресцеина натрия свидетельствует о качественно сформированной модели ГЭБа [Gao J., 2001; Eigenmann D.E., 2013]. Таким образом, низкие значения коэффициента проницаемости при совместном культивировании эндотелиальных клеток и астроцитов являются количественной характеристикой формирования плотных контактов на границах клеток, служащих барьером для прохождения молекул.

Таблица 8.1.

Коэффициент проницаемости (Papp), рассчитанный для исследуемых препаратов.

Тип наночастиц	Краситель, включенный в наночастицы	Размер частиц, нм	Растворитель	Коэффициент проницаемости (Papp) 10^{-6} см/сек
ПЛГА	Родамин 123	$150 \pm 30^*$	Вода д/ин	$4,04955 \pm 0,8451$
			1% p-p P 188	$18,81 \pm 3,740$
			1% p-p P 85	$29,43 \pm 5,278$
	DiI	$150 \pm 30^*$	Вода д/ин	$6,06424 \pm 3,702$
			1% p-p P 188	$8,10133 \pm 1,044$
			1% p-p P 85	$12,226 \pm 3,147$
		$300 \pm 50^*$	Вода д/ин	$0,0231879 \pm 0,007051$
			1% p-p P 188	$0,20378 \pm 0,04417$
			1% p-p P 85	$0,72152 \pm 0,09195$
ПБЦА	Родамин 123	$190 \pm 50^*$	1% p-p ПС 80	$18,3 \pm 4,37$

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

культивировании с аллогенными астроцитами. Затем сравнивали числовые значения коэффициентов проницаемости в исследуемых группах наночастиц с включенными красителями DiI или родамином 123 и контроля – родамина 123. Числовые значения коэффициентов проницаемости для исследуемых препаратов представлены в таблице 8.1, для контрольных образцов – в таблице 8.2.

Таблица 8.2.

Коэффициент проницаемости (P_{app}), рассчитанный для контрольных веществ.

Вещество	Коэффициент проницаемости (P_{app}) 10^{-6} см/сек
Родамин 123	$2,543 \pm 0,6957$
Флуоресцеин натрия	$4,06894 \pm 0,8392$

Измеренные показатели проницаемости для низкомолекулярного трейсера натрий флуоресцеина показали, что в условиях культивирования эндотелиальных клеток с аллогенными астроцитами средняя величина проницаемости P_{app} составляет $4,06894 \pm 0,8392 \times 10^{-6}$ см/сек, что сопоставимо с литературными данными [Deli M.A., 2005; Eigenmann D.E., 2013].

В группе, включавшей изучение проницаемости ПЛГА наночастиц с размером 150 нм, меченных родамином 123, было выявлено, что все частицы характеризуются более высокой проницаемостью по сравнению с флуоресцеином натрия. Наибольшим коэффициентом проницаемости в указанной группе обладают наночастицы, растворенные в 1% водном растворе полоксамера P85, где P_{app} $29,43 \pm 5,278 \times 10^{-6}$ см/сек, что в 7 раз выше проницаемости для натрия флуоресцеина. Также, достаточно активно через ГЭБ проникают ПБЦА наночастицы, 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 наночастицы, растворенные в воде для инъекций ($P_{app} 4,04955 \pm 0,8451 \times 10^{-6}$ см/сек) (рис. 8.6).

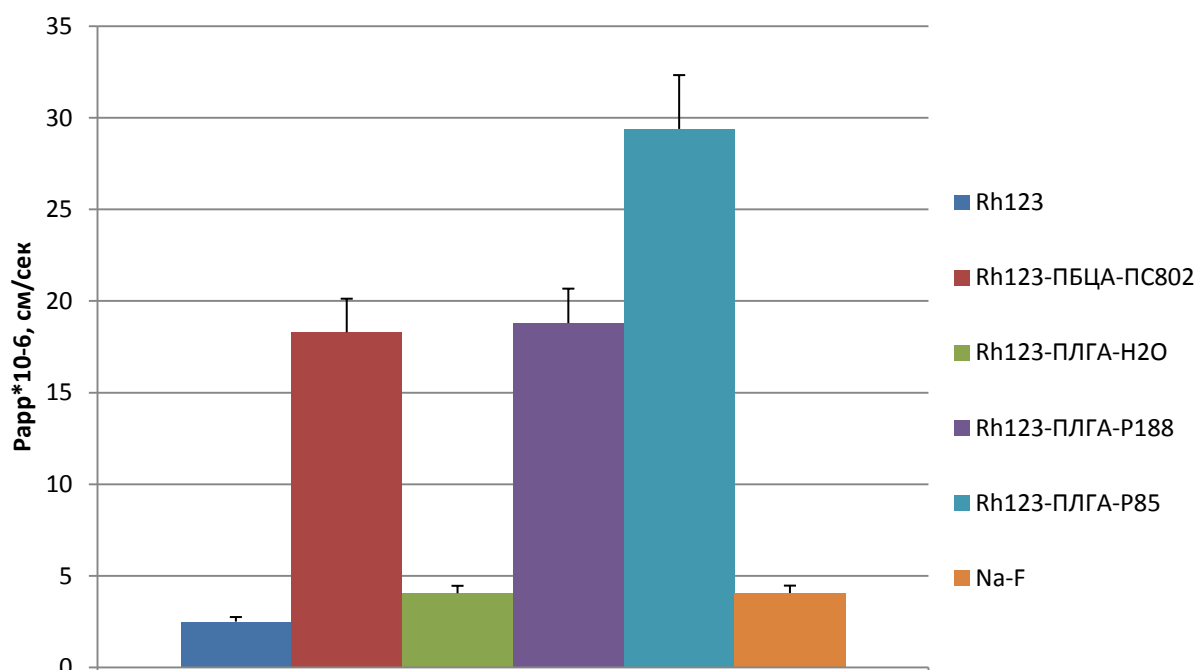


Рис. 8.6. Сопоставление коэффициентов проницаемости для ПЛГА и ПБЦА наночастиц в различных растворителях, нагруженных родамином 123, $p < 0,0001$.

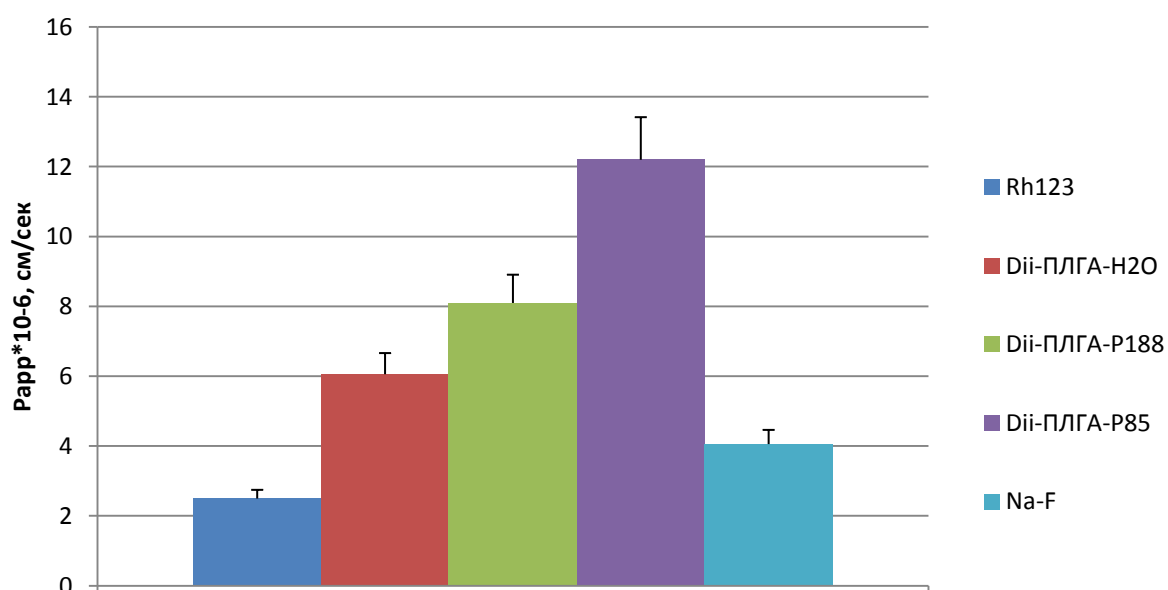


Рис. 8.7. Сопоставление коэффициентов проницаемости для ПЛГА наночастиц с размером $150\pm 30^{\times}$ нм в различных растворителях, нагруженных Dil, $p<0,05$.

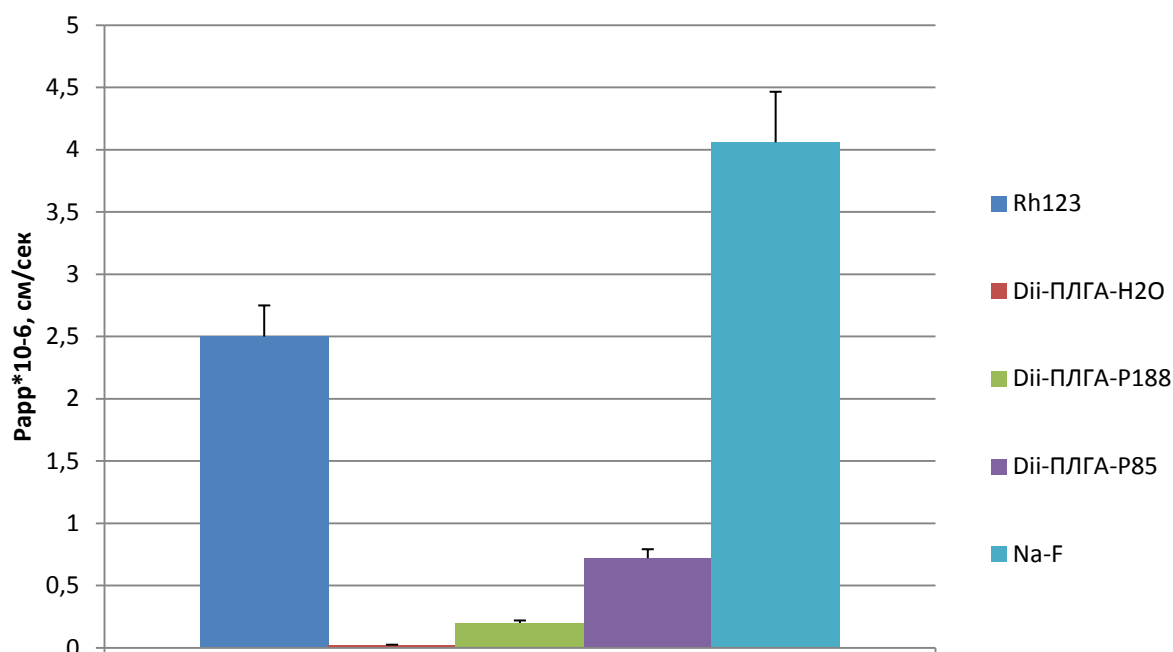


Рис. 8.8. Сопоставление коэффициентов проницаемости для ПЛГА наночастиц с размером $300\pm 50^{\times}$ нм в различных растворителях, нагруженных Dil, $p<0,05$.

В группе ПЛГА наночастиц с размером 150 нм с красителем Dil, наибольшие значения коэффициента проницаемости также наблюдались у наночастиц, растворенных в 1% водном растворе полоксамера P85 – $12,226\pm 3,147\times 10^{-6}$ см/сек. Также следует отметить, что в этой группе отмечалась повышенная проницаемость у частиц, растворенных в 1% водном растворе полоксамера 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 частицами, растворенными в воде для инъекций и контролями (рис. 8.7).

В группе ПЛГА наночастиц с размером 300 нм, окрашенных красителем Dil, значения коэффициентов проницаемости оказались ниже по сравнению с натрий флуоресцеином и родамином 123 (рис. 8.8). Полученные результаты

свидетельствуют о том, что данные частицы обладают очень низкой способностью проходить через смоделированный гистогематический барьер или вовсе не проходят через него. Несмотря на то, что частицы обладают низким коэффициентом проницаемости, в группе наблюдалась зависимость их проницаемости от типа растворителя. Так, наилучшие значения были получены для частиц в 1% водном растворе полоксамера P85, затем в водном растворе полоксамера 188 (рис. 8.9, табл. 8.1). В воде для инъекций исследуемые частицы не проходили через клеточную модель.

8.2. Изучение способности наночастиц проникать через интактный ГЭБ в эксперименте *in vivo*.

Исследование проницаемости интактного гематоэнцефалического барьера для наночастиц проводили на здоровых половозрелых мышах Balb/c весом 20 г и крысах Вистар весом 150 г. Препараты наночастиц в количестве 50 — 100 мкг на мышь (2,5 — 5 мг/кг) и 150 — 300 мкг на крысу (1 — 2 мг/кг) вводили внутривенно, после чего животных подвергали прижизненному анализу флюоресценции на приборе Ivis Spectrum CT. Однако достоверных данных при прижизненном исследовании флюоресценции у животных получить не удалось, вследствие низкого отношения сигнал-шум у живых животных за счёт мощной аутофлюоресценции шерсти животных. После транскардиальной перфузии животных и извлечения органов специфический флюоресцентный сигнал, напротив, детектировался с очень высокой достоверностью вследствие низкого уровня аутофлюоресценции в органах, что позволило провести количественный анализ накопления наночастиц, меченых DiI в органах экспериментальных животных через 2 и 24 часа после внутривенного введения.

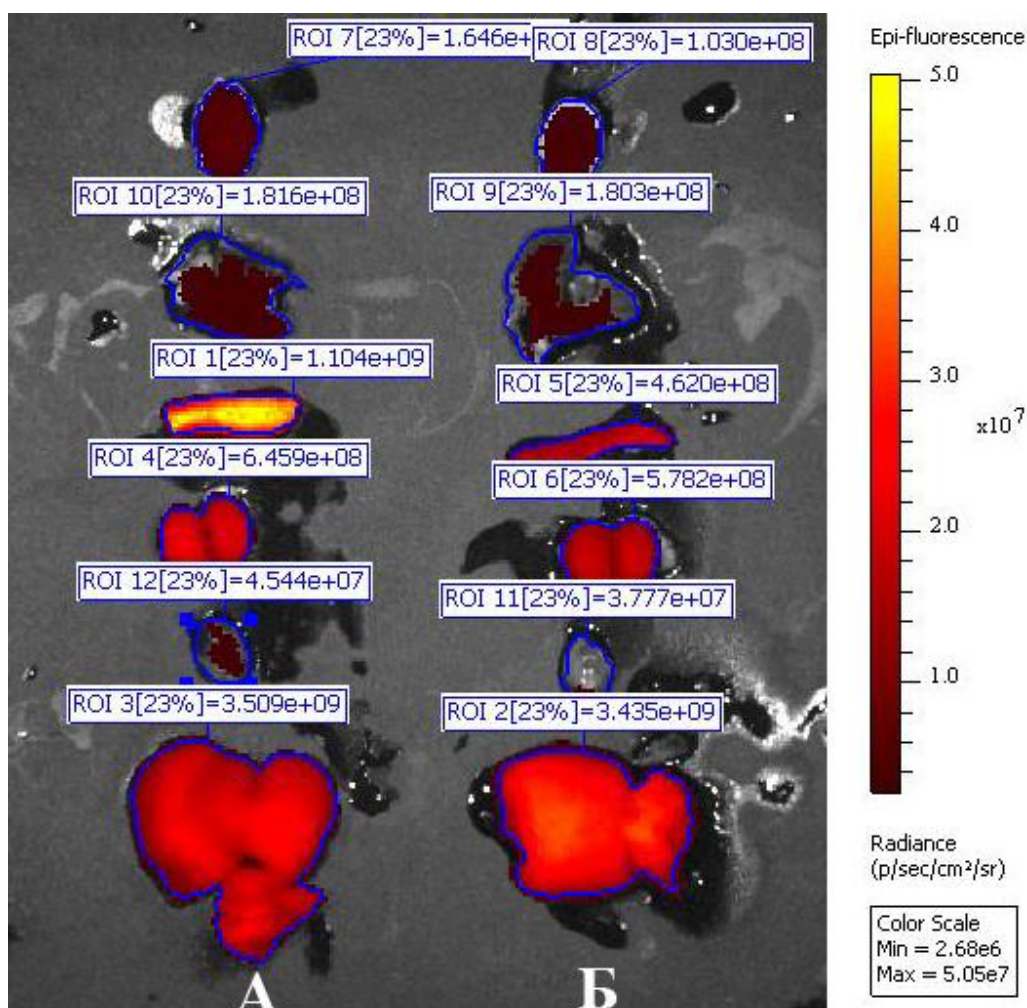


Рис. 8.9. Флюориметрический анализ органов крыс через 24 часа после внутривенного введения меченых DiI наночастиц, ресуспендированных в 1% растворе полуксамера 188 (А) и PBS (Б). Флюориметрическая детекция выполнена на приборе Ivis Spectrum CT в режиме автоматической экспозиции. Значения аутофлуоресценции вычтены.

Флюориметрия мозга мышей через 2 ч после введения наночастиц, меченных DiI в 1% водном растворе полуксамера 188 показала более интенсивный флуоресцентный сигнал, по сравнению с НЧ-DiI, разведенных в PBS (рис. 8.10). При этом у ряда животных абсолютные показатели интенсивности флуоресценции НЧ с полуксамером 188 в печени были меньше, чем аналогичные у НЧ, разведенных в фосфатном буфере. Это свидетельствует о том, что данная разница не обусловлена случайно введенным большим количеством НЧ с полуксамером.

Отношение интенсивности сигнала мозг/печень в случае НЧ-DiI-P188 составило 0,111; тогда как аналогичный показатель для НЧ-DiI-H₂O был равен 0,072. Таким образом, коэффициент распределения мозг/печень в случае наночастиц, разведенных в 1% водном растворе полоксамера 188, оказался на 35,1% (в 1,5 раза выше) выше, чем в случае наночастиц, разведенных в PBS. Эти данные свидетельствуют о преимущественном проникновении наночастиц, покрытых полоксамером 188 через интактный гематоэнцефалический барьер.

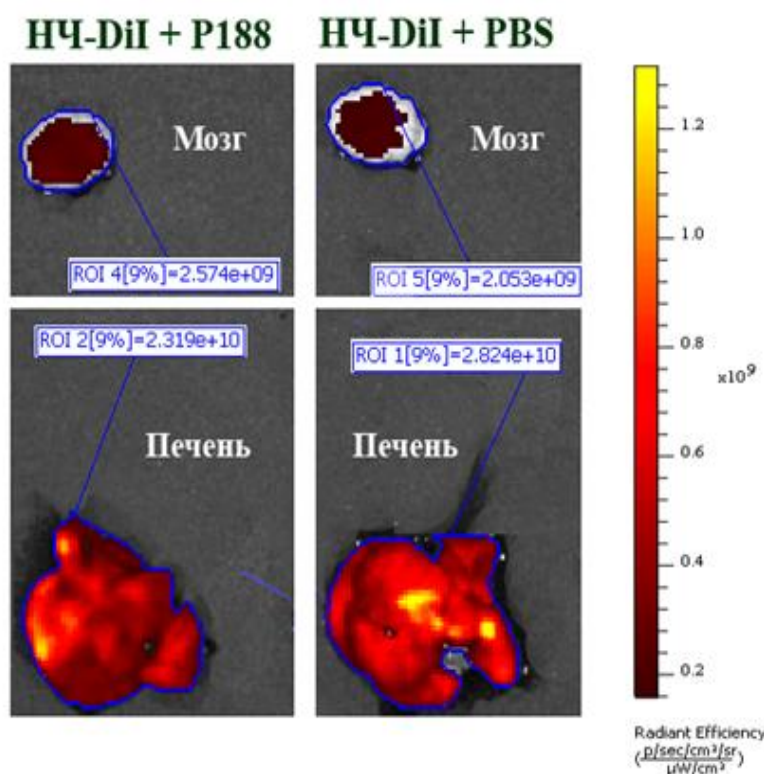


Рис. 8.10. Флюориметрический анализ мозга и печени мышей, получивших внутривенно ПЛГА наночастицы, меченные DiI в различных растворителях через 2 часа после внутривенного введения. Детекция флюоресценции на Ivis Spectrum CT (Ex = 530; Em = 580; автоматическая экспозиция).

Статистический анализ данных, полученных на Ivis Spectrum CT в эксперименте с внутривенным введением НЧ-PLGA-DiI мышам не выявил достоверных различий в значениях флюоресценции в мозге в зависимости от вида растворителя, ни в случае анализа общего количества фотонов, ни в случае анализа показателя флюоресценции, нормированного на площадь

(Рис. 8.11). Вместе с тем, при оценке относительного накопления флюоресцентного сигнала было обнаружено, что у животных, получивших НЧ-PLGA-DiI, разведенные в 1% полоксамере 188 в мозге накапливается 3,8% от суммарного значения флюоресценции всех исследуемых органов. У животных, получивших DiI-PLGA-НЧ в PBS этот показатель составил 2,6% (Рис.8.11).

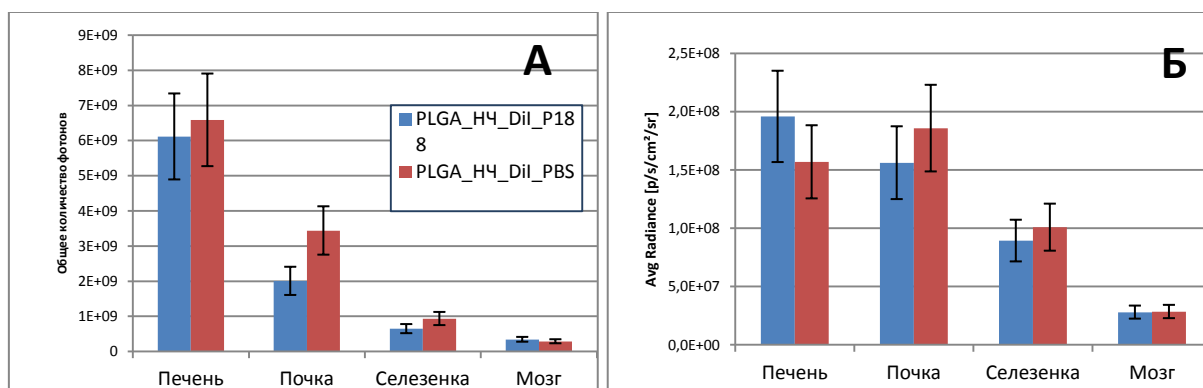


Рис. 8.11. Результаты статистического анализа данных Ivis Spectrum CT по детекции флюоресценции органов исследованных мышей через 2 часа после внутривенного введения наночастиц в различных растворителях. А. Данные по общему количеству фотонов. Б. Показатель флюоресценции, нормированный на площадь (ф/сек/см²).

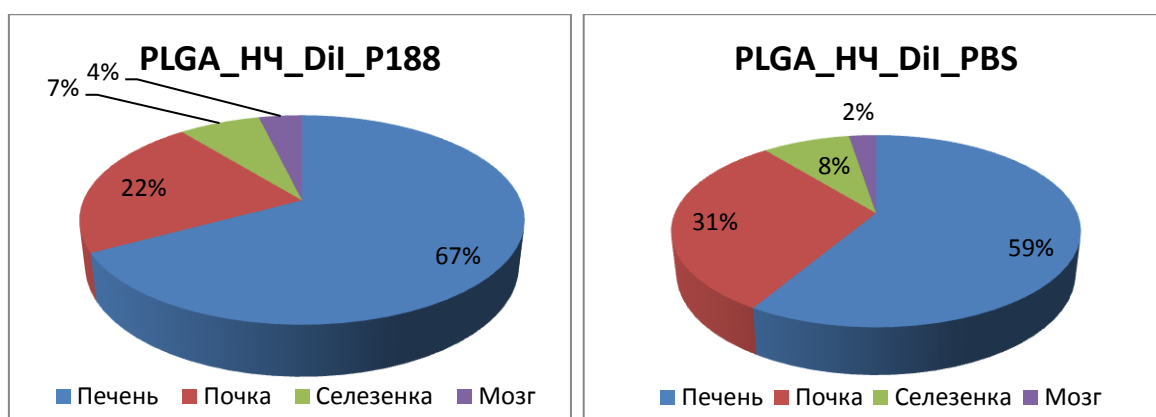


Рис. 8.12. Распределение флюоресцентного сигнала PLGA-НЧ по органам в зависимости от вида растворителя через 2 часа после внутривенного введения наночастиц.

Высококочувствительная лазерная сканирующая конфокальная микроскопия позволила визуализировать сигнал от DiI в клетках коры мозга (нейроны и/или крупные глиальные клетки) как в случае с НЧ-DiI-P188, так и в случае НЧ-DiI, разведенных в PBS (Рис.8.13; 8.14; 8.15). Наночастицы, меченые DiI, детектировались в виде внутриклеточных включений среднего размера, предположительно — в эндосомах (Рис.8.13). Во всех случаях внутривенного введения НЧ отмечалась интенсивная флюоресценция в клетках печени (Рис.8.14).

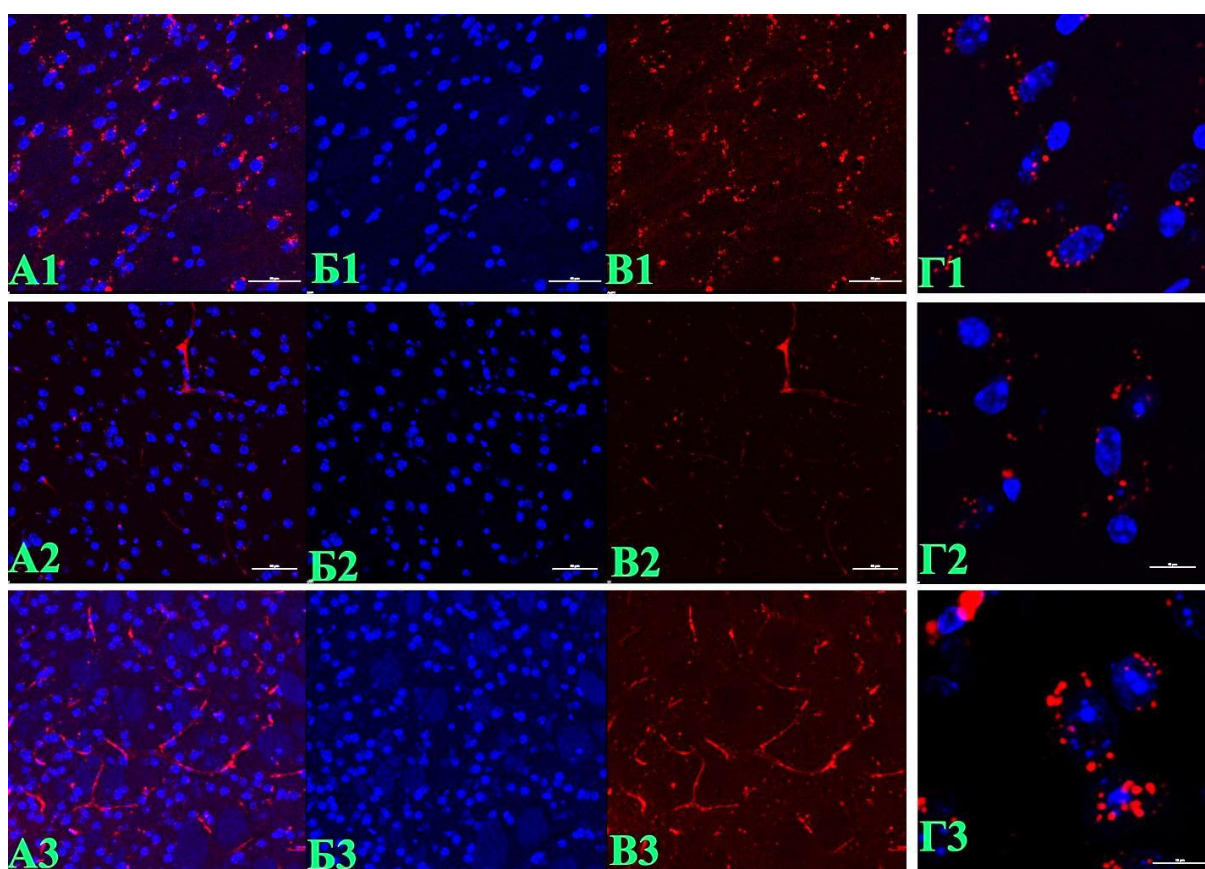


Рис. 8.13. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия на срезах мозга мышей через 2 часа после внутривенного введения наночастиц: 1. Полилактидные НЧ с красителем DiI, ресуспендированные в 1 % полуксамере Р 85, детекция флюоресценции DiI. 2. Полилактидные НЧ с красителем DiI, ресуспендированные в PBS, детекция флюоресценции DiI. 3. Полилактидные НЧ с красителем DiI, ресуспендированные в 1% растворе полуксамера 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.

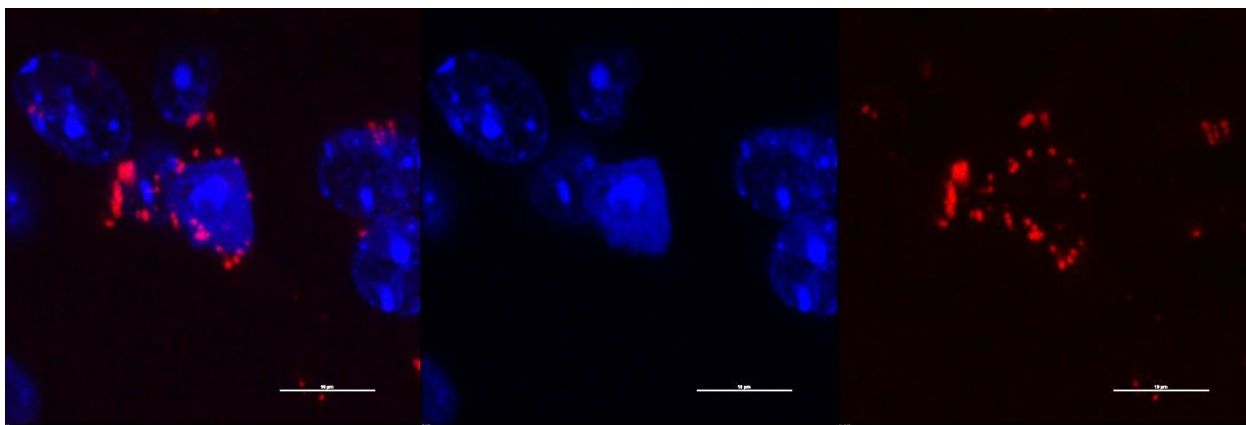


Рис. 8.14. Увеличенное изображение внутриклеточного накопления полилактидных наночастиц, меченных с помощью DiI. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия. Отрезок – 10 мкм. Флюоресцентные каналы те же, что и на Рис.8.13.

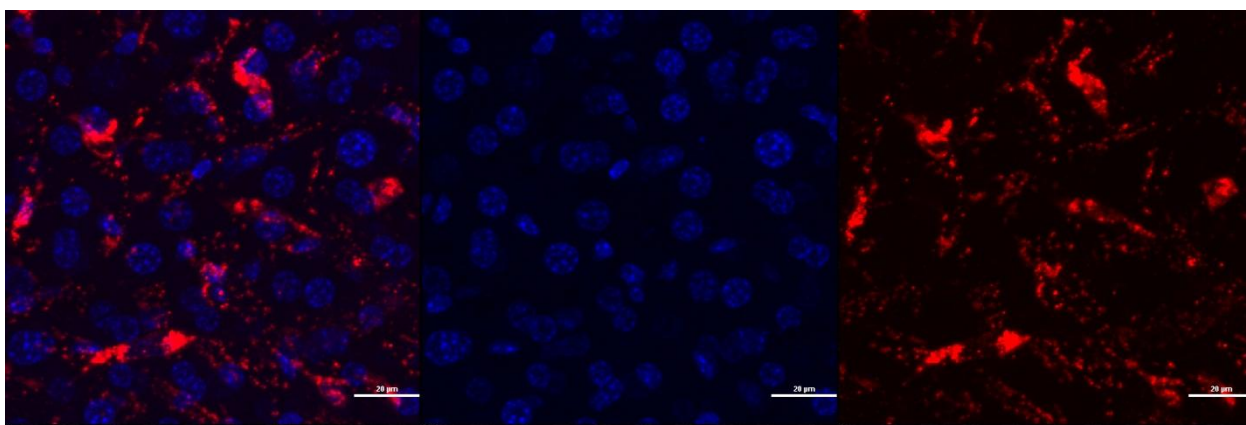


Рис. 8.15. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия полилактидных наночастиц, ресуспендированных в 1 % растворе полоксамера 188 на срезах печени через 2 часа после внутривенного введения. Флюоресцентные каналы те же, что и на Рис.8.14. Отрезок – 20 мкм.

Полученные данные свидетельствуют о том, что введенные внутривенно ПЛГА наночастицы, разведенные в 1% полоксамере 188, проникают через интактный ГЭБ мышей и способны накапливаться в клетках нервной ткани.

Оценка интенсивности флюоресценции на срезах мозга мышей и крыс через 2 и 24 часа после внутривенного введения DiI-PLGA-НЧ показала, что наибольшее количество частиц обнаруживается в хориоидальных скоплениях боковых желудочков головного мозга через 24 часа после введения

(Рис.8.16). Анализ суммарных данных по накоплению DiI-PLGA-НЧ размером 150 нм в мозге мышей после внутривенного введения в дозе 100 мкг на животное не выявил достоверных различий в группах мышей, получивших наночастицы, растворенные в полоксамере и PBS, однако как и при анализе данных Ivis Spectrum СТ наблюдалась отчётливая тенденция проявления более высоких значений интенсивности флюоресценции в мозге у животных, получивших наночастицы, разведенные в 1% полоксамере 188 (Рис.8.17). Так, средняя интенсивность флюоресценции мозга у животных в этой группе составила $136,3 \pm 7,0$ УЕ, в то время как в группе, где в качестве растворителя использовали PBS средняя интенсивность флюоресценции срезов головного мозга составляла $122,8 \pm 7,9$ УЕ. Интенсивность флюоресценции на срезах печени в этих группах практически не отличалась.

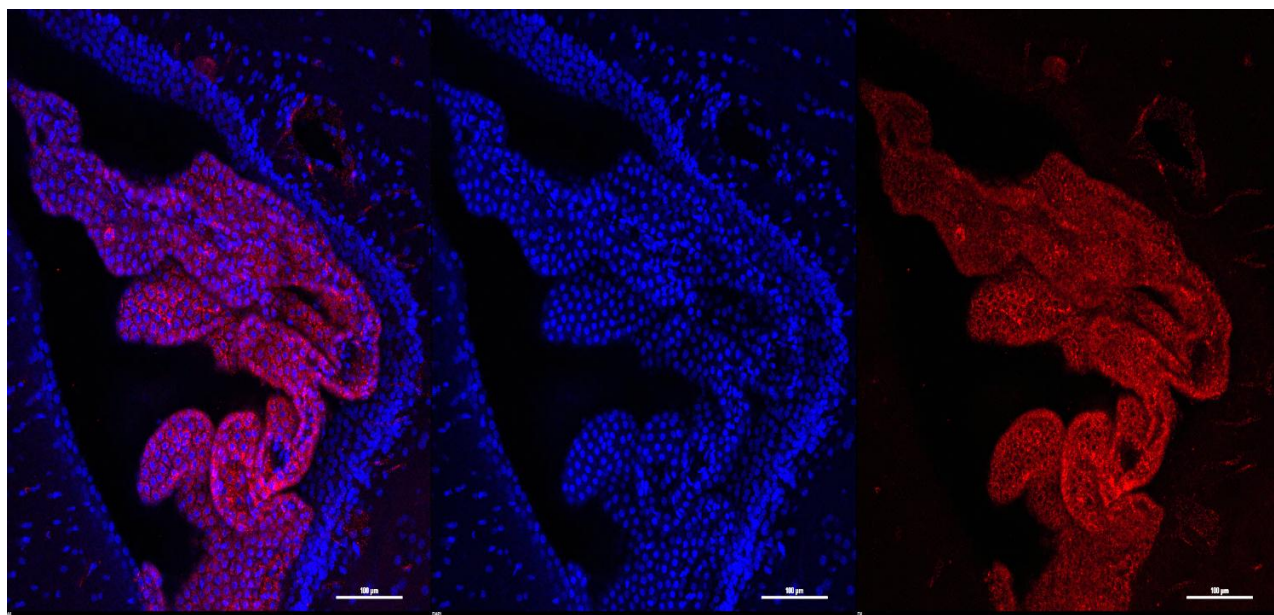


Рис. 8.16. Накопление PLGA-НЧ, меченных DiI в хориоидальном сплетении боковых желудочков мозга крысы через 24 часа после внутривенного введения. Слева –объединенное изображение. В центре – окрашивание ядер с помощью Hoechst. Справа – флюоресценция DiI.

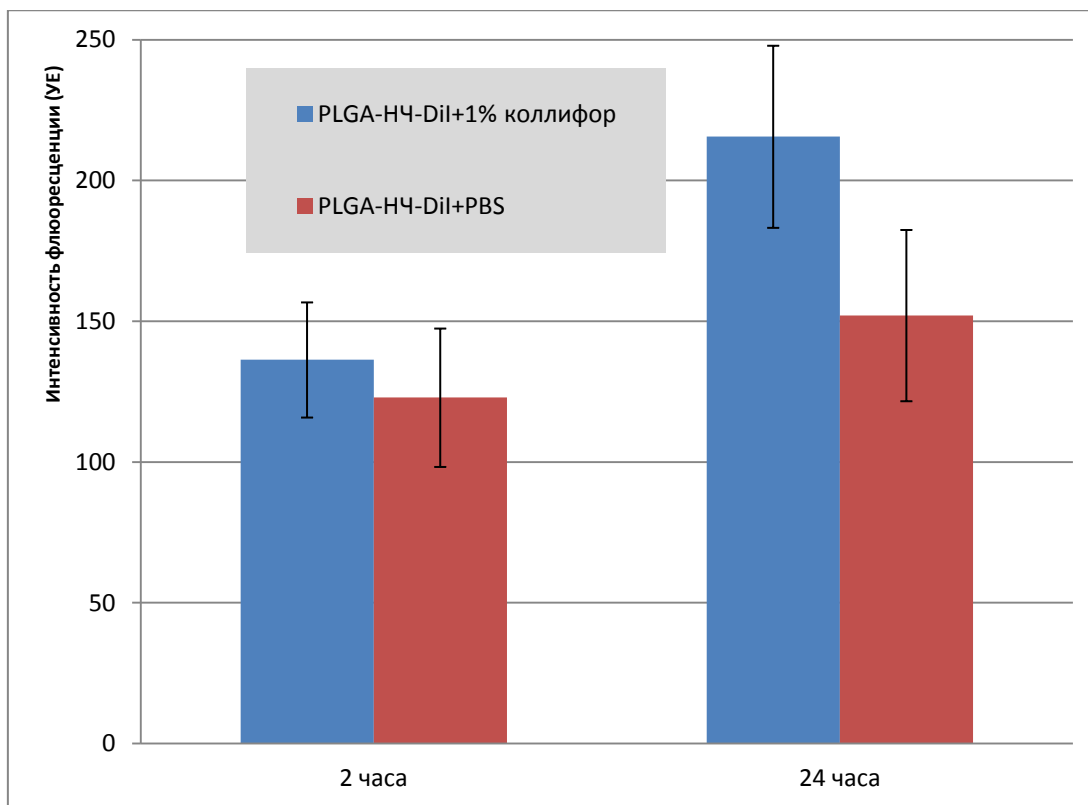


Рис. 8.17. Количественный анализ данных накопления ПЛГА НЧ, меченых DiI в мозге экспериментальных животных через 2 и 24 часа после внутривенного введения.

При повторении экспериментов с внутривенным введением PLGA-НЧ, меченных 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 мы наблюдали интенсивную флюоресценцию эндотелиоцитов церебральных микрососудов за счёт накопления DiI-меченых НЧ. Однако, методически не представлялось возможным изолированно сравнить интенсивность флюоресценции эндотелиоцитов в группах, получивших НЧ-DiI в разных растворителях, хотя, и в том и в другом случае интенсивность флюоресценции микрососудов была высока (Рис.8.18).

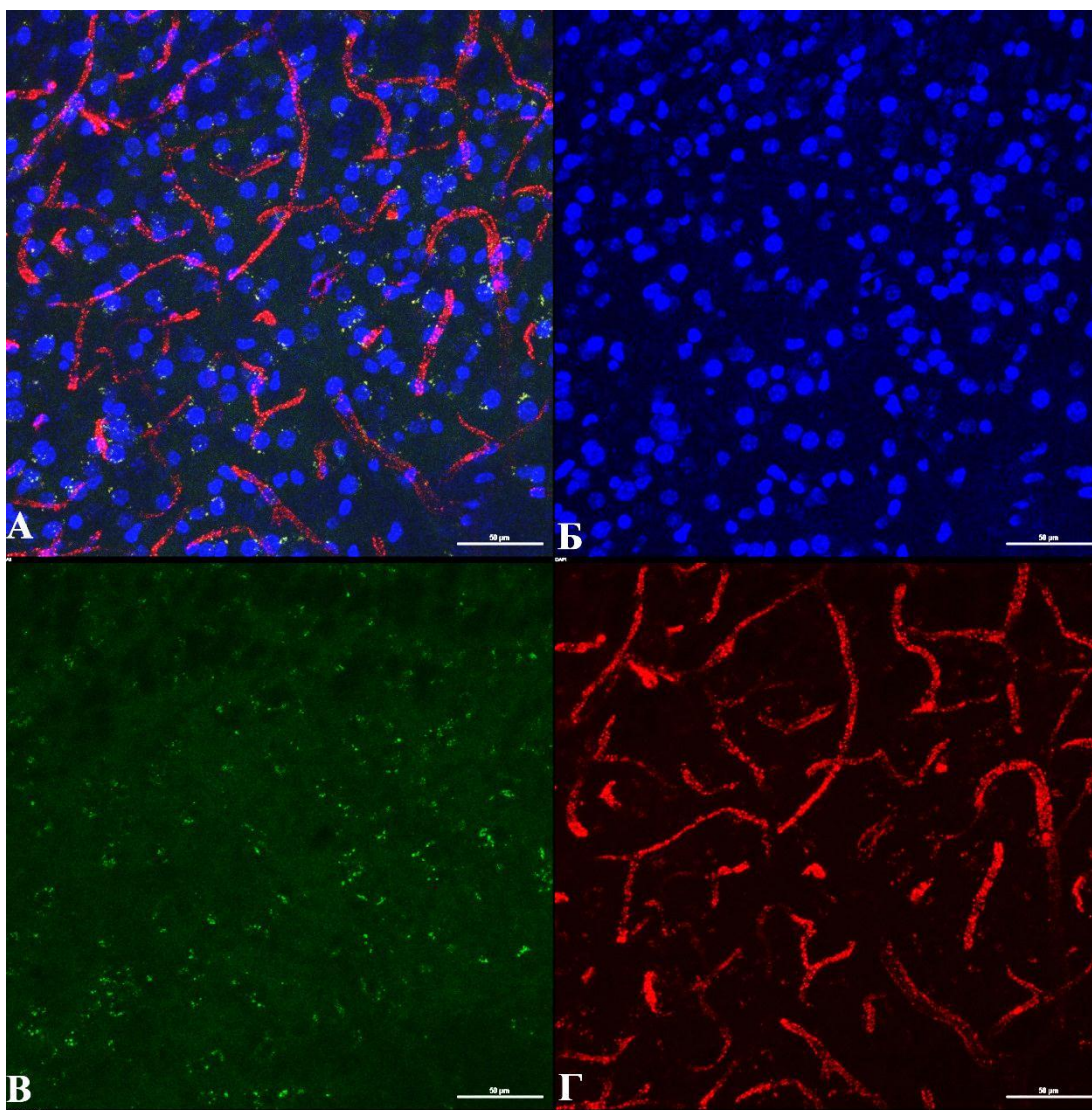


Рис. 8.18. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия на срезах мозга мышей через 2 часа после внутривенного введения DiI-PLGA-НЧ (150 нм), разведенных в 1% полуксамере 188. А. Объединённое изображение. Б. Докрашивание ядер клеток с помощью Hoechst. В. Контроль аутофлюоресценции в зелёном канале. Г. Флюоресценция DiI с пиком эмиссии 560 нм. Отрезок – 50 мкм.

Помимо накопления НЧ с DiI в эндотелиоцитах церебральных микрососудах также было обнаружено накопление их в некоторых субпопуляциях нейронов. В частности, относительно интенсивная флюоресценция наблюдалась на срезах мозжечка в зоне локализации клеток Пуркинье (Рис.8.19).

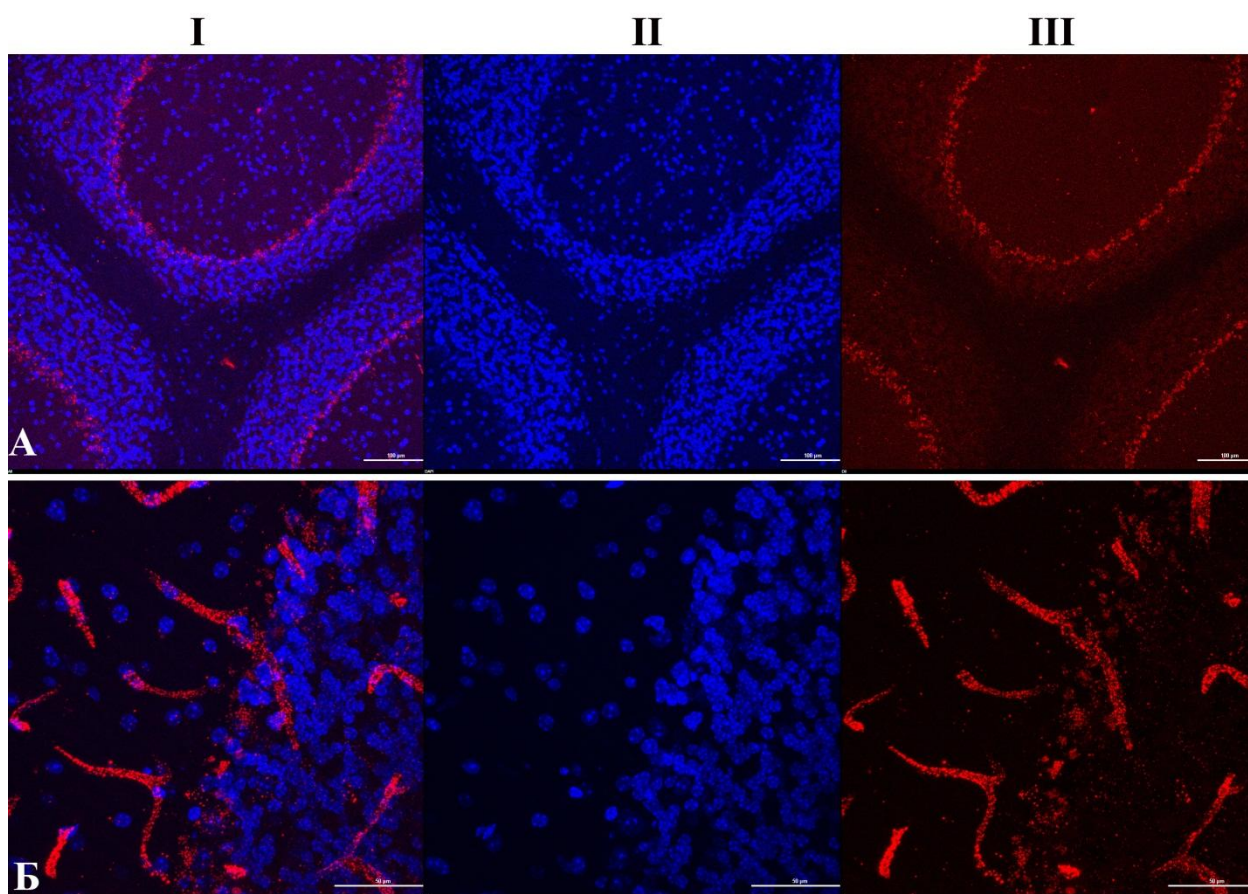


Рис.8.19. Накопление ПЛГА наночастиц, меченных DiI и растворенных в поллоксамере Р 85 (А) и ПЛГА наночастиц, меченных DiI и растворенных в поллоксамере Р 188 (Б) в клетках Пуркинье через 2 часа после внутривенного введения мышам с интактным ГЭБ. А. Обзорная микрофотография коры мозжечка (введение ПЛГА НЧ, меченных DiI). Отрезок — 100 мкм. Б. Увеличенный фрагмент коры мозжечка (введение ПЛГА НЧ, меченных DiI). Отрезок – 50 мкм. I. Объединённое изображение красного и синего каналов. II. Ядра клеток, докрашенные Hoechst. III. Флюоресценция DiI. Хорошо визуализируется зона локализации клеток Пуркинье. В контрольных препаратах подобное окрашивание отсутствует.

Сравнение интенсивностей флюоресценции DiI-PLGA-НЧ в мозге крыс через 24 часа после внутривенного введения показало, что в случае растворения НЧ в 1% поллоксамере среднее значение интенсивности флюоресценции составляет $215,57 \pm 28,01$ УЕ, тогда как при введении такого же количества DiI-PLGA-НЧ, разведенных в PBS, интенсивность флюоресценции мозга составляла $152,06 \pm 10,76$ УЕ. Статистический анализ

10 полей зрения на препаратах каждого мозга показал, что данные различия достоверны при сравнении с помощью t-критерия Стьюдента.

Иммунофлюоресцентная визуализация нейронов и астроглии с помощью антител к бета-III-тубулину и астроглиальному маркеру – глиофибриллярному кислому протеину (GFAP) соответственно подтвердила накопление НЧ в отдельных субпопуляциях нейронов (Рис. 8.20). Астроциты, несмотря на описанную их способность к фагоцитозу, НЧ не накапливали (Рис.8.21).

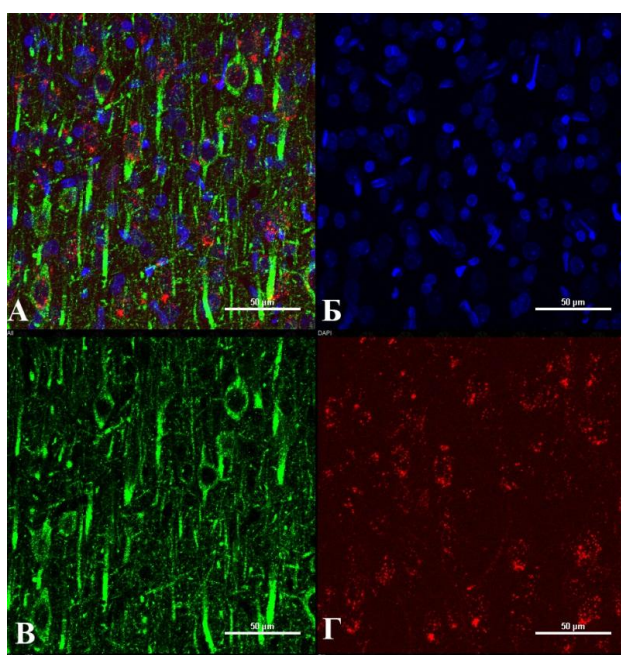


Рисунок 8.20. Визуализация клеток, накапливающих DiI-PLGA-НЧ в интактной нервной ткани. А. Объединённое изображение. Б. Ядра клеток, докрашенные Hoechst В. бета-III-тубулин позитивные нейроны коры головного мозга. Г. Флюоресценция DiI. Визуализируется накопление НЧ в нейронах. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия. Отрезок – 50 мкм.

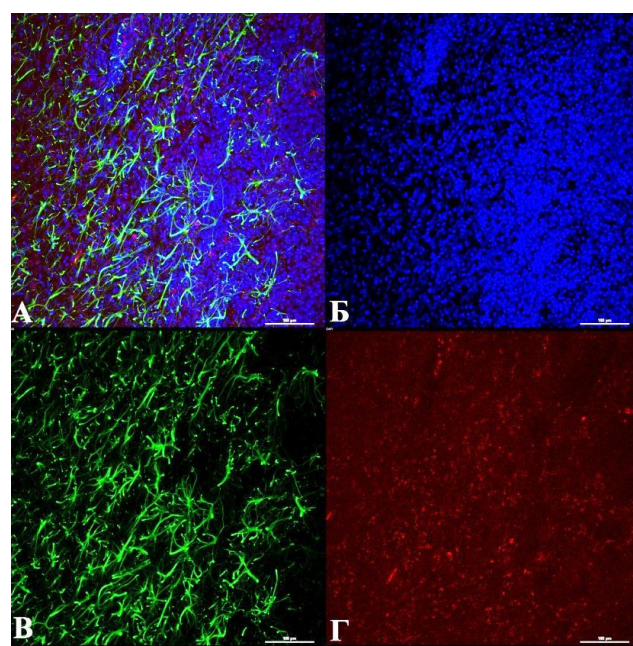


Рисунок 8.21. Визуализация клеток, накапливающих DiI-PLGA-НЧ в интактной нервной ткани. А. Объединённое изображение. Б. Ядра клеток, докрашенные Hoechst В. GFAP-позитивные астроциты. Г. Флюоресценция DiI. Накопления флюоресценции DiI в астроцитах. не наблюдается. Сканирующая лазерная конфокальная микроскопия. Отрезок – 50 мкм.

Заключение.

В ходе изучения проницаемости различных наночастиц на модели ГЭБ *in vitro* было выявлено, что наибольшей проницаемостью обладают ПЛГА наночастицы размером 150 нм с поверхностью, модифицированной полоксамером 188 или полоксамером 85. ПБЦА наночастицы размером 190 нм, растворенные 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 сканирующей лазерной конфокальной микроскопии подтвердили накопление ПЛГА наночастиц с модифицированной ПАВ поверхностью в клетках нервной ткани в опытах *in vivo*. Кроме того, количественный анализ флуоресценции в экспериментах *in vivo* показал преимущественное накопление ПЛГА наночастиц, растворенных в полоксамере 188, преимущественно в мозге и, в меньшей степени, в печени.

Таким образом, ПЛГА наночастицы размером $150 \pm 30^*$, модифицированные полоксамером 188 или полоксамером 85, а также ПБЦА наночастицы размером $190 \pm 50^*$, модифицированные полисорбатом 80, могут быть эффективной системой доставки в мозг различных ЛВ, в том числе, являющихся субстратом Р-gr.

Обсуждение результатов

Наличие ГЭБ является существенным препятствием для проникновения в мозг большинства лекарственных препаратов, включая цитостатики, антибактериальные антибиотики, препараты для лечения нейродегенеративных заболеваний и т.д. Вследствие этого многие потенциально эффективные ЛВ, предназначенные для лечения заболеваний ЦНС, обладая достаточно высокой активностью в исследованиях *in vitro*, не проявляют фармакологической активности при введении в организм, так как ГЭБ препятствует поступлению этих веществ в мозг в терапевтически значимых концентрациях.

Существуют различные подходы для доставки в мозг ЛВ, неспособных преодолевать ГЭБ. В частности, доставку в мозг можно обеспечить за счет одновременного внутривенного введения ЛВ и гиперосмотического раствора, в частности раствора маннита, способствующего неспецифическому повышению проницаемости ГЭБ. Подобный эффект может быть также достигнут введением брадикинина или его аналогов. Однако, в клинической практике возможность применения этого метода зачастую лимитирована значительным повышением токсичности ЛВ в результате подавления защитной функции эндотелиоцитов, образующих ГЭБ [Groothuis D.R., 2000, Кобяков Г.Л., 2011]. Также возможно локальное (интрацеребральное) введение ЛВ. Указанный способ введения позволяет существенно повысить содержание ЛВ в тканях мозга, однако является инвазивным и при этом сопряжен с достаточно высоким риском для пациента. Кроме того, при интрацеребральном введении диффузия ЛВ в ткани мозга из места введения ограничена, что в определенной мере не позволяет получить желаемый результат от терапии [Pardridge W.M., 2002].

Системы доставки ЛВ в мозг, представляющие собой конъюгаты со специфическими векторными молекулами (в основном, антителами), обладают определенными преимуществами, поскольку в этом случае клеточный эндоцитоз осуществляется за счет эндогенных транспортных

механизмов. Вместе с тем, недостаточная емкость носителя-вектора не позволяет обеспечить загрузку достаточным количеством ЛВ [Pardridge W.M., 2003].

Более высокую степень загрузки ЛВ можно получить при использовании липосом. Показано, что иммунолипосомы способны обеспечить транспорт в мозг противоопухолевого антибиотика антрациклинового ряда дауномицина [Huwyler J., 1996] за счет рецептор-опосредованного эндоцитоза, однако эффективность этой системы для химиотерапии злокачественных новообразований мозга пока не изучена. Следует отметить, что клиническая эффективность неекторизованной липосомальной формы доксорубицина при лечении первичных и вторичных злокачественных опухолей мозга невысока [Fabel K., 2004].

Таким образом, несмотря на определенные успехи в области создания препаратов на основе различных систем доставки, разработка неинвазивных и безопасных методов направленного транспорта ЛВ в мозг по-прежнему остается важной проблемой, решение которой может быть достигнуто при использовании новых стратегических подходов.

Одним из перспективных направлений исследования в этой области является создание систем доставки на основе биodeградируемых и биосовместимых полимерных НЧ. Ранее было показано, что транспорт в мозг ЛВ, не способных в свободной форме преодолевать ГЭБ, можно осуществить с использованием полимерных систем доставки на основе ПБЦА НЧ с поверхностью, модифицированной полисорбатом 80. Используя указанный носитель, удалось доставить в мозг гексапептид даларгин, четвертичное аммониевое соединение - прозерин, а также лоперамид и доксорубицин - вещества, являясь субстратами Р-гликопротеина, не способны преодолеть ГЭБ [Басель А., 2006; Alyautdin R, 1995; 1997; Gulyaev A.E., 1999; Ambrosi A., 2006; Kreuter J., 2007; 2008]. Впоследствии, применяя ПБЦА наночастицы, покрытые ПС80 и ПЛГА наночастицы, модифицированные полоксамером 188, нам удалось обеспечить транспорт в

мозг веществ макромолекулярной природы - белков с нейротрофической активностью: фактора роста нервов и низкосиалированного рекомбинантного эритропоэтина человека. Факт прохождения этих веществ в составе наночастиц через ГЭБ был подтвержден в фармакологических тестах, демонстрирующих центральное действие наносомальных форм, тогда как субстанции такого действия не оказывали. Кроме того, содержание ФРН и нсРЭЧ в мозге экспериментальных животных существенно повышалось только при введении их наносомальных форм. Полученные результаты позволили сформулировать новую концепцию о том, что наночастицы могут быть эффективной системой доставки в мозг ЛВ, не способных в свободном виде преодолевать ГЭБ.

В задачи настоящего исследования входила разработка технологии и подходов к стандартизации наносомальных форм ФРН, нсРЭЧ, феназепам и паклитаксела. Следует отметить, что в отличие от традиционных лекарственных форм, описанных в различных фармакопеях, наносомальные формы по своим характеристикам существенно отличаются, что предопределило необходимость формулировки ряда критериев, позволяющих проводить стандартизацию разрабатываемых наносомальных форм.

В виду того, что разрабатываемые экспериментальные формы предназначены для парентерального (внутривенного) введения важным параметром стандартизации является размер частиц, который должен быть менее 1000 нм, чтобы не вызвать тромбоз мелких капилляров. В проведенных нами исследованиях использовались наночастицы размером от 70 до 300 нм.

Одним из основных параметров, определяющих выраженность фармакологического эффекта наносомальных форм, является степень сорбции/включения ЛВ в полимерный носитель. По нашим данным она должна составлять не менее 50 % при соотношении ЛВ/полимер не менее 1:20. При этом, как показывают результаты проведенных исследований

степень сорбции ЛВ зависит от типа и концентрации стабилизатора, заряда частицы, природы модифицирующего агента. Таким образом, варьируя указанные параметры можно оптимизировать степень сорбции ЛВ.

Поскольку наносомальные формы представляют собой лиофилизаты для приготовления инъекционных растворов важным параметром оценки качества является устойчивость НЧ к лиофилизации. После добавления растворителя к лиофилизату должна образовываться устойчивая гомогенная коллоидная система, не содержащая агломератов, о чем свидетельствуют значения индекса полидисперсности. Индекс полидисперсности – это безразмерная мера ширины распределения частиц по размерам. Вычисление среднего диаметра частиц и индекса полидисперсности проводится автоматически программным обеспечением наносайзера в соответствии с Международным стандартом ISO 13321: 1996(E). Практически в области фармацевтических нанотехнологий считается, что величина индекса полидисперсности менее 0,2 свидетельствует о достаточно узком распределении частиц по размерам. Индекс полидисперсности для наносомальных форм нсРЭЧ на основе ПБЦА и ПЛГА НЧ составил от 0,1 до 0,2 как до лиофилизации, так и после восстановления лиофилизата растворителем.

Полученные нами наносомальные формы, использованные в фармакологических исследованиях, отличались хорошей ресуспендируемостью и стабильностью при хранении.

Согласно существующим представлениям доставка ЛВ в мозг в составе наночастиц осуществляется при участии следующих основных механизмов [Гельперина С.Э., 2010; Begley D.J. 2004; Kreuter J., 2013]:

1. Взаимодействие НЧ или ПАВ, входящих в состав НЧ, с эндотелиальными клетками капилляров мозга, приводящее к неспецифическому повышению проницаемости ГЭБ (то есть значительное повышение проницаемости мембран эндотелиоцитов и/или нарушение плотных контактов между эндотелиоцитами). В этом

случае циркулирующие в крови НЧ и связанные с ними ЛВ могут проникнуть в мозг (токсический эффект).

2. Проникновение ЛВ через ГЭБ в результате существенного повышения градиента концентрации между кровью и мозгом (то есть при повышении концентрации связанного с НЧ ЛВ в крови).
3. Рецептор-опосредованное взаимодействие НЧ с мембранами эндотелиоцитов капилляров мозга с последующим эндоцитозом или удерживание НЧ вблизи мембраны эндотелиоцита. В случае эндоцитоза происходит внутриклеточная биodeградация НЧ с последующим выделением ЛВ из полимерного матрикса и поступление его в ткань мозга через апикальную мембрану эндотелиоцита. Во втором случае выделение ЛВ из НЧ осуществляется в непосредственной близости от клетки. При этом может создаваться определенное микроокружение, способствующее проникновению ЛВ через мембрану эндотелиоцита в мозг.
4. Подавление активности АТФ-зависимых трансмембранных эффлюксных белков, в частности Р-gp, препятствующих проникновению субстратов в эндотелиальные клетки.

Первый из вышеназванных механизмов, а именно повышение проницаемости ГЭБ в результате токсического воздействия НЧ или ПАВ на эндотелиальные клетки нам кажется маловероятным, поскольку в проведенных многочисленных экспериментах *in vivo* не наблюдались проявления нейротоксичности. При этом, в случае нарушения барьерной функции ГЭБ ЛВ проникали бы через поврежденный ГЭБ по механизму простой диффузии и не было бы необходимости связывать ЛВ с НЧ.

Для подтверждения этой гипотезы был проведен эксперимент, позволяющий оценить целостность ГЭБ после внутривенного введения ПБЦА НЧ с поверхностью, модифицированной ПС 80. В эксперименте изучали антиноцицептивное действие наносомальной формы даларгина на основе ПБЦА НЧ в сравнении с субстанцией [Kreuter J., 1997]. Даларгин

является агонистом опиоидных рецепторов, однако не обладает анальгезирующим действием при внутривенном введении так как является субстратом Р-гр. Вместе с тем, как ранее показал Аляутдин Р.Н., даларгин в составе ПБЦА НЧ, покрытых ПС80, значительно снижает порог болевой чувствительности у мышей [Alyautdin R., 1995]. Более того, анальгезирующий эффект даларгина устранялся блокатором опиоидных рецепторов – налоксоном, что свидетельствует о взаимодействии связанного с ПБЦА НЧ даларгина на опиоидные рецепторы ЦНС, то есть о его прохождении через ГЭБ. Антиноцицептивное действие наносомальной формы даларгина оценивали в тесте отдергивания хвоста (tail-flick test). Полученные результаты свидетельствуют о том, что значительное снижение порога болевой чувствительности у мышей достигалось только при введении даларгина, связанного с НЧ, с поверхностью, модифицированной ПС80. Анальгезирующее действие субстанции даларгина или отдельно введенных НЧ было незначительно. При последовательном введении НЧ и субстанции даларгина (через 5, а затем 30 минут после введения НЧ) не наблюдалось увеличения анальгезирующего эффекта.

Из результатов проведенного эксперимента следует, что при внутривенном введении НЧ, в том числе, с ПС 80, не происходит достаточного повышения проницаемости ГЭБ, позволяющего проникнуть через него субстратам Р-гр. Кроме того, низкомолекулярные субстраты Р-гр могут проникать в мозг только в составе НЧ, покрытых ПС 80.

Проникновение наночастиц в мозг без нарушения структурной целостности ГЭБ было подтверждено при использовании электронной микроскопии [Zensi A., 2010] и гистологических исследований [Steiniger S. C., 2004; Nekmatara T., 2009], которые не выявили проявлений токсического воздействия при введении наносомальных форм препаратов. Также было показано, что увеличение проницаемости ГЭБ вследствие применения ПАВ не происходит. Наночастицы с даларгином, покрытые различными ПАВ - полуксамером 184, 338, 407, полуксамином 908, Cremophor® EZ,

Cremophor®RH 40, полиоксиэтилен-(23)-лауриловым эфиром (Brij® 35), не оказывали фармакологического эффекта [Kreuter J., 1997]. В экспериментах Koziara с соавт. [Koziara M. J., 2003] было подтверждено, что в основе прохождения наночастиц через ГЭБ токсическое воздействие отсутствует. Кроме того, исследования с применением электронной микроскопии, проведенные Zensi с соавт. [Zensi A., 2010] и Kreuter с соавт. [Kreuter J., 2007], показали, что плотные контакты после внутривенного введения наночастиц, покрытых различными ПАВ, не разъединялись. Последние результаты также подтверждаются данными, согласно которым перфузия мозговой ткани крыс инулином не привела к увеличению накопления вещества [Аляутдин Р.Н., 2008].

Отсутствие нарушений барьерных функций при инкубации с наночастицами было также подтверждено нами в эксперименте *in vitro* на модели ГЭБ, основанной на кокультивировании первичной монослойной культуры эндотелиоцитов пупочной вены человека (HUVEC) и аллогенных астроцитов на полупроницаемых вставках Transwell® [Langford D., 2005, Wilhelm I., 2011]. В качестве маркера параклеточной проницаемости использовали флюоресцеин натрия. Количество флюоресцеина натрия, проникающего через ГЭБ, не изменялось при инкубации клеток как с ПБЦА, так и с ПЛГА наночастицами в присутствии Р 188 и ПС 80.

Таким образом, как показывают результаты исследований *in vivo* и *in vitro*, проникновение НЧ и/или связанных с ними ЛВ в мозг не опосредовано нарушением барьерной функции ГЭБ.

Непроницаемость ГЭБ для ЛВ относительна, поскольку способность ЛВ проникать через ГЭБ в значительной мере определяется концентрацией этих веществ в системном кровотоке. В соответствии с правилом фармакокинетики, сформулированным У. Пардриджем [Pardridge W., 2003]: количество вещества, проникающего в мозг, пропорционально величине интегрального показателя площади под фармакокинетической кривой и коэффициенту проницаемости ГЭБ. Таким образом, содержание в мозге ЛВ

будет возрастать при повышении его концентрации и времени нахождения в крови.

С целью увеличения времени циркуляции ЛВ в качестве носителей используют длительно циркулирующие в кровотоке НЧ. Принципиальным подходом в создании подобных частиц является гидрофилизация их поверхности за счет создания пространственного (стерического) барьера, препятствующего сорбции белков. При этом создается так называемый «стелс-эффект» (от англ. *stealth*-невидимый), позволяющий НЧ сделать «невидимыми» для клеток ретикулоэндотелиальной системы. Технология «стелс» позволяет обеспечить длительную циркуляцию НЧ в крови, и, соответственно, должна способствовать проникновению НЧ и связанного с ними ЛВ в мозг. Однако в случае ПБЦА НЧ, модифицированных ПС 80, указанная закономерность не прослеживается. Действительно, как показывают данные фармакокинетического исследования наносомальной формы доксорубина [Ambrosi A., 2006], и влияния ПС 80 на распределение НЧ [Gao K., 2006], эффективность этого ПАВ как стелс-агента невысока. Покрытие поверхности ПБЦА-НЧ-ПС 80 привело лишь к незначительному повышению концентрации доксорубина в плазме, тогда как показатель AUC для мозга почти в 10 раз превышал соответствующий показатель для плазмы. При этом только введение модифицированных ПС 80 НЧ привело к достижению в мозге весьма высокой концентрации доксорубина – 6 мкг/г, в то время как при введении немодифицированных НЧ концентрации оставались ниже 0,1 мкг/кг. Таким образом, модификация НЧ ПС 80 позволила повысить концентрацию доксорубина в мозге, по крайней мере, в 60 раз [Gulyaev A.E., 1999].

Из представленных выше данных следует, что в проникновении НЧ и связанных с ними ЛВ в мозг участвуют различные механизмы. Прохождение ЛВ через ГЭБ с помощью длительно циркулирующих НЧ может быть результатом повышения концентрации НЧ и связанных с ними ЛВ в крови и обусловлен ростом градиента концентраций в системе кровь - мозг. Вместе с

тем, ряд экспериментальных данных указывает на то, что эффективность носителей зависит не только (и не столько) от длительности циркуляции и достижения пиковых концентраций в плазме, но и возможностью контакта НЧ с мембранами эндотелиоцитов, которая, в свою очередь, зависит от свойств поверхности (в том числе и от типа модифицирующего агента).

Несомненно, что феноменальный эффект ПС 80 в случае ПБЦА НЧ, нагруженных доксорубицином, – 60-кратное увеличение концентрации доксорубицина в мозге не зависит от незначительного повышения градиента концентрации в системе кровь-мозг. Вероятно, что проникновение в мозг опосредовано другими механизмами.

Описанные выше явления в определенной мере объясняет гипотеза, согласно которой ПБЦА НЧ, модифицированные ПС 80, подвергаются рецептор-опосредованному эндоцитозу эндотелиальными клетками капилляров мозга.

В исследованиях *in vitro* было продемонстрировано наличие эндоцитоза в эндотелиоцитах при введении наночастиц, покрытых полисорбатом 80 и полоксамером 188. В указанных работах использовали эндотелиальные клетки мышей [Zensi A., 2010], крыс [Kreuter J., 2007], бычьи клетки [Ramge P., 2000], свиные клетки [Wagner S., 2010] и клетки человека [Ramge P., 2000]. В исследованиях *in vitro* на нейронах [Hasadsri L., 2009], клетках глиобластомы, в том числе линии A172 глиобластомы человека [Tahara K., 2011] были получены аналогичные результаты.

В 2002 году Й. Кройтер и соавт. показали, что ПС 80 способствует сорбции на поверхности ПБЦА НЧ белков плазмы – аполипопротеинов Е и В [Kreuter J., 2002], участвующих во взаимодействии липопротеинов низкой плотности с соответствующими рецепторами в эндотелиоцитах [Wagner S., 2010]. Полученные данные позволили предположить, что НЧ проникают в мозг в результате рецептор-опосредованного эндоцитоза, который является результатом взаимодействия этих белков с рецепторами к липопротеинам низкой плотности (ЛПНП-рецепторами или LDL-рецепторами),

экспрессированными на мембранах эндотелиоцитов капилляров мозга. ЛПНП-рецепторы воспринимают НЧ как агрегаты липопротеинов низкой плотности, поступающие в мозг из крови. Внутри эндотелиальной клетки частица подвергается биодegradации под действием ферментов и выделяет ЛВ, которое затем диффундирует через мембрану в межклеточное пространство.

Впоследствии было показано, что несмотря на различную химическую структуру ПАВ, использованных для модификации поверхности наночастиц, профили белков плазмы, сорбированных на поверхности ПБЦА НЧ, обнаружили как количественное, так и качественное сходство [Petri B., 2007]. При этом в значительном количестве присутствовал ApoA-I (24 % от общего количества), определяющий взаимодействие со скавенджер-рецепторами эндотелиальных клеток [Panzenboeck U., 2002; Balazs Z., 2004]. Возможно, что доставка веществ в мозг осуществляется путем взаимодействия ApoA-I, адсорбированного на поверхности НЧ, со скавенджер-рецептором BI (SR-BI), экспрессированным на поверхности эндотелиальных клеток, формирующих ГЭБ. Этот рецептор, экспрессируемый также и другими клетками (в том числе гепатоцитами), участвует в переносе липидов от ApoA-I внутрь клетки. При переносе липида в клетку ApoA-I связывается с клеточной мембраной посредством рецептора SR-BI, который и передает липид клетке. После этого сам белок, уже лишенный липида, диссоциирует с поверхности клетки и возвращается в кровь. Вполне вероятно, что поступление наночастиц в эндотелиальные клетки осуществляется по той же схеме: ApoA-I, адсорбированный на поверхности НЧ, взаимодействует с рецептором SR-BI, но вместо липида в клетку поступает частица [Гельперина С.Э., 2010].

В пользу этой гипотезы, несомненно, свидетельствует тот факт, что альбуминовые наночастицы, модифицированные ApoA-I, также преодолевают ГЭБ и доставляют в мозг лоперамид [Kreuter J., 2007]. Являясь субстратом Р-гр, агонист опиоидных рецепторов лоперамид не способен самостоятельно преодолеть ГЭБ и поэтому не оказывает анальгезирующего

действия. Значительное снижение порога болевой чувствительности мышей, выявленное в тесте отдергивания хвоста после внутривенного введения лоперамида, связанного с НЧ, модифицированными АроА-I, указывает на его проникновение в мозг.

Рассматриваемая гипотеза также подтверждается нашими результатами по изучению способности ПБЦА и ПЛГА наночастиц с модифицированной поверхностью обеспечивать транспорт в мозг ФРН и нсРЭЧ. Выраженным противопаркинсоническим и антиамнестическим действием ФРН обладал только в составе ПБЦА наночастиц, покрытых ПС 80, тогда как субстанция и наносомальная форма ФРН в отсутствии ПС 80 подобными эффектами не обладала. Кроме того, статистически достоверно содержание ФРН в гомогенатах тканей мозга мышей повышалось только в случае введения наносомальной формы, покрытой ПС 80.

ПБЦА наночастицы, нагруженные нсРЭЧ и покрытые ПС 80 позволили создать терапевтически значимые концентрации нсРЭЧ в мозге, что обеспечило протекторный эффект на модели геморрагического инсульта у крыс. Наносомальная форма нсРЭЧ на ПЛГА наночастицах, модифицированных Р 188, оказала выраженное нейропротективное действие на модели геморрагического инсульта, уменьшая гибель крыс, ослабляя неврологический дефицит, улучшая обучение и память животных. На модели болезни Альцгеймера, вызванной внутрижелудочковым введением амилоида- β (25-35), указанная форма нсРЭЧ ослабляла нарушения долговременной пространственной памяти в водном лабиринте Морриса. Как и в случае наносомальной формы ФРН, достоверное повышение содержания нсРЭЧ в мозге экспериментальных животных наблюдалось только при введении нсРЭЧ, связанного с ПБЦА наночастицами с модифицированной ПС 80 поверхностью. Таким образом, центральные эффекты наносомальных форм ФРН и нсРЭЧ проявлялись только при модификации поверхности наночастиц ПАВ.

При изучении спектра нейropsychотропных эффектов наносомальной формы феназепама было установлено выраженное анксиолитическое, антиагрессивное и противосудорожное действие, сопоставимое с феназепамом в субстанции, однако, в отличие от феназепама в субстанции, в терапевтическом диапазоне доз (0,5-2,0 мг/кг) наносомальная форма не обладала седативным и миорелаксирующим действием.

Указанные различия могут быть отчасти объяснены рассматриваемой гипотезой о рецептор-опосредованном эндоцитозе наночастиц. В структурах мозга выявлена различная плотность рецепторов к Apo-E и ApoA-I. Показано, что в головном мозге рецепторы к ApoE и ApoA-I находятся в наибольшем количестве в гиппокампе и коре [Bales K.R., 1999; Holtzman D. M., 2000; Irizarry M. C., 2004]. Эти данные хорошо коррелируют с нашими результатами о том, что именно в гиппокампе, а также в коре и в значительно меньшей степени в других структурах под влиянием наносомальной формы феназепама происходит усиление спектров мощности ЭЭГ.

Учитывая вышеизложенное можно предположить, что феназепам, включенный в ПБЦА наночастицы, доставляется преимущественно в гиппокамп и кору, т.е. в структуры наиболее значимые для проявления анксиолитического эффекта, и в которых плотность рецепторов к ApoE и ApoA-I максимальна. Этот факт в определенной степени объясняет наблюдаемое расслоение основных и побочных эффектов инкапсулированного в ПБЦА наночастицы феназепама.

Рассматриваемая гипотеза также подтверждается результатами электронной микроскопии, полученными Zensi с соавт. [Zensi A., 2010]. В указанных работах использовали альбуминовые наночастицы с ковалентно связанными апо E или апо A-I. В качестве контроля применяли наночастицы на основе человеческого сывороточного альбумина, не содержащие апо A-I и/или апо E на поверхности. В эндотелии мозговых капилляров, а также в нейронах были обнаружены только наночастицы, ковалентно связанные с апо A-I или апо E. Наночастицы, не содержащие

указанные аполипопротеины, не обнаруживались в мозговой ткани. В нейронах головного мозга мышей и крыс наночастицы обнаруживались уже через 30 минут после внутривенного введения.

Выводы, сделанные по результатам исследований Zensi с соавт., подтверждаются результатами работы Reimold с соавт. [Reimold I., 2008], в которой на крысах изучали действие полибутилцианоакрилатных наночастиц, меченых родамин-123-флуоресцеин-изотиоцианат-декстраном. Первоначально флюоресценция наблюдалась только в просвете мозговых капилляров. Через 30 минут после введения флюоресценция проявлялась в эндотелиоцитах капилляров мозга. Через 60 минут после введения препарат был диффузно распределен в тканях мозга.

Важно отметить, что эндоцитоз в эндотелиальных клетках мозговых капилляров происходит очень быстро. Как уже было отмечено, наночастицы обнаруживались в эндотелиоцитах мышей и крыс уже через 30 минут после внутривенного введения [Zensi A., 2010]. При этом выраженный антиноцицептивный эффект при введении наночастиц далагина и лоперамида развивался на 30-45 минуте после начала эксперимента [Alyautdin R. N., 1997; Ramge R., 2000]. Относительно быстро развивался фармакологический эффект также при введении наночастиц с различными макромолекулами [Simionescu M., 2002; Simionescu M., 2009].

В наших исследованиях максимальное содержание ФРН в гомогенатах тканей мозга мышей линии C57Bl/6 достигало максимума на 45 минуте после внутривенного введения наносомальной формы, сохранялось на высоком уровне в течение 90 мин, а затем постепенно снижалось. Измерение концентрации нсРЭЧ в образцах тканей мозга мышей также выявило максимальное накопление нсРЭЧ на 45 минуте после внутривенного введения наносомальной формы. Следует также отметить, что эффекты при введении наносомальной формы нсРЭЧ развиваются относительно быстро. Так, статистически достоверное повышение содержания мРНК нейротрофических факторов BDNF и NGF в гиппокампе и фронтальной коре

крыс происходит уже через час после внутривенного введения наносомальной формы нсРЭЧ.

Роль АТФ-зависимых транспортеров в доставке веществ через ГЭБ с помощью НЧ в настоящее время до конца не изучена. Тем не менее, все низкомолекулярные вещества, доставленные в мозг с помощью ПБЦА НЧ (в том числе даларгин, лоперамид, доксорубин), являются субстратами Р-гр, что и объясняет невозможность их независимого транспорта через ГЭБ. В пользу этой гипотезы может свидетельствовать тот факт, что доксорубин в составе ПБЦА НЧ преодолевает Р-гр-зависимую резистентность опухолевых клеток [Vauthier С., 2003]. Этот феномен является результатом двух одновременно протекающих процессов: выделения доксорубина из НЧ и ее биodeградации с образованием полицианоакриловой кислоты. Доксорубин и полицианоакриловая кислота образуют ионную пару, которая и проникает через клеточную мембрану, минуя Р-гр.

Не исключено, что этот же механизм способствует и доставке доксорубина в мозг. В этом случае присутствие АроА-I на поверхности НЧ также может играть важную роль. Действительно, удерживание НЧ вблизи клеточной мембраны в результате взаимодействия со скавенджер-рецептором при одновременной биodeградации и выделении доксорубина должно способствовать его проникновению в эндотелиальные клетки ГЭБ в обход Р-гр. Затем доксорубин проникает в мозг через апикальную мембрану клетки. При таком развитии событий захват НЧ этими клетками не является необходимым условием доставки веществ в мозг, а доставка доксорубина в мозг будет суммарным результатом действия двух механизмов.

Учитывая тот факт, что Р-гр является универсальной системой обратного очистительного транспорта, можно полагать, что подавление его активности позволит не только доставить в мозг ЛВ, являющиеся его субстратами, но и обеспечит транспорт в резистентные опухолевые клетки

цитостатиков. Известно, что ряд ПАВ, в частности ПС 80, Р188 и плуроник F 68 способны ингибировать Р-gp [Batrakova E.V., 2003].

Способность наночастиц с модифицированной поверхностью доставлять субстраты Р-gp, в частности, родамин 123 в мозг была изучена нами в исследованиях *in vitro* на модели ГЭБ. Было показано, что ПЛГА наночастицы, покрытые Р 188, обеспечивают проникновение связанного с ними родамина 123 в клетку. Полученные результаты позволяют объяснить внутриклеточное накопление ПЛГА наночастиц с паклитакселом в опухолевых клетках Jurkat WT, экспрессирующих Р-gp. Также нами было показано, что цитостатическая активность наносомальной формы паклитаксела в отношении резистентной клеточной линии Jurkat WT проявляется в диапазоне низких концентраций (от $1 \cdot 10^{-6}$ до $6,8 \cdot 10^{-6}$ М), при которых стандартная лекарственная форма малоэффективна. Кроме того, наносомальная форма паклитаксела оказала выраженный противоопухолевый эффект *in vivo* в отношении резистентной аденокарциномы молочной железы Ca755 мышей линии C57Bl/6. Показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ) и торможения роста опухоли (ТРО) при введении наносомальной формы паклитаксела составляют от 48,9% до 71,1% и от 75,2% до 94,3% соответственно, тогда как для стандартной формы УПЖ составляет от 0,8 % до 7,1 %, а ТРО – от 4,3 % до 40,8 %.

В проведенных нами исследованиях *in vitro* и *in vivo* при оценки фармакологической активности наносомальных форм ФРН, нсРЭЧ, феназепама и паклитаксела показано, что важное значение для внутриклеточной доставки указанных веществ играет природа модифицирующего агента. В отсутствии ПС 80 или Р 188 наночастицы не обеспечивали транспорт ЛВ в мозг или резистентные опухолевые клетки. Аналогичные результаты были получены при изучении антиноцицептивного эффекта даларгина, связанного с наночастицами [Kreuter J., 1997]. Обезболивающий эффект у мышей наблюдался только при модификации

поверхности наночастиц ПС 80 или полуксамером 188 [Gelperina S., 2010; Wohlfart S., 2011]. В то же время, модификация частиц другими ПАВ, в частности полуксамерами 184, 338, 407, полуксамином 908, Cremophor® EZ, Cremophor® RH 40, полиоксоэтилен-(23)-лауриловым эфиром не приводила к возникновению антиноцицептивного эффекта [Wohlfart S., 2012].

Полученные результаты подчеркивают важность выбора модифицирующего агента при конструировании наноразмерной системы доставки на основе полимерных наночастиц для доставки лекарственного вещества в головной мозг при внутривенном введении. Кроме того, большое значение имеют также свойства адсорбированного либо инкорпорированного лекарственного вещества, полимерного носителя, стабилизаторов, используемых при изготовлении наночастиц (декстран, поливиниловый спирт, альбумин, лецитин и другие) [Gelperina S., 2010]. В наших исследованиях показано, что при использовании ПБЦА наночастиц применение ПС 80 обеспечивало более эффективную доставку нсРЭЧ в головной мозг по сравнению с полуксамером 188. В тоже время, для модификации поверхности ПЛГА наночастиц предпочтительно использовать Р 188. Так, применение наносомальной форма паклитаксела на основе ПЛГА наночастиц и полуксамера 188 позволило создать терапевтически значимые концентрации в резистентных клеточных линиях JURKAT WT и аденокарциноме Ca755. Полученные данные согласуются с результатами по оценке эффективности наночастиц и ПС 80 и полуксамера 188 в отношении экспериментальной глиобластомы 101/8 у крыс [Petri B., 2007]. Также в исследованиях Kulrarni и Feng было выявлено, что при использовании ПЛГА наночастиц, нагруженных кумарином-6, накопление красителя в тканях мозга было существенно выше при покрытии частиц полуксамером 188 по сравнению с применением полисорбата 80. [Kulkarni S.A., 2011].

При обсуждении механизмов транспорта ЛВ в составе наночастиц через ГЭБ первостепенное значение уделялось роли аполипопротеинов плазмы крови А-I, В и Е, адсорбционно связывающихся с наночастицами при

попадании последних в кровотоки. Предположительно проникновение наносомальных форм ФРН и нсРЭЧ в головной мозг экспериментальных животных обусловлено вышеуказанными механизмами. Вместе с тем показано, что имеются и другие рецепторы, которые участвуют в проникновении через ГЭБ пептидов, белков и других высокомолекулярных соединений [Begley D. J., 2004]. Для доставки наночастиц, нагруженных ЛВ в головной мозг, можно использовать трансферриновые рецепторы [Pardridge W.M., 2012]. Трансферрин или моноклональные антитела к трансферриновым рецепторам (OX26 либо R17217) с помощью линкера NHS-PEG-MAL-5000 были ковалентно пришиты к наночастицам из человеческого сывороточного альбумина, нагруженные лоперамидом [Ulbrich K., 2009]. Лоперамид – агонист мю- опиоидных рецепторов в свободном виде не проникает через ГЭБ поскольку является субстратом Р-гр. виде не преодолевает ГЭБ. В опытах на мышах при внутривенном введении в тесте отдергивания хвоста был выявлен выраженный антиноцицептивный эффект лоперамида. Таким образом, применение трансферрина либо указанных антител способствует доставке лоперамида и, возможно, других лекарственных веществ, в мозг. Подобным образом можно использовать инсулиновые рецепторы [Ulbrich K., 2009]. С помощью линкера NHS-PEG-MAL-5000 к наночастицам с лоперамидом на основе человеческого сывороточного альбумина ковалентно пришивали молекулу инсулина или моноклональные антитела к инсулиновым рецепторам (29В4). В тесте отдергивания хвоста наносомальная форма лоперамида проявила выраженный антиноцицептивный эффект [Kreuter J., 2013].

Приведенные результаты показывают, что для преодоления наночастицами с ЛВ ГЭБ можно задействовать различные рецепторы головного мозга. Не исключено, что для каждого рецептора, имеющегося в головном мозге, необходимо применять соответствующий лиганд. С другой стороны, в связи с распространенностью инсулиновых и трансферриновых рецепторов в различных тканях организма появляется опасность развития

неспецифических побочных эффектов, что несомненно будет лимитировать применение данного способа доставки ЛВ в клинической практике.

Заключение

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

Так, на примере ФРН и нсРЭЧ показано, что способность наночастиц 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 наночастиц 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 наночастицы 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 наночастиц, достаточная растворимость, способность к сорбции и пр.). Важную роль играет выбор носителя и модифицирующего агента.

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 *in vivo* 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 ± 30 нм, модифицированные полоксамером 188 или полоксамером 85, а также полибутилцианоакрилатные наночастицы, модифицированные полисорбатом 80.

9. Показано, что модификация полилактид-ко-гликолидных наночастиц с размером 150 ± 30 нм полуксамером 188 обеспечивает эффективное прохождение наночастиц через интактный гематоэнцефалический барьер при системном введении.

Практические рекомендации

1. Предлагается использовать в качестве системы доставки в мозг лекарственных веществ наночастицы на основе полибутилцианоакрилата и сополимера молочной и гликолевой кислот с модифицированной поверхностью.
2. Рекомендуются дальнейшее доклиническое изучение наносомальной формы низкосиалированного 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 ургентных состояний, сопровождающихся судорожным синдромом в неврологии, нейрореаниматологии и нейрохирургии.

Список литературы

1. Артамонова Е. В. Паклитаксел в химиотерапии рака яичников / Е. В. Артамонова, Л. В. Манзюк // Русский медицинский журнал. – 2003. – Том 11, №26 (Онкология). – С. 1464-1467.
2. Аляутдин Р.Н. Направленный транспорт лекарственных веществ в мозг с помощью нанотранспортных систем / Р.Н. Аляутдин, И.А. Джинджихашвили, К.Б. Курахмаева и др. // Молекулярная медицина. – 2008. – №3. – С. 17-24.
3. Басель А. Транспорт прозерина в головной мозг при помощи полибутилцианоакрилатных наночастиц, покрытых полисорбатом 80 / А. Басель, В.Е. Петров, Р.Н. Аляутдин [и др]. // Рос. мед. журн. – 2006. – 4. – С. 28-32.
4. Воронина Т.А. Методические указания по изучению антипаркинсонической активности фармакологических веществ / Т.А. Воронина, Е.А. Вальдман, Л.Н. Неробкова // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: общ. ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 295-307.
5. Воронина Т.А. Методические указания по изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия фармакологических веществ / Т.А. Воронина, С.Б. Середенин // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ: под общ. ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – С. 253-263.
6. Воронина Т.А. Фармакология феназепама / Т.А. Воронина // Феназепам: под ред. А.В. Богатского. – Киев: Наукова Думка, 1982. – С. 87–169
7. Ганнушкина И.В. Функциональная ангиоархитектоника головного мозга / И.В. Ганнушкина. – М.: Медицина, 1996. –224 с.
8. Гельперина С.Э. Системы доставки лекарственных веществ на основе полимерных наночастиц / С.Э. Гельперина, В.И. Щвец // Биотехнол. – 2009. – № 3. – С. 8-23.

9. Гельперина, С.Э. Разработка подходов к созданию лекарственных форм антибиотиков на основе полимерных наночастиц: дис. ...докт. хим. наук: 03.01.06/ Гельперина Светлана Эммануиловна – Москва, 2010. – 302 с.
10. Гуляева С.И. Большой практикум / С.И. Гуляева, М.. Мещерякова, К.В. Демеш // Учебно-методическое пособие. – Воронеж: Издательско-полиграфический центр Воронежского университета, 2009. – С. 5-8.
11. Кедик С.А. Полимеры для систем замедленной доставки лекарств (обзор)/ С.А. Кедик, Е.С. Жаворонок, И.П. Седишев [и др] // Разработка и регистрация лекарственных средств. 2013. № 2 (3). С.18-35.
12. Кобяков Г.Л. Новые стратегии в лечении злокачественных глиом: краткий обзор научных публикаций ежегодного съезда общества нейроонкологии (SNO 2010) в Монреале / Г.Л. Кобяков, А.В. Смолин // Фарматека (Онкология) – 2011 – №7 – с. 41–49.
13. Краснопольский Ю.М. Перспективы получения наноразмерных противоопухолевых липосомальных лекарственных препаратов / Ю.М. Краснопольский, А.Е. Степанов, В.И. Швец // Нанотехнологии в онкологии. – 2010. – С. 49.
14. Кузнецова И.Г. Использование сополимера молочной и гликолевой кислот для получения наноразмерных лекарственных форм / И.Г. Кузнецова, С.Е. Северин // Разработка и регистрация лекарственных средств. – 2013. -№ 4 (5). –С.30-36.
15. Макаренко А.Н. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных / А.Н. Макаренко, Н.С. Косицин, Н.В. Пасикова // Журнал высшей нервной деятельности им. Павлова.– 2002. – Т. 52, № 6. – С. 765–768.
16. Молодавкин Г.М. Многоканальная установка для поиска транквилизаторов и изучения механизма их действия по методу конфликтная ситуация / Г.М. Молодавкин, Т.А. Воронина // Экспер. и клин. фармакол. – 1995. – Т. 58, № 2. – С. 54–56.

17. Переводчикова Н.И., Тюляндин С.А. Паклитаксел в терапии больных метастатическим (диссеминированным) раком молочной железы. / В сб. «Паклитаксел в клинической практике» под ред. Н.И. Переводчиковой // М. – 2001. – С.55–78.
18. Разживина В.А. Изучение эффектов феназепама на поли(бутил)цианоакрилатных наночастицах. / В.А. Разживина // Автореф. дисс. канд. биол. наук. – М. – 2009. -24 с.
19. Сейфулла Р.Д. Нанотехнологии в нейрофармакологии / Р.Д. Сейфулла. – М.: Onebook.ru, 2012. – 352 с.
20. Середенин С.Б. Феназепам: 25 лет в медицинской практике / С.Б. Середенин, Т.А. Воронина, Г.Г. Незномов, В.П. Жердев. – М.: Наука. – 2007. – 381 с.
21. Трещалина Е.М. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств / Е.М. Трещалина, О.С. Жукова, Г.К. Герасимова [и др]// Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств: под общ. ред. А.Н. Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – С. 640-654.
22. Чехонин В.П. Фундаментальные и прикладные аспекты изучения гематоэнцефалического барьера / В.П. Чехонин, В.П. Баклаушев, Г.М. Юсубалиева [и др]// Вестник РАМН. – 2012. – №8. – С.66-78
23. Швец В.И. От липосом семидесятых к нанобиотехнологии XXI века / В.И. Швец, А.П. Каплун, Ю.М. Краснопольский [и др] // Рос. нанотехнол.– 2008. – Т. 3, № 11-12. – С. 52-66.
24. Abbott N.J. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. / N.J. Abbott, L. Rönnbäck, E. Hansson // Nature Reviews Neuroscience. – 2006. – 7. – P. 41-53
25. Alexis F. New frontiers in nanotechnology for cancer treatment / F. Alexis, J.W. Rhee, J.P. Richie [et al.] // Urol. Oncol. – 2008. – 26(1). – P. 74-85.

26. Almeria B. Controlling the morphology of electrospray-generated PLGA microparticles for drug delivery / B. Almería, W. Deng, T.M. Fahmy [et al.] // *J Colloid Interface Sci.* – 2010. - 343(1). – P. 125-33.
27. Aloe L. Emotional stress induced by parachute jumping enhances blood nerve growth factor levels and the distribution of nerve growth factor receptors in lymphocytes / L. Aloe, L. Bracci-Laudiero, E. Alleva [et al.] // *Proc Natl Acad Sci U S A.* – 1994. - 91(22). – P.10440-10444.
28. Alyautdin R. Analgesic activity of the hexapeptide dalargin adsorbed on the surface of Ps 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles. / R. Alyautdin, D. Gothier, V. Petrov [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 1995. – V.41. – P.44-48.
29. Alyautdin R.N. Delivery of loperamide across the blood-brain barrier with Ps80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. / R.N. Alyautdin, V.E. Petrov, K. Langer [et al.] // *Pharm. Res.* – 1997. – V.14. – P.325-328.
30. Alyautdin R.N. Delivery of loperamide across the blood–brain barrier with poly-sorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles / V.E. Petrov, K. Langer, A. Berthold [et al.] // *Pharm. Res.* – 1997. - 14. – P.325–328.
31. Alyautdin R.N. Significant entry of tubocurarine into the brain of rats by adsorption to Ps 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles: an in situ brain perfusion study. / R.N. Alyautdin, E.B. Tezikov, P. Range [et al.] // *J. Microencapsul.* – 1998. – V.15, No1. – P.67-74.
32. Ambruosi A. Biodistribution of polysorbate 80-coated doxorubicin-loaded [14C]-poly-(butyl cyanoacrylate) nanoparticles after intravenous administration to glioblastoma-bearing rats. / A. Ambruosi, A.S. Khalansky, H. Yamamoto [et al.] // *J. Drug Target* – 2006. – 14. – P. 103–111.
33. Anand P. Endogenous NGF and CNTF levels in human peripheral nerve injury / P. Anand, G. Terenghi, R. Birch [et al.] // *Neuroreport.* – 1997. - 8(8). – P. 1935-1938.

34. Araujo L. Influence of the surfactant concentration on the body distribution of nanoparticles / L. Araujo, R. Löbenberg, J. Kreuter // *J Drug Target.* – 1999. – 6(5). – P. 373-385.
35. Azzi S. Vascular permeability and drug delivery in cancers. / S. Azzi, J.K. Hebda, J. Gavard // *Front Oncol.* - 2013. - 3. - P. 211..
36. Backman C. Systemic administration of nerve growth factor conjugated reverses age-related cognitive dysfunction and prevents cholinergic neuron atrophy/ C. Backman, Rose G.M., Hoffer B.J. [et al.] // *J. Neurosci.* – 1996. – 16(17). – P. 5437-5442.
37. Bala I. PLGA nanoparticles in drug delivery: the state of the art / I. Bala, S. Hariharan, M.N. Kumar // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* – 2004. – 21(5). – P. 387-422.
38. Balazs Z. Uptake and transport of high-density lipoprotein (HDL) and HDL-associated alpha-tocopherol by an in vitro blood-brain barrier model. / Z. Balazs, U. Panzenboeck, A. Hammer [et al.] // *J Neurochem.* – 2004. – 89(4). – P.939-950.
39. Bales K.R. Apolipoprotein E is essential for amyloid deposition in the APP V717F transgenic mouse model of Alzheimer's disease / K.R. Bales, T. Verina, D.J. Cummins Dixon [et al.] // *Proc. Natl. Acad.Sci.* 1999. Vol. 96, 1523–1528
40. Balland O. Intracellular distribution of ampicillin in murine macrophages infected with *Salmonella typhimurium* and treated with (3H)ampicillin-loaded nanoparticles / O. Balland, H. Pinto-Alphandary, A. Viron [et al.]// *J. Antimicrob. Chemother.* – 1996. – 37(1). – P. 105-115.
41. Ballermann B. Adhesion and differentiation of endothelial cells by exposure to chronic shear stress: a vascular graft model / B. Ballermann, M. Ott // *Blood Purif.* - 1998. - 13. - P. 125–134
42. Banks W. Permeability of the blood-brain barrier to albumin and insulin in the young and aged SAMP8 mouse/ W. Banks, S.A. Farr, J.E. Morley // *J. Gerontol. A. Biol. Sci. Med. Sci.* – 2000. – Vol. 55, №12. – P. 601-606.

43. Barraud L. Increase of doxorubicin sensitivity by doxorubicin-loading into nanoparticles for hepatocellular carcinoma cells in vitro and in vivo / L. Barraud, P. Merle, E. Soma [et al.] // *J. Hepatol.* – 2005. – 42(5). – P. 736-743.
44. Batrakova E.V. Optimal structure requirements for pluronic block copolymers in modifying P-glycoprotein drug efflux transporter activity in bovine brain microvessel endothelial cells. / E.V. Batrakova, S. Li, V.Y. Alakhov [et al.] // *J Pharmacol Exp Ther.* – 2003. - 304(2). – P.845-854.
45. Batrakova E.V. Pluronic block copolymers: evolution of drug delivery concept from inert nanocarriers to biological response modifiers. / E.V. Batrakova, A.V. Kabanov // *J Control Release.* – 2008. - 130(2). – P.98-106.
46. Beaulieu E. Cyclosporin A treatment induces overexpression of P-glycoprotein in the kidney and other tissues / L. Jetté, E. Beaulieu, J.M. Leclerc // *Am J Physiol.* – 1996. - 270(5 Pt 2). – P. F756-65.
47. Begley D.J. ABC transporters and the blood-brain barrier. / D.J. Begley // *Curr Pharm Des.* – 2004. – 10(12). – P.1295-1312.
48. Behan N. Polyn-butyl cyanoacrylate nanoparticles: a mechanistic study of polymerization and particle formation / N. Behan, C. Birkinshaw, N. Clarke // *Biomaterials.* – 2001. –22. – P. 1335-1344.
49. Behrens I. Comparative uptake studies of bioadhesive and non-bioadhesive nanoparticles in human intestinal cell lines and rats: the effect of mucus on particle adsorption and transport / I. Behrens, A.I. Pena, M.J. Alonso [et al.] // *Pharm. Res.* – 2002. – 19(8). – P. 1185-1193.
50. Berezowski V., Landry C., Lundquist S. et al. Transport screening of drug cocktails through an in vitro blood-brain barrier: is it a good strategy for increasing the throughput of the discovery pipeline? // *Pharm. Res.* - 2004. - 21. P. 756–760.
51. Brancucci A. Nerve growth factor favours long-term depression over long-term potentiation in layer II-III neurones of rat visual cortex / A. Brancucci, N. Kuczewski, S. Covaceuszach [et al.] // *J Physiol.* – 2004. - 559(Pt 2). – P. 497-506.

52. Brito D.A. Microtubules do not promote mitotic slippage when the spindle assembly checkpoint cannot be satisfied / D.A. Brito, Z. Yang, C.L. Rieder // *J Cell Biol.* – 2008. - 182(4). – P.623-629.
53. Buemi M. Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps / M. Buemi, M. Vaccaro, A. Sturiale [et al.] // *Acta Derm Venereol.* – 2002. - 82(6). – P. 411-417.
54. Bures J. Cortical spreading depression as a memory disturbing factor. / J. Bures, W. Buresova // *J Comp Physiol Psychol.* – 1963. - №56. – P.268-272.
55. Calvo P. Long-circulating PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles as new drug carrier for brain delivery / P. Calvo, B. Gouritin, H. Chacun [et al.] // *Pharm. Res.* – 2001. – 18(8). – P. 1157-1166.
56. Carryn S. Intracellular pharmacodynamics of antibiotics / S. Carryn, H. Chanteux, C. Seral [et al.] // *Infect. Dis. Clin. North. Am.* – 2003. – 17(3). – P. 615-634.
57. Castellanos-Ortega M. R. Nerve growth factor: possibilities and limitations of its clinical application/ M. R. Castellanos-Ortega, R.Cruz-Aguado, L. Martinez-Marti [et al] // *Rev. Neurol.* – 1999. – Vol. 29 №5. – P. 439-471.
58. Cervos-Navarro J. Blood-brain barrier (BBB). Review from morphological aspect / J. Cervós-Navarro, S. Kannuki, Y. Nakagawa Y // *Histol Histopathol.* – 1988. - 3(2). – P.203-213.
59. Chavanpatil M.D. Susceptibility of nanoparticle-encapsulated paclitaxel to P-glycoprotein-mediated drug efflux. / M.D. Chavanpatil, Y. Patil, J. Panyam J. // *Int J Pharm.* – 2006. - 320(1-2). – P. 150-156.
60. Chen Y.C. Effects of surface modification of PLGA-PEG-PLGA nanoparticles on loperamide delivery efficiency across the blood–brain barrier / Y.C. Chen, W.Y. Hsieh, W.F. Lee [et al] // *J. Biomater.* – 2013. – 27. – P. 909–922.
61. Chiannikulchai N. Doxorubicin-loaded nanoparticles: increased efficiency in murine hepatic metastases / N. Chiannikulchai, Z. Driouich, J.P. Benoit [et al] // *Sel. Cancer Ther.* – 1989. – 5(1). – P. 1-11.

62. Chiannilkulchai N. Hepatic tissue distribution of doxorubicin-loaded nanoparticles after i.v. administration in reticulosarcoma M 5076 metastasis-bearing mice / N. Chiannilkulchai, N. Ammoury, B. Caillou [et al] // *Cancer Chemoth. Pharm.* – 1990. – 26(2). – P. 122-126.
63. Cirpanli Y. Antitumoral activity of camptothecin-loaded nanoparticles in 9L rat glioma model / Y. Çırpanlı, E. Allard, C. Passirani [et al] // *Int. J. Pharm.* – 2011. – 403. – P.201–206.
64. Cole R.N. Glial processes, identified through their glial-specific 130 kD surface glycoprotein, are juxtaposed to sites of neurogenesis in the leech germinal plate. / R.N. Cole, R.J. Morell, B. Zipser. // *Glia.* – 1989. - 2(6). – P.446-457.
65. Couvreur P. Intracellular targeting of antibiotics by means of biodegradable nanoparticles / P. Couvreur, E. Fattal, H. Alphandary [et al] // *J. Control. Release.* – 1992. – 9. – P. 259-267.
66. Couvreur P. Liposomes and nanoparticles in the treatment of intracellular bacterial infections / P. Couvreur, E. Fattal, A. Andreumont // *Pharm. Res.* – 1991. – 8(9). – P. 1079-1086.
67. Couvreur P. Nanocapsule technology: a review. / P. Couvreur, G. Barratt, E. Fattal // *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst.* – 2002. - 19(2). – P.99-134.
68. Couvreur P. Polycyanoacrylate nanocapsules as potential lysosomotropic carriers: preparation, morphological and sorptive properties. / P. Couvreur, D. Kante, M. Roland [et al.] // *J Pharm Pharmacol.* – 1979. - 31(5). – P. 331-332.
69. Cucullo L. A new dynamic in vitromodel for the multidimensional study of astrocyte-endothelial cell interactions at the blood-brain barrier / L. Cucullo, M. McAllister, K. Kight [et al.] // *Brain Res.* - 2002. - 951. - P.243–254.
70. Darius J. Influence of nanoparticles on the brain-to-serum distribution and the metabolism of valproic acid in mice / J. Darius, F.P. Meyer, B.A. Sabel [et al] // *J. Pharm. Pharmacol.* – 2000. – 52. – P. 1043–1047.
71. Davis J. Isolation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). / S.P. Crampton, J. Davis, C.C. Hughes // *J. Vis. Exp.* – 2007. – 3. – P.183.

72. Decleves X. Interplay of drug metabolizing CYP450 enzymes and ABC transporters in the blood-brain barrier. / X. Decleves, A. Jacob, S. Yousif // *Curr Drug Metab.* – 2011. - 12(8). – P.732-741.
73. Deli M.A. Permeability studies on in vitro blood-brain barrier models: physiology, pathology, and pharmacology. / M.A. Deli, C.S.Abrahám, Y.Kataoka // *Cell Mol Neurobiol.* – 2005. - 25(1). – P.59-127
74. Delie F. Polymeric particulates to improve oral bioavailability of peptide drugs / F. Delie, M.J. Blanco-Príeto // *Molecules.* – 2005. – 10(1). – P. 65-80.
75. Dhillon T. Paclitaxel for AIDS-associated Kaposi's sarcoma. / T. Dhillon, J. Stebbing, M. Bower // *Expert Rev Anticancer Ther.* – 2005. - 5(2). – P.215-219.
76. Dinarvand R. Polylactide-co-glycolide nanoparticles for controlled delivery of anticancer agents / R. Dinarvand, N. Sepehri, S. Manoochehri [et al.] // *Int J Nanomedicine.* – 2011. – 6. – P.877-895
77. Egrie J.C. Characterization and biological effects of recombinant human erythropoietin. / J.C. Egrie, T.W. Strickland, J.Lane [et al.] // *Immunobiology.* – 1986. - 172(3-5). – P.213-224.
78. Ehrenreich H. Erythropoietin therapy for acute stroke is both safe and beneficial. / H. Ehrenreich, M. Hasselblatt, C. Dembowski [et al.] // *Mol Med.* – 2002. - 8(8). – P.495-505.
79. Ehrenreich H. Recombinant human erythropoietin in the treatment of acute ischemic stroke / H. Ehrenreich, K. Weissenborn, H. Prange [et al.] // *Stroke.* – 2009. – 40(12). – P. 647-656.
80. Eigenmann D.E. Comparative study of four immortalized human brain capillary endothelial cell lines, hCMEC/D3, hBMEC, TY10, and BB19, and optimization of culture conditions, for an in vitro blood-brain barrier model for drug permeability studies. / D.E. Eigenmann, G. Xue, K.S. Kim // *Fluids Barriers CNS.* – 2013. - 10(1). – P.33.
81. Engelhardt B. Development of the blood-brain barrier. / B. Engelhardt // *Cell Tissue Res.* – 2003. - 314(1). – P.119-129.

82. Fabel K. Pegylated liposomal doxorubicin-efficacy in patients with recurrent high-grade glioma / P. Hau, K. Fabel, U. Baumgart [et al] // *Cancer*. – 2004. – 100(6). – P.1199-1207.
83. Fattal E. Treatment of experimental salmonellosis in mice with ampicillin-bound nanoparticles / E. Fattal, M. Youssef, P. Couvreur [et al] // *Antimicrob. Agents. Chemother.* – 1989. – 33(9). – P. 1540-1543.
84. Fernandes A. Cytokine production, glutamate release and cell death in rat cultured astrocytes treated with unconjugated bilirubin and LPS. / A. Fernandes, R.F. Silva, A.S. Falcão [et al] // *J Neuroimmunol.* – 2004. – 153(1-2). – P.64-75.
85. Florence A.T. Issues in oral nanoparticle drug carrier uptake and targeting / A.T. Florence // *J. Drug. Target.* – 2004. – 12(2). – P. 65-70.
86. Florence A.T. Transcytosis of nanoparticle and dendrimer delivery systems: evolving vistas / A.T. Florence, N. Hussain // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2001. – 50 Suppl 1. – P. 69-89.
87. Frieze A. Increase of the duration of the anticonvulsive activity of a novel NMDA receptor antagonist using poly(butylcyanoacrylate) nanoparticles as a parenteral controlled release system / A. Frieze, E. Seiller, G. Quack [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2000. – 49. – P. 103–109.
88. Fumagalli F. Single exposure to erythropoietin modulates Nerve Growth Factor expression in the spinal cord following traumatic injury: comparison with methylprednisolone. / F. Fumagalli, L. Madaschi, P. Brenna // *Eur J Pharmacol.* – 2008. - 578(1). – P.19-27
89. Gabathuler R. Approaches to transport therapeutic drugs across the blood–brain barrier to treat brain diseases / R. Gabathuler // *Neurobiol. Dis.* – 2010. – 37. – P. 48–57
90. Gao K. Influence of particle size on transport of methotrexate across blood brain barrier by polysorbate 80-coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles. / K. Gao, X. Jiang // *Int. J. Pharm.* – 2006. – 310. – P. 213–219.
91. Gelperina S. Drug delivery to the brain using surfactant-coated poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles: Influence of the formulation parameters / S.

- Gelperina, O. Maksimenko, A. Khalansky [et al] // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2010. – 74. – P. 157–163.
92. Gelperina S.E. Toxicological studies of doxorubicin bound to polysorbate 80-coated poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles in healthy rats and rats with intracranial glioblastoma / S.E. Gelperina, A.S. Khalansky, I.N. Skidan [et al] // Toxicol. Lett. – 2002. – 126. – P. 131–141.
 93. Golden P.L. Brain microvascular P-glycoprotein and a revised model of multidrug resistance in brain. / P.L. Golden, W.M. Pardridge // Cell Mol Neurobiol. – 2000. - 20(2). – P.165-181.
 94. Gonzalez-Martin G. Characterization and trypanocidal activity of nifurtimox-containing and empty nanoparticles of polyethylcyanoacrylates / G. Gonzalez-Martin, I. Merino [et al] // J. Pharm. Pharmacol. – 1998. – 50(1). – P. 29-35.
 95. Grant G. Understanding the physiology of the blood-brain barrier: in vitro models / G. Grant, N. Abbott, D. Janigro // News Physiol. Sci. - 1998. - 13. - P. 287–293.
 96. Groothuis D.R. The blood-brain and blood-tumor barriers: a review of strategies for increasing drug delivery. / D.R. Groothuis // Neuro Oncol. – 2000. – 2(1). – P.45-59/
 97. Gulyaev A.E. Significant transport of doxorubicin into the brain with polysorbate 80-coated nanoparticles / A. E. Gulyaev, S.E. Gelperina, I.N. Skidan [et al.] // Pharm. Res. – 1999. – 16(10). – P. 1564-1569
 98. Guo J. Aptamer-functionalised PEG-PLGA nanoparticles for enhanced anti-glioma drug delivery // J.Guo, X. Gao, L. Su [et al] // Biomaterials – 2011. – 32. – P. 8010–8020.
 99. Han L. Inhibition of C6 glioma in vivo by combination chemotherapy of implantation of polymer wafer and intracarotid perfusion of transferrin-decorated nanoparticles / L. Han, Y. Ren, L. Long [et al] // Oncol. Rep. – 2012. – 27. – P. 121–128

100. Hardy J. Neurodegenerative disease: a different view of diagnosis. / J. Hardy, K. Gwinn-Hardy // *Mol Med Today*. 1999 Dec;5(12):514-7.
101. Hasadsri L. Functional protein delivery into neurons using polymeric nanoparticles. / L. Hasadsri, J. Kreuter, H. Hattori // *J Biol Chem*. – 2009. – 284(11). – P.6972-6981.
102. Hekmatara T. Efficient systemic therapy of rat glioblastoma by nanoparticle-bound doxorubicin is due to antiangiogenic effects / T. Hekmatara, C. Bernreuther, A.S. Khalansky, A. Theisen, J. Weissenberger, S. Gelperina, J. Kreuter, M. Glatzel // *Clin. Neuropathol*. – 2009. – 28. – P. 153–164.
103. Hobbs S.K. Regulation of transport pathways in tumor vessels: Role of tumor type and microenvironment/ Monsky W.L., Yuan F., Roberts W.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. – 1998. – V.95. – P.4607–4612.
104. Hoffer B. Treatment strategies for neurodegenerative diseases based on trophic factors and cell transplantation techniques. / B. Hoffer, L. Olson // *J Neural Transm Suppl*. – 1997. – 49. – P.1-10.
105. Holtzman, D.M. Apolipoprotein E isoform-dependent amyloid deposition and neuritic degeneration in a mouse model of Alzheimer's disease / D.M. Holtzman, K.R. Bales, T. Tenkova [et al.] // *Proc. Natl. Acad. Sci*. 2000. Vol. 105, P. 2892–2897
106. Huber O. Localization microscopy (SPDM) reveals clustered formations of P-glycoprotein in a human blood-brain barrier model. / O. Huber, A. Brunner, P. Maier // *PLoS One*. – 2012. - 7(9). – P.e44776.
107. Humpel C. Nerve growth factor and cholinergic CNS neurons studied in organotypic brain slices. Implication in Alzheimer's disease? / C. Humpel, C. Weis // *J Neural Transm Suppl*. – 2002. – 62. – P. 253-263.
108. Huwyler J. Brain drug delivery of small molecules using immunoliposomes. / J. Huwyler, D.Wu, W.M. Pardridge // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1996. - 93(24). – P.14164-14169.

109. Irizarry M.C. Apolipoprotein E modulates gamma-secretase cleavage of the amyloid precursor protein. / M.C. Irizarry, A. Deng, A. Lleo // J Neurochem. – 2004. - 90(5). – P.1132-43.
110. Jain R.K. Vessels of death or life / R.K. Jain, P.F. Carmeliet // Sci. Am. – 2001. –285(6). – P. 38-45.
111. Karatas H. A nanomedicine transports a peptide caspase-3 inhibitor across the blood–brain barrier and provides neuroprotection / H. Karatas, Y. Aktas, Y. Gursoy-Ozdemir, E. Bodur, M. Yemisci, S. Caban, A. Vural, O. Pinarbasli, Y. Capan, E. Fernandez-Megia, R. Novoa-Carballal, R. Riguera // J. Neurosci. – 2009. – 29. – P. 13761–13769.
112. Kaul G. Biodistribution and targeting potential of poly(ethylene glycol)-modified gelatin nanoparticles in subcutaneous murine tumor model / G. Kaul, M. Amiji // J. Drug Target. – 2004. – 12(9-10). – P. 585-591.
113. Kim D.H. Sustained release of dexamethasone from hydrophilic matrices using PLGA nanoparticles for neural drug delivery / D.H. Kim, D.C. Martin // Biomaterials. – 2006. – 27. – P. 3031–3037.
114. Kniesel U. Tight junctions of the blood-brain barrier / U. Kniesel, H. Wolburg // Cell Mol. Neurobiol. – 2000. – 20(1). – P. 57-76.
115. Koziara J.M. In situ blood-brain barrier transport of nanoparticles. / J.M. Koziara, P.R. Lockman, D.D. Allen, R.J. Mumper // Pharm Res. – 2003. - 20(11). – P.1772-1778.
116. Kreuter J. Apolipoprotein-mediated transport of nanoparticle-bound drugs across the blood-brain barrier / J. Kreuter, D. Shamenkov, V. Petrov [et al.] // J. Drug targeting. – 2002. – 10(4). – P. 317-325
117. Kreuter J. Covalent attachment of apolipoprotein A-I and apolipoprotein B-100 to albumin nanoparticles enables drug transport into the brain / J. Kreuter, T. Hekmatara, S. Dreis, T. Vogel, S. Gelperina, K. Langer // J. Control. Release 2007. – 118. – P.54–58.
118. Kreuter J. Encyclopedia of Pharmaceutical Technology / J. Kreuter, J. Swarbrick, J.C. Boyalan. – New York, 1994. – Vol.10. – P. 165-190.

119. Kreuter J. Influence of the type of the surfactant on the analgesic effects induced by the peptide dalargin after its delivery across the BBB using surfactant-coated nanoparticles / J. Kreuter, V.E. Petrov, D.A. Kharkevich [et al.] // J. Controlled Release. – 1997. – 49. – P. 76-81.
120. Kreuter J. Use of nanoparticles for cerebral cancer / J. Kreuter, S. Gelperina // Tumori. - 2008. – 94. – P. 271–277.
121. Kreuter J. Drug delivery to the central nervous system by polymeric nanoparticles: What do we know?// Adv.Drug Deliv.Rev. (2013), <http://dx.doi.org/10.1016/j.addr.2013.08.008>
122. Kulkarni S.A. Effects of surfacemodification on delivery efficiency of biodegradable nanoparticles across the blood–brain barrier / S.A. Kulkarni, S.-S. Feng // Nanomedicine. – 2011. – 6. – P. 377–394
123. Kuo Y.C. Transport of stavudine, delavirdine, and saquinavir across the blood–brain barrier by polybutylcyanoacrylate, methylmethacrylatesulfopropylmethacrylate, and solid lipid nanoparticles / Y.C. Kuo, F.L. Su // Int. J. Pharm. – 2007. – 340. – P. 143–152.
124. Kurakhmaeva K.B. Brain targeting of nerve growth factor using poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles / K.B. Kurakhmaeva, I.A. Djindjikashvili, V.E. Petrov [et al.] // J. Drug Target. – 2009. – 17. – P. 564–574.
125. Langford D. Signalling crosstalk in FGF2-mediated protection of endothelial cells from HIV-gp120 / D. Langford, R. Hurford, M. Hashimoto [et al.] // BMC Neurosci. - 2005. - 6. - P.8.
126. Laterra J. Astrocytes induce neural microvascular endothelial cells to form capillary-like structures in vitro. / J. Laterra, C. Guerin, G. Goldstein // J Cell Physiol. - 1990. - 2. - P. 204 – 215.
127. Lebedeva I.V. Sensitive and specific fluorescent probes for functional analysis of the three major types of mammalian ABC transporters. / I.V. Lebedeva, P. Pande, W.F. // PLoS One. – 2011. - 6(7). – P.e22429.

128. Leslie E.M. Multidrug resistance proteins: role of P-glycoprotein, MRP1, MRP2, and BCRP (ABCG2) in tissue defense. /E.M. Leslie, R.G.Deeley, S.P Cole // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* – 2005. – V. 204, No3. – P.216-237.
129. Levi-Montalcini R. The nerve growth factor 35 years later. / R. Levi-Montalcini // *Science*. – 1987. - 237(4819). – P.1154-1162.
130. Li Y.P. Stealth polycyanoacrylate nanoparticles as tumor necrosis factor-alpha carriers: pharmacokinetics and anti-tumor effects / Y.P. Li, Y.Y. Pei, Z.H. Zhou [et al.] // *Biol. Pharm. Bull.* – 2001. – 24(6). – P. 662-665.
131. Lin Y. Delivery of large molecules via poly(butyl cyanoacrylate) nanoparticles into the injured rat brain / Y. Lin, Y. Pan, Y. Shi, X. Huang, N. Jia, J.Y. Jiang, // *Nanotechnology*. – 2012. – 23. – P. e165101.
132. Liu H. In vitro release performance and analgesic activity of endomorphin-1 loaded nanoparticles / H. Liu, J. Ni, R. Wang // *Pharmazie*. – 2006. – 61. – P. 450–452.
133. Locatelli F. Erythropoiesis-stimulating agents and antibody-mediated pure red-cell aplasia: here are we now and where do we go from here? / F. Locatelli, P. Aljama, P. Barany [et al.] // *Nephrol Dial Transplant*. – 2004. - 19(2). – P.288-293.
134. Lode J. Influence of surface-modifying surfactants on the pharmacokinetic behavior of ¹⁴C-poly (methylmethacrylate) nanoparticles in experimental tumor models. / J. Lode, I. Fichtner, J. Kreuter // *Pharm Res*. – 2001. - 18(11). – P.1613-1619.
135. Lui M. Pharmacokinetics and biodistribution of surface modification polymeric nanoparticles / M. Liu, H. Li, G. Luo, Q. Liu, Y. Wang // *Arch. Pharm. Res*. – 2008. – 31. – P. 547–554
136. Maeda H. Tumoritropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs / H. Maeda, Y. Matsumura // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst*. – 1989. – 6. – P.193-210.
137. Maeda H. The EPR effect for macromolecular drug delivery to solid tumors Improvement of tumor uptake lowering of systemic toxicity and distinct tumor

- imaging in vivo / H. Maeda, H. Nakamura, J. Fang // *AdvDrugDeliv. Rev.* – 2013. – Vol 65 (1). – P.71-79.
138. Maincent P. Lymphatic targeting of polymeric nanoparticles after intraperitoneal administration in rats / P. Maincent, P. Thouvenot, C. Amicabile, M. Hoffmann, J. Kreuter, P. Couvreur, J.P. Devissaguet // *Pharm. Res.* – 1992. – 9. – P. 1534–1539.
 139. McGrogan B.T. Taxanes, microtubules and chemoresistant breast cancer. / B.T. McGrogan, B. Gilmartin, D.N. Carney // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – 1785(2). – P.96-132.
 140. Mennini T. Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. / T. Mennini, M. De Paola, P. Bigini // *Mol Med.* – 2006. - 12(7-8). – P.153-160.
 141. Miura H. Antitumor characteristics of methoxypolyethylene glycol-poly(DL-lactic acid) nanoparticles containing camptothecin. / H. Miura, H. Onishi, M. Sasatsu // *J Control Release.* – 2004. - 97(1). – P.101-113.
 142. Moghimi S.M. A single dose of intravenously injected poloxamine-coated long-circulating particles triggers macrophage clearance of subsequent doses in rats / S.M. Moghimi, T. Gray // *Clin. Sci. (Lond).* – 1997. – 93(4). – P. 371-379.
 143. Moghimi S.M. Capture of stealth nanoparticles by the body's defences / S.M. Moghimi, A.C. Hunter // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* – 2001. – 18(6). – P. 527-550.
 144. Moghimi S.M. Innovations in avoiding particle clearance from blood by Kupffer cells: cause for reflection /S.M. Moghimi, S.S. Davis // *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.* – 1994. – 11(1). – P. 31-59.
 145. Moghimi S.M. Long-circulation and target-specific nanoparticles: theory to practice / S.M. Moghimi, A.C. Hunter, J.C. Murray // *Pharmacol. Rev.* – 2001. – 58. – P. 283-318.
 146. Moghimi S.M. Poloxamers and poloxamines in nanoparticle engineering and experimental medicine / S.M. Moghimi, A.C. Hunter // *Trends Biotechnol.* – 2000. – 18(10). – P:412-420.

147. Moghimi S.M. Prolonging the circulation time and modifying the body distribution of intravenously injected polystyrene nanospheres by prior intravenous administration of poloxamine-908 A 'hepatic-blockade' event or manipulation of nanosphere surface in vivo?/ S.M. Moghimi // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1997. – 1336(1). – P. 1-6.
148. Moghimi S.M. Real-time evidence of surface modification at polystyrene lattices by poloxamine 908 in the presence of serum: in vivo conversion of macrophage-prone nanoparticles to stealth entities by poloxamine 908 / S.M. Moghimi, K.D. Pavey, A.C. Hunter // *FEBS Lett.* – 2003. – 547(1-3). – P. 177-182.
149. Moghimi S.M. Recent developments in polymeric nanoparticle engineering and their applications in experimental and clinical oncology / S.M. Moghimi // *Anticancer Agents Med. Chem.* – 2006. – 6(6). – P. 553-561.
150. Moghimi S.M. Stealth liposomes and long circulating nanoparticles: critical issues in pharmacokinetics, opsonization and protein-binding properties / S.M. Moghimi, J. Szebeni // *Prog. Lipid. Res.* – 2003. – 42(6). – P. 463-478.
151. Nag S. Studies of cerebral vessels by transmission electron microscopy and morphometry / S. Nag // *Methods Mol Med.* – 2003. – 89. – P.37-50.
152. Nagavarma B.V.N. Different techniques for preparation of polymeric nanoparticles / B.V.N Nagavarma, K. Hemant, S. Yadav// *Asian journal of Pharmaceutical and Clinical Research.* – 2012. - Vol 5. – P. 16-23.
153. Natarajan J. Polymeric nanoparticles for drug delivery and targeting: A comprehensive review / J. Natarajan, S. N. Meyyanathan // *Int J. of Health and Allied Sciences* – 2012. – Vol. 1. – P.217-223.
154. Nguyen C.A. Preparation of surfactant-free nanoparticles of methacrylic acid copolymers used for film coating / C.A. Nguyen, Y.N. Konan-Kouakou, E. Allemann [et al.] // *AAPS Pharm. Sci. Tech.* – 2006. – 7(3). – Article 63.
155. Orr G.A. Mechanisms of Taxol resistance related to microtubules. / G.A. Orr, P. Verdier-Pinard, H. McDaid H [et al.] // *Oncogene.* – 2003. - 22(47). – P.7280-7295.

156. Padera T.P. Pathology: cancer cells compress intratumour vessels / T.P. Padera, B.R. Stoll, J.B. Tooredman [et al.] // *Nature* – 2004. – 427. – 695.
157. Pal S.L. Nanoparticle: An overview of preparation and characterization / S. L. Pal, U. Jana, P. K. Manna // *Journal of Applied Pharmaceutical Science* – 2011.- Vol. 1.- P. 228-234.
158. Palmeria A. Dual inhibitors of P-glycoprotein and tumor cell growth: (re)discovering thioxanthenes / A. Palmeira, M.H. Vasconcelos, A. Paiva [et al.] // *Biochem Pharmacol.* – 2012. - 83(1). – P.57-68.
159. Pandey R. Nanoparticle encapsulated antitubercular drugs as a potential oral drug delivery system against murine tuberculosis / R. Pandey, A. Zahoor, S. Sharma [et al.] // *Tuberculosis (Edinb).* – 2003. – 83(6). – P. 373-378.
160. Panzenboeck U. ABCA1 and scavenger receptor class B, type I, are modulators of reverse sterol transport at an in vitro blood-brain barrier constituted of porcine brain capillary endothelial cells. / U. Panzenboeck, Z. Balazs, A. Sovic [et al.] *J Biol Chem.* – 2002. – 277(45). – P.42781-42789.
161. Pardridge W. M. Drug and gene delivery to the brain: the vascular route. / W.M. Pardridge // *Neuron.* – 2002. - 36(4). – P.555-558.
162. Pardridge W.M. Blood-brain barrier drug targeting: the future of brain drug development. / W.M. Pardridge // *Mol Interv.* – 2003. - 3(2). – P. 90-105.
163. Pardridge W.M. Drug transport across the blood-brain barrier. W.M. Pardridge // *J Cereb Blood Flow Metab.* – 2012. - 32(11). – P.1959-1972.
164. Parikh T., M.M. Bommana, E. Squillante III, Efficacy of surface charge in targeting pegylated nanoparticles of sulpiride to the brain, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 74 (2010) 442–450.
165. Pellow S. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat / S. Pellow, P. Chopin, S.E. File, M. Briley // *J. Neurosci. Methods.* – 1985. – 14(3). – P. 149-167.
166. Peracchia M.T. Visualization of in vitro protein-rejecting properties of PEGylated stealth polycyanoacrylate nanoparticles / M.T. Peracchia, S.

- Harnisch, H. Pinto-Alphandary [et al.] // *Biomaterials*. – 1999. – 20(14). – P. 1269-1275.
167. Pereverzeva E. Intravenous tolerance of a nanoparticle-based formulation of doxorubicin in healthy rats / E. Pereverzeva, I. Treschalin, D. Bodyagin, O. Maksimenko, J. Kreuter, S. Gelperina // *Toxicol. Lett.* – 2008. – 178. – P. 9–19.
 168. Petkov V.D. Comparative studies on the effects of the nootropic drugs adafenoxate, meclofenoxate and piracetam, and of citicholine on scopolamine-impaired memory, exploratory behavior and physical capabilities (experiments on rats and mice) / V.D. Petkov, A.H. Mosharrof, V.V. Petkov // *Acta Physiol. Pharmacol. Bulg.* – 1988. – 14(1). – P. 3-13.
 169. Petri B. Chemotherapy of brain tumour using doxorubicin bound to surfactant-coated poly(butyl cyanoacrylate) nano-particles: revisiting the role of surfactants / B. Petri, A. Bootz, A. Khalansky, T. Hekmatara, R. Müller, R. Uhl, J. Kreuter, S. Gelperina // *J. Control. Release*. – 2007. – 117. – P. 51–58
 170. Pinto-Alphandary H. Intracellular visualization of ampicillin-loaded nanoparticles in peritoneal macrophages infected in vitro with *Salmonella typhimurium* / H. Pinto-Alphandary, O. Balland, M. Laurent [et al.] // *Pharm. Res.* – 1994. – 11(1). – P. 38-46.
 171. Pinto-Alphandary H. Targeted delivery of antibiotics using liposomes and nanoparticles: research and applications / H. Pinto-Alphandary, A. Andreumont, P. Couvreur // *Int. J. of Antimicrob. Ag.* – 2000. – 13. – P. 155–168.
 172. Podolski-Renic A. The role of paclitaxel in the development and treatment of multidrug resistant cancer cell lines. / A. Podolski-Renić, T. Andelković, J. Banković [et al.] // *Biomed Pharmacother.* – 2011. – 65(5). – P. 345-53.
 173. Ramge R. Polysorbate-80 coating enhances uptake of polybutylcyanoacrylate (PBCA)-nanoparticles by human and bovine primary brain capillary endothelial cells / P. Ramge, R.E. Unger, J.B. Oltrogge [et al.] // *Eur. J. Neurosci.* – 2000. – Vol. 12, №6. – P. 1931-1940.

174. Rao K.S. TAT-conjugated nanoparticles for the CNS delivery of anti-HIV drugs, / K.S. Rao, M.K. Reddy, J.L. Horning [et al.] // *Biomaterials*. – 2008. – 29. – P. 4429–4438.
175. Reddy M.K. Nanoparticle-mediated delivery of superoxide dismutase to the brain: an effective strategy to reduce ischemia–reperfusion injury / M.K. Reddy, V. Labhasetwar // *FASEB J*. – 2009. – 23. – P. 1384–1395.
176. Redhead H.M. Drug delivery in poly(lactide-co-glycolide) nanoparticles surface modified with poloxamer 407 and poloxamine 908: in vitro characterisation and in vivo evaluation / H.M. Redhead, S.S. Davis, L. Illum // *J. Control. Release*. – 2001. – 70(3). – P. 353-363.
177. Régina A. Multidrug resistance in brain tumors: roles of the blood-brain barrier. / A. Régina, M. Demeule, A. Laplante A [et al.] // *Cancer Metastasis Rev*. – 2001. – 20(1-2). – P.13-25.
178. Reimold I. Delivery of nanoparticles to the brain detected by fluorescence microscopy. / I. Reimold, D. Domke, J. Bender [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. – 2008. - 70(2). – P.627-632.
179. Ren T. Preparation and therapeutic efficacy of polysorbate-80-coated amphotericin nanoparticles / T. Ren, N. Xu, C. Cao [et al.] // *J. Biomater. Sci*. – 2009. – 20. – P. 1369–1380
180. Ribatti D. Schwann cells in neuroblastoma express erythropoietin. / D. Ribatti, A. Marzullo, V. Longo // *J. Neurooncol*. – 2007. - 82(3). – P.327-328.
181. Rubin L.L. The cell biology of the blood-brain barrier / L.L. Rubin, J.M. Staddon [et al.] // *Ann Rev. Neurosci*. – 1999. – 22. – P. 11-28
182. Ruoslahti E. Targeting of drugs and nanoparticles to tumors /E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, M. J. Sailor // *J. of cell biology* – 2010. – Vol. 188-№ 6 – P. 759-768
183. Sakuma S. Optimized chemical structure of nanoparticles as carriers for oral delivery of salmon calcitonin / S. Sakuma, N. Suzuki, R. Sudo [et al.] // *Int. J. Pharm*. – 2002. –239(1-2). – P. 185-195.
- 184.

185. Schneider T. Brain tumor therapy by combined vaccination and antisense oligonucleotide delivery with nanoparticles / T. Schneider, A. Becker, K. Ringe [et al.] // J. Neuroimmunol. – 2008. – 195. – P. 21–27.
186. Schroeder U. Nanoparticle technology for delivery of drugs across the blood–brain barrier / U. Schroeder, P. Sommerfeld, S. Ulrich [et al.] // J. Pharm. Sci. – 1998. – 87. – P. 1305–1307.
187. Seyfried D.M. Erythropoietin promotes neurological recovery after intracerebral haemorrhage in rats. / D.M. Seyfried, Y. Han, D. Yang [et al.] // Int. J. Stroke. – 2009. - 4(4). – P.250-256.
188. Silverstein S.C. Penetration, retention, intracellular localization, and antimicrobial activity of antibiotics within phagocytes / S.C. Silverstein, C. Kabbash // Curr. Opin. Hematol. – 1994. – 1(1). – P. 85-91.
189. Simionescu M. Transcytosis of plasma macromolecules in endothelial cells: a cell biological survey. / M. Simionescu, A. Gafencu, F. Antohe // Microsc Res Tech. – 2002. - 57(5). – P.269-288.
190. Simionescu M. Endothelial transcytosis in health and disease. / M. Simionescu, D. Popov, A. Sima // Cell Tissue Res. – 2009. - 335(1). – P.27-40.
191. Sobue K. Expressional regulation of smooth muscle cell-specific genes in association with phenotypic modulation. / K. Sobue, K. Hayashi, W. Nishida // Mol Cell Biochem. – 1999. - 190(1-2). – P.105-118.
192. Sofroniew M.V. Nerve growth factor signaling, neuroprotection, and neural repair / M.V. Sofroniew, C.L. Howe, W.C. Mobley // Annu. Rev. Neurosci. – 2001. –24. – P. 1217-1281.
193. Soma C.E. Reversion of multidrug resistance by co-encapsulation of doxorubicin and cyclosporin A in polyalkylcyanoacrylate nanoparticles / C.E. Soma, C. Dubernet, D. Bentolila, S. Benita, P. Couvreur // Biomaterials. – 2000. – 21(1). – P. 1-7.
194. Stebbing J. Paclitaxel for anthracycline-resistant AIDS-related Kaposi's sarcoma: clinical and angiogenic correlations. / J. Stebbing, A. Wildfire, S. Portsmouth [et al.] // Ann Oncol. – 2003. - 14(11). – P.1660-1666.

195. Steiniger S.C.J. Chemotherapy of glioblastoma in rats using doxorubicin-loaded nanoparticles / S.C.J. Steiniger, J. Kreuter, A.S. Khalansky, I.N. Skidan, A.I. Bobruskin, Z.S. Smirnova, S.E. Severin, R. Uhl, M. Kock, K.D. Geiger, S.E. Gelperina // *Int. J. Cancer.* – 2004. – 109. – P. 759–767
196. Stolnik S. Differences in the adsorption behaviour of poly(ethylene oxide) copolymers onto model polystyrene nanoparticles assessed by isothermal titration microcalorimetry correspond to the biological differences / S. Stolnik, C.R. Heald, M.G. Garnett, L. Illum, S.S. Davis// *J. Drug Target.* – 2005. – 13(8-9). – P. 449-458.
197. Stolnik S. Long circulating microparticulate drug carriers / S. Stolnik, L. Illum, S.S. Davis // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* – 1995. – 16. – P. 195-214.
198. Stolnik S. The effect of surface coverage and conformation of poly(ethylene oxide) (PEO) chains of poloxamer 407 on the biological fate of model colloidal drug carriers / S. Stolnik, B. Daudali, A. Arien [et al.] // *Biochim. Biophys. Acta.* – 2001. – 1514(2). – P. 261-279.
199. Tahara K. Intracellular drug delivery using polysorbate 80-modified poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanospheres to glioblastoma cells. / K. Tahara, Y. Kato, H. Yamamoto [et al.] // *J. Microencapsul.* – 2011. - 28(1). – P.29-36.
200. Talving P. Erythropoiesis-stimulating agent administration and survival after severe traumatic brain injury: a prospective study. / P. Talving, T. Lustenberger, K. Inaba [et al.] // *Arch Surg.* – 2012. - 147(3). – P.251-255.
201. Tempestilli M. Determination of P-glycoprotein surface expression and functional ability after in vitro treatment with darunavir or raltegravir in lymphocytes of healthy donors. / M. Tempestilli, E. Gentilotti, C. Tommasi [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2013. - 16(4). – P.492-497.
202. Thoenen H. Neurotrophic factors and neuronal death. / H. Thoenen, Y.A. Barde, A.M. Davies [et al.] // *Ciba Found Symp.* – 1987. – 126. – P.82-95.
203. Thomas H. Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting p-glycoprotein. / H. Thomas, H.M. Coley // *Cancer Control.* – 2003. - 10(2). – P.159-165.

204. Thorne R.G. Delivery of neurotrophic factors to the central nervous system: pharmacokinetic considerations / R.G. Thorne, W.H. Frey // Clin. Pharmacokinet. – 2001. – 40(12). – P. 907-946.
205. Tian X. Enhanced brain targeting of temozolomide in polysorbate-80 coated polybutylcyanoacrylate nanoparticles / X. Tian, X. Lin, F.Wei [et al.] // Int. J. Nanomedicine. – 2011. – 6. – P. 445–452.
206. Tosi G. Investigation on mechanism of glycopeptide nanoparticles for drug delivery across the blood–brain barrier / G. Tosi, R.A. Fano, L. Bondioli [et al.] // Nanomedicine. – 2011. – 6. – P. 423–436.
207. Trapani A. Methotrexate-loaded chitosan- and glycolchitosan-based nanoparticles: a promising strategy for the administration of the anticancer drug to brain tumors / A. Trapani, N. Denora, G. Iacobellis [et al.] // AAPS Pharm. Sci. Technol. – 2011. – 12. – P. 1302–1311.
208. Tseng M.Y. Acute systemic erythropoietin therapy to reduce delayed ischemic deficits following aneurysmal subarachnoid hemorrhage: a Phase II randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Clinical article. / M.Y. Tseng, P.J. Hutchinson, H.K. Richards // J Neurosurg. – 2009. - 111(1). – P.171-180.
209. Tulpule A. Multicenter trial of low-dose paclitaxel in patients with advanced AIDS-related Kaposi sarcoma / A. Tulpule, J. Groopman, M.W. Saville [et al.] // Cancer. – 2002. - 95(1). – P.147-154.
210. Ulbrich K. Transferrin- and transferrin-receptor-antibody-modified nanoparticles enable drug delivery across the blood-brain barrier (BBB). / K. Ulbrich, T. Hekmatara, E. Herbert, J. Kreuter // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2009. - 71(2). – P.251-256.
211. Ubrich N. Oral evaluation in rabbits of cyclosporin-loaded Eudragit RS or RL nanoparticles / N. Ubrich, C. Schmidt, R. Bodmeier [et al.] // Int. J. Pharm. – 2005. – 288(1). – P. 169-175.

212. Uchida E. Effect of active oxygen radicals on protein and carbohydrate moieties of recombinant human erythropoietin. / E. Uchida, K. Morimoto, N. Kawasaki [et al.] // Free Radic Res. – 1997. - 27(3). – P.311-323.
213. Ueda M. Optimization of the preparation of loperamide-loaded poly (L-lactide) nanoparticles by high pressure emulsification-solvent evaporation. / M. Ueda, J. Kreuter // J Microencapsul. – 1997. - 14(5). – P.593-605.
214. Vauthier C. Drug delivery to resistant tumors the potential of poly (alkyl cyanoacrylate) nanoparticles / C. Vauthier, C. Dubernet, C. Chauvierre [et al.] // J. Control. Release. – 2003. – 93(2). – P. 151-160.
215. Vauthier C. How to concentrate nanoparticles and avoid aggregation? / C. Vauthier, B. Cabane, D. Labarre // Eur. J. Pharm. Biopharm. – 2008. –69(2). – P. 466-475.
216. Vauthier C. Poly(alkylcyanoacrylates) as biodegradable materials for biomedical applications / C. Vauthier, C. Dubernet, E. Fattal [et al.] // Adv. Drug. Deliv. Rev. – 2003. – 55 (4). – P. 519-548.
217. Vauthier C. Methods for the preparation and manufacture of polymeric nanoparticles / C. Vauthier, K. Bouchemal // Pharm. Res. – 2009. – Vol.5 – P. 1025-1028.
218. Vicari L. Paclitaxel loading in PLGA nanospheres affected the in vitro drug cell accumulation and antiproliferative activity./ L. Vicari, T. Musumeci, I. Giannone // BMC Cancer. – 2008. – 8. - 212.
219. Vijayaraghavalu S. Nanoparticles for delivery of chemotherapeutic agents to tumors / S. Vijayaraghavalu, D. Raghavan, V. Labhasetwar // Curr. Opin. Investig. Drugs. – 2007. – 8(6). – P. 477-484.
220. Villa P. The interleukin-8 (IL-8/CXCL8) receptor inhibitor reparixin improves neurological deficits and reduces long-term inflammation in permanent and transient cerebral ischemia in rats. / P. Villa, S. Triulzi, B. Cavalieri [et al.] // Mol Med. – 2007. - 13(3-4). – P.125-133.

221. Virgintino D. Astroglia-microvessel relationship in the developing human telencephalon. / D. Virgintino, E. Maiorano, M. Errede [et al.] // *Int J Dev Biol.* – 1998. - 42(8). – P.1165-1168.
222. Viviani B. Erythropoietin protects primary hippocampal neurons increasing the expression of brain-derived neurotrophic factor. / B. Viviani, S. Bartesaghi, E. Corsini // *J Neurochem.* – 2005. - 93(2). – P.412-421.
223. Vogel J.R. A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents / J.R. Vogel, B. Beer, D.E. Clody // *Psychopharmacologia.* – 1971. – 21(1). – P. 1-7.
224. Wagner S. Nanoparticulate transport of oximes over an in vitro blood–brain barrier model, / S. Wagner, J. Kufleitner, A. Zensi [et al.] // *PLoS One.* – 2010. – 5. – P. e14213
225. Wang C.X. Antitumor effects of polysorbate-80 coated gemcitabine polybutylcyanoacrylate nanoparticles in vitro and its pharmacodynamics in vivo on C6 glioma cells of a brain tumor model, / C.X. Wang, L.S. Huang, L.B. Hou [et al.] // *Brain Res.* – 2009. – 1261. – P. 91–99.
226. Wani M.C. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia* / M.C. Wani, H.L. Taylor, M.E. Wall, [et al.] // *J. Am. Chem. Soc.* – 1971. – 93. – P. 2325–2327.
227. Weiss N. Lipid apheresis and rheopheresis for treatment of peripheral arterial disease. / N. Weiss // *Atheroscler Suppl.* – 2009. - 10(5). – P.62-69.
228. Wilhelm I. In vitro models of the blood-brain barrier. / I. Wilhelm, C. Fazakas, I.A. Krizbai // *Acta Neurobiol Exp.* - 2011. – 71. - P. 113–128.
229. Wilson B. Chitosan nanoparticles as a new delivery system for the anti-Alzheimer drug tacrine / B. Wilson, M.K. Samanta, K. Santhi [et al.] // *Nanomedicine.* – 2011. – 6. – P. 144–152.
230. Wilson B. Design and evaluation of chitosan nanoparticles as novel drug carrier for the delivery of rivastigmine to treat Alzheimer's disease / B. Wilson,

- M.K. Samanta, M.S. Muthu, G. Vinothapooshan [et al.] // *Ther. Deliv.* – 2011. – 2. – P. 599–609.
231. Wilson B. Poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles coated with polysorbate 80 for the targeted delivery of rivastigmine into the brain to treat Alzheimer's disease / B. Wilson, M.K. Samanta, K. Santhi [et al.] // *Brain Res.* – 2008. – 1200. – P. 159–168.
232. Wilson B. Targeted delivery of tacrine into the brain with polysorbate 80-coated poly(n-butylcyanoacrylate) nanoparticles / B. Wilson, M.K. Samanta, K. Santhi [et al.] // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* – 2008. – 70. – P. 75–84.
233. Wohlfart S. Kinetics of transport of doxorubicin bound to nanoparticles across the blood–brain barrier / S. Wohlfart, A.S. Khalansky, S. Gelperina [et al.] // *J. Control. Release* – 2011. – 154. – P. 103–107.
234. Wohlfart S. Transport of drugs across the blood–brain barrier by nanoparticles / S. Wohlfart, S. Gelperina, J. Kreuter // *J. Control. Release.* – 2012. – 161. – P. 264–273.
235. Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. / H. Wolburg, A. Lippoldt // *Vascul Pharmacol.* – 2002. – 38(6). – P. 323–337.
236. Xin H. Anti-glioblastoma efficacy and safety of paclitaxel-loading Angiopep-conjugated dual targeting PEG-PCL nanoparticles / H. Xin, X. Sha, X. Jiang [et al.] // *Biomaterials.* – 2012. – 33. – P. 8167–8176.
237. Xin H. Enhanced anti-glioblastoma efficacy by PTX-loaded PEGylated poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles: in vitro and in vivo evaluation / H. Xin, L. Chen, J. Gu [et al.] // *Int. J. Pharm.* – 2010. – 402. – P. 238–247.
238. Xin H.L. Angiopep-conjugated poly(ethylene glycol)-co-poly(ϵ -caprolactone) nanoparticles as dual-targeted drug delivery system for brain glioma / H.L. Xin, X.Y. Jiang, J.J. Gu [et al.] // *Biomaterials.* – 2011. – 32. – P. 4293–4305.

239. Yang L. Mechanistic studies of the effect of bile salts on rhodamine 123 uptake into RBE4 cells. / L. Yang, J.P. Fawcett, J. Østergaard // *Mol Pharm.* – 2012. - 9(1). – P.29-36.
240. Yang S. Body distribution of camptothecin solid lipid nanoparticles after oral administration / S. Yang, J. Zhu, Y. Lu [et al.] // *Pharm. Res.* – 1999. – 16(5). – P. 751-757.
241. Yi Y. A polymeric nanoparticle consisting of mPEG-PLA-Toco and PLMA-COONa as a drug carrier: improvements in cellular uptake and biodistribution / Y. Yi, J.H. Kim, H.W. Kang [et al.] // *Pharm. Res.* – 2005. –22(2). – P. 200-208.
242. Youssef M. Effectiveness of nanoparticle-bound ampicillin in the treatment of *Listeria monocytogenes* infection in athymic nude mice / M. Youssef, E. Fattal, M.J. Alonso [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1988. – 32(8). – P. 1204-1207.
243. Zensi A. Human serum albumin nanoparticles modified with apolipoprotein A-I cross the blood–brain barrier and enter the rodent brain / A. Zensi, D. Begley, C. Charles Pontikis, C. Legros, L. Mihoreanu, C. Büchel, J. Kreuter // *J. Drug Target.* – 2010. – 18. – P. 842–848
244. Zhang X. Transport of nerve growth factor encapsulated into liposomes across the blood-brain barrier: in vitro and in vivo studies/ X. B. Zhang, L. Ye, X. Zhang [et al.] // *J. Control Release.*- 2005.- Vol.20. – P.106-119
245. Ziegler T. Effect of flow on the process of endothelial cell division. / T. Ziegler, R. Nerem // *Arterioscler. Thromb.* - 1999. - 14. - P. 636–643.