

Разработка технологий магнитоуправляемой доставки лекарственных препаратов в зону повреждения

Актуальность исследования

Одной из основных причин заболеваемости и смертности во всем мире являются болезни системы кровообращения (ишемическая болезнь сердца, ИБС). На втором месте в структуре заболеваемости и смертности населения находятся онкологические заболевания различной локализации. Одним из подходов к решению проблемы предотвращения ишемического повреждения миокарда и эффективного лечения онкологических заболеваний является создание транспортной системы, позволяющей осуществлять направленный транспорт лекарственного вещества к поврежденным органам и клеткам посредством управления внешним магнитным полем. Магнитоуправляемая доставка наночастиц к участкам, нуждающимся в фармакологической коррекции обладает большой вариативностью, широкой функциональностью за счет возможности различных видов воздействия на поврежденную ткань: фармакологическое (за счет селективного накопления цитостатиков или цитопротекторов в местах локализации патологического процесса и возможности управления их десорбции с поверхности носителя), физическое (за счет возможности разогрева наночастиц и гипертермической деструкции опухолевой ткани), а также их сочетания.

Научная платформа

Инновационные фундаментальные технологии в медицине

Научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель исследования - Галагудза Михаил Михайлович, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России, д.м.н., профессор РАН

Исполнители:

НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Института экспериментальной медицины

НИЛ метаболизма миокарда Института экспериментальной медицины

НИЛ нанотехнологий Института экспериментальной медицины

НИГр экспериментальной патоморфологии Института экспериментальной медицины

Центр доклинических трансляционных исследований

Ключевые слова

Магнитоуправляемая доставка, магнитные наночастицы, оксид железа, ишемия миокарда, злокачественные новообразования

Цель проекта

Разработать технологии адресной магнитоуправляемой доставки лекарственных препаратов различных фармакологических групп (цитостатики, цитопротекторы) в зону повреждения: в ишемизированный миокард, к злокачественным новообразованиям, а также провести доклинические исследования безопасности и эффективности разрабатываемых лекарственных препаратов.

Задачи проекта

1. Оценка безопасности и биосовместимости наночастиц с магнитными свойствами в различных модельных системах (*in vitro*, *ex vivo*, *in vivo*).
2. Разработка способов поверхностной модификации наночастиц с магнитными свойствами с целью иммобилизации лекарственных препаратов. Разработка способов управления десорбцией лекарств с поверхности наночастиц для решения конкретных задач.

3. Определение оптимальных характеристик магнитного поля для обеспечения адресной доставки магнитных наночастиц в целевые участки.
4. Изучение фармакокинетики (транспорт, биодоступность) и фармакодинамики (эффекты и спектр действия) магнитных наночастиц с иммобилизованными на их поверхности препаратами различных фармакологических групп (цитостатики, цитопротекторы) в условиях управления внешним магнитным полем.
5. Исследование безопасности магнитных наночастиц-носителей и лекарственных препаратов на их основе, обеспечивающих магнитоуправляемую доставку действующего вещества в зону повреждения.
6. Оценка эффективности адресной доставки цитопротективных препаратов и цитостатиков с помощью магнитных наночастиц в эксперименте в различных модельных системах (*in vivo*, *ex vivo*).

Достигнутые результаты проекта

Проведены исследования по изучению безопасности магнитных наночастиц на грызунах (крысы), являющиеся необходимым этапом разработки лекарственных препаратов. Определен характер и выраженность повреждающего действия различных доз магнитных наночастиц при однократном и многократном внутривенном введении. Определена дозозависимость оказываемых токсических эффектов наночастиц.

Ожидаемые результаты проекта

В результате реализации проекта будут получены экспериментальные образцы лекарственного средства, представляющего магнитные наночастицы с иммобилизованным на их поверхности лекарственным препаратом (цитостатик или цитопротектор) и получены данные по специфической активности, фармакокинетике и токсичности. В результате выполнения проекта планируется не только разработка способов адресной доставки лекарственных препаратов, но и разработка технологии производства лекарственных препаратов на основе магнитных наночастиц. Предполагается, что разработка препаратов позволит существенно повысить эффективность и безопасность фармакотерапии у пациентов с острым коронарным синдромом и со злокачественными новообразованиями различной локализации.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Реализация научно-инновационных идей проекта позволит добиться улучшения результатов лечения ишемических заболеваний, а также позволит увеличить продолжительность жизни и улучшить ее качество у пациентов со злокачественными новообразованиями. В практических результатах проекта могут быть заинтересованы предприятия, занимающиеся производством лекарственных препаратов (химико-фармацевтическая промышленность). Потенциальной нишей для применения разрабатываемых технологий являются пациенты с ишемической болезнью сердца, а также пациенты с I-III стадией злокачественных новообразований различной локализации.

Описание научного исследования

Мировая статистика свидетельствует о том, что основными причинами заболеваемости и смертности во всем мире являются болезни системы кровообращения и новообразования (<http://www.who.int/ru/>). Прогноз Всемирной организации здравоохранения свидетельствует о том, что инфаркт миокарда останется главной причиной летальности в мире до 2020 г. Согласно данным Всемирной Организации Здравоохранения, в 2012 году были зарегистрированы около 14 миллионов новых случаев заболевания и 8,2 миллиона случаев смерти, связанных с раком. Учитывая сохраняющуюся динамику, ожидается, что в ближайшие 20 лет число новых случаев опухолевых заболеваний возрастет на 70%. Только в России за 2014 год от онкологических заболеваний умерло 325 600 человек, что в структуре общей смертности составляет более 15%. Аналогичные исследования в области

адресной доставки лекарств на основе магнитных наночастиц в ишемизированный миокард проходят стадию НИР, а их результаты опубликованы в научных рецензируемых журналах. В ряде экспериментальных исследований на животных изучалась возможность повышения эффективности клеточной терапии ишемического повреждения миокарда с помощью магнитоуправляемой задержки клеток в зоне повреждения. Так, Cheng и др. (2012) показали, что инкубация стволовых клеток сердца из кардиосфер с суперпарамагнитными микрочастицами оксида железа сопровождалась эндоцитозом наночастиц без проявлений цитотоксичности. Введение нагруженных НМС стволовых клеток после ишемии-реперфузии миокарда в полость левого желудочка крысы с транзитным пережатием аорты, которое может рассматриваться как интракоронарное введение, обеспечивало лучшую задержку и приживание клеток в миокарде при воздействии на сердце постоянного магнита с интенсивностью магнитного поля 1,3 Тл. Через 3 недели после введения стволовых клеток и воздействия магнитного поля в данной группе животных было отмечено уменьшение размеров постинфарктного рубца, более высокая фракция изгнания и меньшая интенсивность апоптоза кардиомиоцитов, чем в группе без воздействия магнитного поля. Позднее той же группой авторов был получен сходный эффект в результате применения стволовых клеток из кардиосфер, нагруженных композитными наночастицами, содержащими препарат железа Ферагем (ферумокситол), гепарин и протамин. Обоснованием для проведения данного исследования послужил тот факт, что инъекционный препарат железа Ферагем уже одобрен для клинического использования при железодефицитной анемии. Еще более сложная магнитная наноконструкция была использована для обеспечения рекрутинга к месту ишемического повреждения миокарда эндогенных костномозговых стволовых клеток. На поверхность вышеупомянутых наночастиц ферумокситола прививали два типа моноклональных антител - антитела против CD45 и против легких цепей миозина. Первые обеспечивали взаимодействие с циркулирующими моноклеарами костного мозга, вторые - с поврежденными кардиомиоцитами в зоне ишемии-реперфузии. После воздействия внешнего магнитного поля происходило физическое сближение стволовых клеток и поврежденных кардиомиоцитов, способствующее усилению терапевтического эффекта клеточной терапии. Последний проявлялся улучшением функционального состояния левого желудочка по данным эхокардиографии, а также уменьшением протяженности постинфарктного рубца. Существующие на сегодняшний день решения по использованию адресной доставки в онкологии уже нашли практическое применение: Успешным примером адресного воздействия в онкологии является появившаяся в 2014 году NANOTHERM-терапия. Данная технология реализуется за счет нагрева введенных в опухоль микрочастиц оксида железа внешним переменным магнитным полем. Программное приложение NanoPlan® по результатам компьютерной томографии воспроизводит трехмерную модель опухоли и определяет точки оптимального введения препарата, а также параметры воздействия магнитного поля аппаратом NanoActivator®. Такой подход используется для лечения глиобластомы и рака предстательной железы. На сегодняшний день функционируют пять аппаратов в Германии и один в США. Одним из вариантов лечения пациентов с злокачественным поражением полых органов является брахитерапия, при которой осуществляется введение радиоактивного материала внутрь опухоли или рядом с ней, что позволяет достичь максимального терапевтического эффекта при минимальном воздействии на окружающие здоровые ткани. Вариантом брахитерапии является постоянная форма, при которой производится имплантация внутрь опухоли радиоактивных частиц или микрокапсул, которые остаются на месте постоянно и инактивируются через несколько месяцев. В США и западной Европе данная технология используется в 800 центрах, в России — около 10 центров, расположенных в крупных городах. Магнитные наночастицы рассматриваются как перспективное средство адресной доставки лекарственных препаратов при различных патологических процессах. Так, в экспериментальных исследованиях магнитные наночастицы активно применяются для обеспечения избирательного и стабильного накопления стволовых клеток в зоне повреждения миокарда. Особое внимание к использованию магнитных наночастиц в качестве доставки цитостатиков к опухолям обусловлена в значительной степени

многофункциональностью магнитных наночастиц и возможностью сочетания различных методов воздействия на опухолевые клетки. Так, магнитные наночастицы могут быть сконцентрированы в определенной зоне с помощью местного применения внешнего магнитного поля, обеспечивая целевую доставку фармакологических агентов. Кроме того, они могут быть использованы в качестве теплогенерирующих систем для гипертермического воздействия на опухоль. Возможность одновременного использования магнитных наночастиц в качестве диагностического агента (МРТ-диагностика) позволяет обеспечивать не только лечение опухоли, но и ее визуализацию.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

Предлагаемый проект является экспериментальным и базируется на использовании целого комплекса современных лабораторных и инструментальных методов – гистологического, флуоресцентного, биохимического, иммуноферментного и электрофизиологического методов исследования. Биологические исследования будут выполняться в различных модельных экспериментах в условиях *in vitro* (клеточные модели), *ex vivo* (изолированное сердце крысы) и *in vivo* (крысы).

Исследование цитотоксичности является неотъемлемым этапом в ходе разработки методик синтеза наночастиц. Для оценки цитотоксичности будут использоваться различные клеточные модели – мезенхимные стволовые клетки, эндотелиоциты, кардиомиоциты. С использованием метода проточной лазерной цитометрии будет проведен анализ уровня некроза и апоптоза на фоне влияния магнитных наночастиц (с использованием набора аннексина V/FITC), посредством проточной флуориметрии будет проведена оценка эффективности внутриклеточного накопления магнитных наночастиц (по прямому и боковому малоугловому светорассеянию), изучено их влияние на генерацию активных форм кислорода в клетках тест-культур (с использованием дихлорфлуоресцин диацетата (DCFH-DA) - для выявления активных форм кислорода и MitoSOX red (красный) - для выявления АФК и функциональных изменений в клетках), на состояние лизосомального компартмента тестируемых клеток, а также будет произведена оценка их пролиферации и дифференцировки. Кроме того, будет произведена оценка метаболической активности клеток в условиях воздействия магнитных наночастиц с помощью МТТ-теста. При парентеральном введении локально может достигаться высокая концентрация наночастиц в кровотоке, что необходимо учитывать при оценке их биобезопасности. В связи с этим одним из основных скрининговых тестов на токсичность наночастиц является оценка их гемолитической активности на модели спонтанного гемолиза эритроцитов млекопитающих. В ходе выполнения проекта с помощью спектрофотометрического анализа планируется изучить гемолитическую активность магнитных наночастиц в цельной крови (*ex vivo*), а также действия наночастиц, покрытых оболочкой из компонентов плазмы, и наночастиц без оболочки на эритроциты в условиях *in vitro*. Будет определена зависимость «доза-эффект». Будут изучены процессы формирования белковой оболочки на поверхности магнитных наночастиц (сканирующая электронная микроскопия), ее стабильность, состав (масс-спектрометрия), в зависимости от физико-химических характеристик магнитных наночастиц (размер, форма, поверхностный заряд и т.д.).

В экспериментах *in vivo* с введением в системный кровоток крыс магнитных наночастиц будут изучены возможные токсические эффекты введения магнитных наночастиц, которые будут оцениваться на основе изменений системной и органной гемодинамики (с помощью оригинального программного обеспечения PhysExp и лазерной доплеровской флоуметрии), с помощью гематологического, биохимического исследования крови и морфологических изменений органов. В рамках разработки системы доставки лекарств в миокард с помощью магнитных наночастиц планируется проведение серии экспериментов на изолированном сердце крысы (*ex vivo*) с моделированием тотальной нормотермической ишемии и реперфузии и экспериментов в условиях *in vivo* с моделированием ишемии и реперфузии. В ходе данного этапа будет произведена оценка эффективности адресной доставки цитопротекторов, иммобилизованных на поверхности магнитных наночастиц,

в миокард, а именно: с помощью разработанного аналитического метода будет оценено накопление магнитных наночастиц в ишемизированном миокарде при наличии/отсутствии внешнего магнитного поля; оценка кардиопротективного влияния кардиопротективных лекарственных препаратов, ассоциированных с магнитными наночастицами будет осуществляться: а) по степени повреждения миокарда (по уровню миокардиальных маркеров (БСЖК, КФК-МБ, Тропонин I), морфологическим характеристикам, уровню апоптоза и некроза (с помощью окрашивания гистологических препаратов экспериментальных образцов методом TUNEL с определением апоптогического индекса), зоне некроза (окрашивание трифенилтетразолия хлоридом)) или зоне риска и некроза (окрашивание синим Эванса и трифенилтетразолия хлоридом); б) по восстановлению сократительной функции в реперфузионном периоде (будет производиться с помощью оригинального программного обеспечения PhysExp).