

Медицина в масштабі 10^{-9} м

Настоящее и будущее нанотехнологий в неврологии, нейрохирургии, нейрореабилитации

Приставка «нано» (от греческого *νανος*, *nanos* – гном, карлик) означает размеры объектов порядка 10^{-9} м, то есть в миллионные доли миллиметра, что сопоставимо с размерами молекул и атомов. Научные изыскания в наномедицине с прицелом на практическое использование результатов начались почти одновременно с изобретением электронного микроскопа. Оказалось, что вещество может принимать совершенно новые свойства, если взять очень маленькую частицу этого вещества размерами от 1 до 100 нанометров. Сегодня термин «нанотехнология» уже стал привычным, а в зарубежных научных публикациях все чаще встречается термин «наномедицина».

Во второй половине XX века на стыке физики, химии, биологии, материаловедения и других фундаментальных и прикладных дисциплин появилось новое научно-прикладное направление – создание веществ и материалов с заданными свойствами, которые определяются чрезвычайно малыми размерами их структурных элементов, когда вводится в действие размерного эффекта приводит к возможности новых применений. Впервые термин «нанотехнология» по отношению к производству изделий размером в несколько нанометров употребил японский физик Норио Танигути в 1974 г. Сегодня под нанотехнологиями следует понимать использование свойств объектов и материалов в нанометровом масштабе для создания более совершенных материалов и изделий, реализующих эти свойства. Разработаны и запатентованы сотни видов наноматериалов, вплоть до сложных инженерных наносистем, способных к самосборке и самовоспроизведению в определенных условиях среды.

Пока что наномедицина существует лишь как концепция совершенствования диагностики и лечения различных заболеваний на основе нанотехнологий. Описаны и классифицированы сотни наноматериалов неорганического и органического происхождения, которые могут найти применение в медицине. Продолжаются лабораторные исследования *in vitro* и *in vivo* по изучению поведения наноматериалов в живых системах, их биосовместимости, путей введения.

Наночастицы и наноматериалы

Формальными признаками наночастиц являются сферическая форма и размер от 1 до 250–300 нм. К ним относятся весьма разнородные по химическому строению и физическим свойствам частицы: углеродные, металлические, полимерные и др. Наночастицы могут вводиться в организм в составе растворов и эмульсий подобно обычным лекарствам: ингаляционно, парентерально или перорально, а также через кожу. На поверхность наночастиц могут присоединяться различные молекулы лекарственных средств, участки ДНК и т.п. Попадая внутрь клетки, наночастицы способны оказывать самое разнообразное (в зависимости от поставленной задачи) воздействие: блокировать или стимулировать внутриклеточные, в том числе ядерные рецепторы, регулировать экспрессию генов и клеточный цикл. Благодаря сочетанию уникальных характеристик наночастицы открывают перспективы разработки методов терапии, селективных не только в отношении органов и тканей, но и отдельных клеток и органелл.

Ценными свойствами некоторых наночастиц являются электро- и теплопроводимость. Помещение суперпарамагнитных наночастиц в циклическое магнитное поле приводит к их выраженному разогреву за счет электрического сопротивления металлического компонента. Так, ферромагнитные наночастицы, управляемые внешним магнитным

полем, могут применяться для малоинвазивной термической абляции труднодоступных опухолей.

Среди металлических наночастиц наиболее известны наночастицы таких благородных металлов, как золото и серебро. Наночастицы золота, обладающие целым рядом уникальных характеристик (оптические свойства, прочность, высокая площадь поверхности), в основном используются в диагностических целях. Наночастицы золота могут служить для усиления сигнала при проведении иммуноферментного анализа за счет их связывания с антителами. Наночастицы серебра в последние годы с успехом использовались для усиления флуоресценции в иммунодиагностике.

Квантовые точки – это полупроводниковые нанокристаллы с длительным периодом полужизни и широким спектром флуоресценции. Они могут применяться в качестве чувствительных биосенсоров и контрастных веществ в диагностических целях.

Наиболее интересные наноматериалы представляют собой упорядоченные в структуры заданной формы атомы углерода. Фуллерены – полые сферические образования различной формы со стенками из кристаллического углерода (графита) толщиной в несколько атомов. Фуллерены сочетают такие свойства, как стабильность формы, жесткость, теплопроводимость. Самой перспективной формой углеродного наноматериала считаются нанотрубки. Карбоновые нанотрубки характеризуются высокой жесткостью и упругостью и вместе с тем способны к обратимому сгибанию. Они могут «прокалывать» мембрану клетки наподобие микроиглы. Регулируя длину и толщину нанотрубок, можно достичь и ядра клетки. Таким образом, нанотрубки можно использовать для избирательной внутриклеточной доставки различных веществ. Именно из наноматериалов на основе углерода планируется собирать наноразмерные манипуляторы и хирургические инструменты и даже нанороботов, которые смогут распознавать патологические изменения в тканях и отдельных клетках, циркулируя в кровеносных и лимфатических сосудах человека и перемещаясь во внутренних органах, доставлять лекарства к пораженной области и выполнять различные манипуляции. Пока что идеи о нанохирургии и медицинских нанороботах – машинах для «ремонта» клеток и тканей организма, воспринимаются как научная фантастика. Кроме того, остаются открытыми вопросы биосовместимости и безопасности углеродистых наноматериалов.

Самыми перспективными для медицинского использования считаются наноматериалы из синтетических биодegradирующих материалов, например аминокислот, коллагена, липидов, которые призваны решить проблему биосовместимости и безопасности. Использование наноматериалов в качестве матрицы для репарации дефектов различных тканей, в том числе высокоспециализированных, таких как нервная, открывает новую эру в трансплантологии

и восстановительной медицине. Например, в гидрогели, которые по структуре схожи с белками экстрацеллюлярного матрикса, можно поместить стволовые или полипотентные клетки. При контакте с поврежденными тканями организма гидрогель изменяет свое состояние с жидкости на гель и создает благоприятные условия для роста и дифференциации включенных в него клеток. Также наноматериалы могут быть «каркасом» для выращивания живых тканей. Некоторые научные центры уже продемонстрировали опытные образцы в области протезирования. Под руководством профессора А.М. Seifalian в Королевском госпитале Лондона (Великобритания) впервые была создана и успешно имплантирована человеку искусственная трахея, выращенная на основе наноконструктивного материала и аутологических стволовых клеток (Brakman G., Winslet M., Seifalian A.M., 2012). Появились публикации об успешной имплантации слезных каналов и кровеносных сосудов малого диаметра, выращенных на матрице из наноконструктивных материалов (Ahmed M. et al., 2011).

Наиболее перспективные и реальные в обозримом будущем сферы применения нанотехнологий в клинической практике, в том числе неврологии и нейрохирургии, – это разработка новых форм доставки лекарственных средств (решение проблемы преодоления гематоэнцефалического барьера), совершенствование методов нейровизуализации (наночастицы в качестве высокоспецифичных контрастных веществ), применение наноматериалов для регуляции процессов нейропластичности и нейрорепарации.

Далее представлены некоторые нанотехнологические разработки для решения актуальных проблем неврологии, которые уже прошли этап лабораторных экспериментов и могут быть внедрены в клиническую практику в ближайшее время.

Доставка лекарств и контрастных веществ в мозг

Многие лекарства, мишенями которых являются структуры центральной нервной системы, почти не проникают через гематоэнцефалический барьер из-за больших размеров молекулы или нарушения работы систем активного транспорта на мембранах эндотелиоцитов. Повышение дозы ведет к развитию системных и местных побочных эффектов, а также лекарственной резистентности. Наноматериалы с их уникальными избирательными свойствами претендуют на роль идеального носителя для различных лекарственных средств. Наиболее перспективной сферой применения нанотехнологий в нейрохирургии является прицельная (таргетная) доставка лекарств к опухолям мозга. Новообразованные сосуды опухоли всегда имеют повышенную проницаемость стенки и поры большего диаметра, чем у нормальных артерий и капилляров, что позволяет наночастицам определенных размеров свободно преодолевать этот барьер.

Биодegradирующие полицианоакриловые наносферы с полиэтиленгликолем покрытием (PEG), на поверхность которых были присоединены молекулы цитостатика паклитаксела, в экспериментах на животных свободно проходили поры новообразованных сосудов опухоли мозга. По накоплению препарата в опухоли исследователи определили, что такой способ доставки антинеопластических агентов в 10 раз эффективнее обычного внутривенного введения (Brigger I. et al., 2002; Feng S.S. et al., 2004). Наночастицы с полисорбатным покрытием активно захватываются эндотелиоцитами сосудов головного мозга, и также могут стать носителями противоопухолевых препаратов (Alyautdin R.N. et al., 1997). Наночастицы могут быть использованы для доставки к тканям головного и спинного мозга других молекул: антибиотиков, препаратов для лечения нейродегенеративных заболеваний, эпилепсии, нейропептидов (ростовых факторов), а также контрастных веществ. В экспериментах Peira E. et al. (2003) липидные наночастицы, нагруженные суперпарамагнитным контрастом на основе оксида железа, повышали качество детекции опухолей при проведении магнитно-резонансной томографии головного мозга. И это лишь некоторые примеры; на сегодняшний день разработано несколько десятков вариантов наночастиц со специальными покрытиями для их функционализации (присоединения «полезной» нагрузки – антител, молекул лекарств, контрастных веществ). Одна наночастица может нести на себе и лекарство, и маркер, позволяющий контролировать распределение материала в организме и его поступление к мишеням в ЦНС.

Интраназальное введение лекарств для лечения заболеваний ЦНС

Обонятельные нервы состоят из длинных отростков нейронов обонятельной луковицы мозга, то есть напрямую связывают носовую полость с головным мозгом. С 1920-х годов описаны случаи накопления мелких частиц, например металлической пыли, в передних отделах мозга шахтеров. Позже было показано, что через обонятельные нервы проникают в мозг некоторые нейротропные вирусы. Так появилась идея интраназального введения лекарств для доставки в головной мозг. Однако далеко не все молекулы могут захватываться нервными окончаниями в обонятельной зоне слизистой оболочки и проникать в мозг по периневральным пространствам. Носителями лекарственных молекул могут стать наночастицы. В первых исследованиях был обнаружен захват нейронами обонятельной луковицы человека вводимых интраназально наночастиц золота диаметром 50 нм (de Lorenzo, 1970). Микрочастицы оксида марганца диаметром 30 нм, меченные радиоизотопом ^{13}C , после интраназального введения обнаруживались в глубоких областях головного мозга, включая гиппокамп (Elder A. et al., 2006; Oberdorster G. et al., 2004). Позже было обнаружено, что размеры наночастиц в данном случае не играют большой роли. Даже частицы размером 280 нм (оксид железа) обнаруживали в гиппокампе после интраназальной инстилляций (Wang B. et al., 2007). Исследователи объяснили это тем, что наночастицы способны проникать в ЦНС не только

по обонятельным нервам, но и гемато-генным путем, через кровеносные со- суды и ГЭБ.

В качестве проводников для повыше- ния персистенции металлических нано- частиц в обонятельном эпителии могут применяться другие наноматериалы с высокой биосовместимостью и адге- зивностью, такие как нановолоконные матриксные гели и эмульсии (Dhuria S.V. et al., 2010; Jogani V.V. et al., 2008).

Нанотехнологии в нейрореабилитации

Независимо от повреждающего фак- тора (травма, инсульт) все острые повре- ждения мозга характеризуются поте- рей нейронов и аксональных связей. Восстановление неврологических функций связано в основном с регене- рацией аксонов. Аксональную регене- рацию в восстановительном периоде существенно затрудняют как минимум три фактора: формирование в зоне повре- ждения соединительнотканного рубца, «пробелы» в нервной ткани, которые образуются в результате фагоцитоза продуктов распада погибших нейронов и элементов глии, а также неспособность многих зрелых нейронов к «про- рращиванию» поврежденных аксонов.

Оптимальные условия для аксональ- ной регенерации могут обеспечить син- тетические наноматериалы на основе аминокислотных молекул, способных к самосборке в биологических средах (Self-Assembling Peptide Nanofiber Scaffold, SAPNS). При помещении «строи- тельных блоков» — особым образом свя- занных аминокислотных молекул — в жидкую ионизирующую среду (физио- логический раствор, цереброспиналь- ную жидкость) они спонтанно образуют пространственную волокнистую сеть, которая по размерам компонентов и свойствам приближается к межкле- точному матриксу. Такая искусственная матрица служит идеальной средой для репарации многих тканей человеческо- го организма, в том числе нервной. Будучи помещенной в зону повреждения мозга, пептидная наносетка заполняет собой пробел, предупреждает образова- ние фиброзного рубца, создает условия для роста, миграции и дифференциации клеток, а также роста аксонов и форми- рования функциональных синапсов.

На рисунке 1 представлен один из ва- риантов SAPNS — пептидный матрикс RADA 16-I, созданный на основе четы- рех аминокислот: аргинина, аланина, аспартата и аланина (Ellis-Behnke R.G. et al., 2006).

Международная группа исследовате- лей из США и Китая (Ellis-Behnke R.G., Yu-Xiang Liang, Si-Wei You и др.) в 2006 г. опубликовала результаты серии экспе- риментов на грызунах, которые демон- стрируют регенеративный потенциал SAPNS.

После полного перерезания зритель- ного тракта на уровне верхних бугорков среднего мозга у хомячков и интраопера- ционного введения в зону надреза 1% раствора SAPNS (использовался мате- риал RADA 16-I) в течение 60 дней наблюдалось постепенное замещение дефекта регенерирующей нервной тка- нью. Уже на 30-й день при проведении гистологического исследования посмер- тных срезов среднего мозга отмечалось практически полное сращение краев надреза (рис. 2; Ellis-Behnke R.G. et al., 2006). Иммунофлуоресцентным мето- дом зафиксировано прорастание рети- нальных аксонов в каудальном направ- лении через зону дефекта у 92% живот- ных. Плотность реиннервации достига- ла 78% от нормы, а в лучших случаях зрительный тракт был реиннервирован на 82%. Этого оказалась достаточно для восстановления функции зрения опреде- ляться поведенческими тестами на визу- альное ориентирование и распознава- ние предметов. При повторных тестиро- ваниях зрительной функции результаты прогрессивно улучшались. Сопостави- мый репаративный эффект SAPNS наблюдался в двух последовательных экс- периментах как у новорожденных, так и у взрослых особей.

Этот эксперимент не уникален. Опубликованы результаты десятков по- добных работ, выполненных независи- мыми авторскими коллективами по всему миру.

Среди активно разрабатываемых стратегий помощи при травматических повреждениях, нейродегенеративных и демиелинизирующих заболеваниях нервной системы наиболее перспектив- ной представляется генная терапия. Она предполагает доставку к месту повре- ждения терапевтических генов, поддерживающих нейрорегенерацию. Из эндогенных стимуляторов нейроре- генерации наиболее изучены нейротро- фические факторы, которые поддержи- вают выживание нейронов и рост аксо- нов в ЦНС и структурах периферичес- кой нервной системы: фактор роста

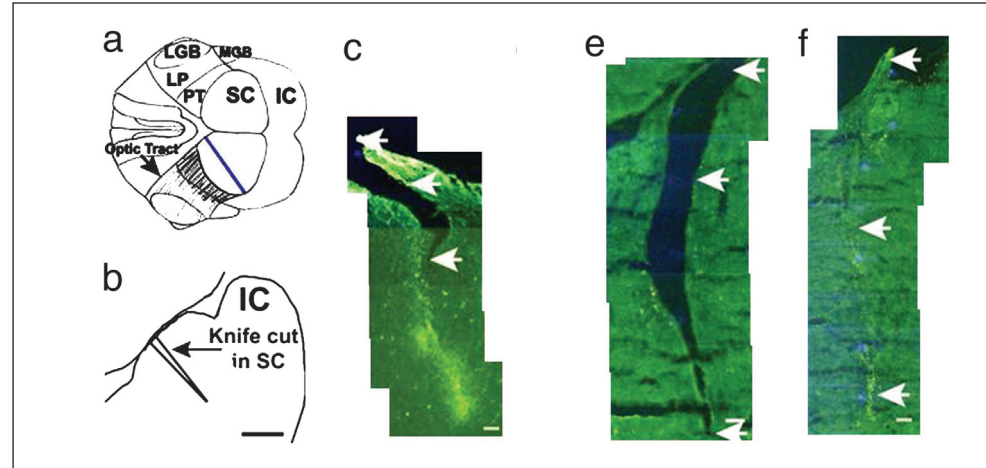


Рис. 2. Нейрореабилитация с полным сращением надреза на уровне среднего мозга при использовании материала RADA 16-I в эксперименте на грызунах

а — Схематическое изображение головного мозга хомячка (без коры больших полушарий). Синяя линия показывает уровень пересечения зрительного тракта в эксперименте.

б — Схема парасагитального среза головного мозга хомячка с указанной глубиной надреза.

в — Гистологическое исследование мозга на 30-й день эксперимента. Вид надреза у животного контрольной группы (в зону надреза вводился физиологический раствор).

г — Гистологическое исследование мозга на 30-й день эксперимента. Сращение краев надреза у животного, которому вводили материал RADA 16-I.

терапия предполагает прямую инъек- цию ДНК-содержащих векторов (носи- телей), которые могут вводиться непосредственно в область повреждения нервной ткани, в кровеносное русло или интратектально. Наиболее изучены в экспериментах вирусные и плазмид- ные векторы для доставки терапевти- ческих генов, однако они имеют свои недостатки. Вирусные векторы небезо- пасны из-за высокой вероятности мута- генеза, воспалительного и иммунного ответа; методы их получения трудоемки и дороги. Плазмидные векторы безо- пасны, но эффективность трансфекции (переноса терапевтической ДНК в ней- роны) при их использовании ниже. Последние достижения в области нано- технологий стимулировали разработку невирусных носителей генов на основе наночастиц. Наночастицы золота, по- крытые плазмидной ДНК, могут быть *in vitro* доставлены в нейроны методом бомбардировки (Usachev Y.M., Kham- manivong A., Campbell C. et al., 2000), однако этот метод позволяет трансфи- цировать только 10% нейронов в пер- вичной культуре, предназначенной для введения в зону дефекта (непрямая ге- ная терапия).

Доставка ДНК *in vivo* при внутривен- ной инъекции покрытых поли-L-лизин- ом наночастиц оксида железа (матери- ал IONP-PLL) была более результатив- ной в отношении нейронов и глии (Xiang J.J., Tang J.Q. et al., 2003). Этот комплекс переносчиков легко проходит

медицины. Ожидается, что миллиард- ные инвестиции в исследования по ме- дицинскому применению нанопродук- ции начнут окупаться уже в ближай- шее десятилетие. Плановая работа в этом направлении ведется биотехно- логическими и фармацевтическими компаниями в тесном сотрудничестве с ведущими научными центрами во всем цивилизованном мире. Больше всего медицинских нанотехнологий запате- нтовано в США — 53% от общего их количества. В Европе — 25%, Азии — 12%. Доминируют технологии совершенствования доставочных форм ле- карств (76% публикаций в специализи- рованных изданиях и 59% патентов) и методов *in vitro* диагностики (11 и 14% соответственно) (V. Morigi et al., 2012). Издаётся специализированный журнал International Journal of Nano- medicine и много других журналов, посвященных отдельным аспектам медицинских нанотехнологий, например Particle and Fibre Toxicology, Cyto- technology.

Как видно из данного обзора, многие наночастицы и наноматериалы успешно испытаны на животных и продемон- стрировали эффективность на моделях различных заболеваний. На очереди эксперименты с участием человека и клинические исследования, которые откроют путь к коммерциализации медицинских нанотехнологий. За рубежом всерьез оцениваются потенциал и объ- емы этого рынка. Согласно результатам исследования, проведенного Business Communications Company (BCC), объем рынка всех медицинских нанотехноло- гий в 2009 г. составлял 53 млрд долларов США, а с ежегодным приростом в сред- нем 13,5% к 2014 г. прогнозируется объ- ем 100 млрд долларов. Львиную долю рынка занимают высокотехнологичные средства для лечения рака: 20 млрд дол- ларов в 2009 г., 33 млрд долларов по прогнозу на 2014 г. (Morigi V. et al., 2012). Администрацией по контролю продук- тов питания и лекарственных средств (FDA) в США уже одобрены препараты для лечения некоторых видов рака, соз- данные с применением нанотехнологий (Abraxane, Doxil).

Следует понимать, что нанотехноло- гии для практического применения — это плод многолетнего труда, чрезвы- чайно наукоемкий и капиталоемкий. При нынешних объемах финансиро- вания и «коматозном» состоянии укра- инской науки в потоке мировых тенде- нций ей уготована роль пассивного на- блюдателя, а отечественной медицине — в лучшем случае потребителя доро- гостоящих инноваций, которые рано или поздно придут к нам из-за рубежа.

Подготовил Дмитрий Молчанов

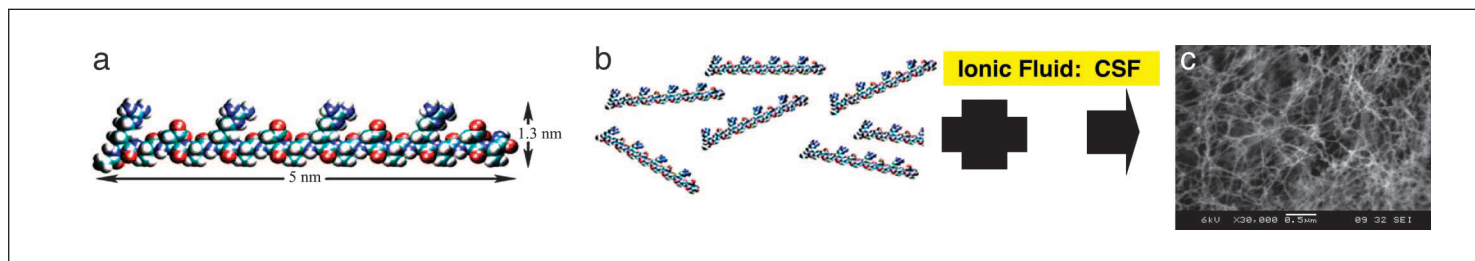


Рис. 1. Пептидный наноматериал RADA 16-I

а — Молекулярная структура «строительного блока» SAPNS.

б — Несколько молекул SAPNS, готовых к самосборке в волокна в ионизирующей среде (цереброспинальной жидкости).

в — Микрофотография наноматрицы SAPNS под электронным сканирующим микроскопом (масштаб 500 нм).

Технология SAPNS обладает рядом важ- ных преимуществ. Матрица полностью биодegradурующая, она распадается на от- дельные аминокислоты, которые могут быть утилизированы клетками окружаю- щей ткани. Синтетическое происхождение материала гарантирует минимальное коли- чество химических и биологических при- месей, которые обычно присутствуют в биоматериалах животного происхождения. Наноматериал иммунологически инертен, поэтому не вызывает реакции отторжения. Амфифильный пептидный наноматериал легко функционализировать разными био- активными молекулами, например росто- выми факторами, антиоксидантами, для усиления репаративного эффекта.

нервов (NGF), мозговой нейротрофи- ческий фактор (BDNF) и др. Однако в ходе клинических исследований с системным введением нейротрофи- ческих факторов для стимуляции ней- рорегенерации были выявлены непри- емлемые побочные эффекты и низкая эффективность, вероятно, обусловлен- ные высокими дозами, иммуноген- ностью нейротрофинов, быстрым их расщеплением эндогенными пептида- зами и другими факторами (Apfel S.C., 2002). В связи с этими трудностями воз- никла идея доставлять к месту повреж- дения не сами белковые молекулы стимуляторов нейрорегенерации, а ко- дирующие их гены. Прямая генная

через гематоэнцефалический барьер и имеет низкую токсичность. Внутри- желудочковая инъекция наночастиц кремния (материал ORMOSIL) в ком- плексе с плазмидной ДНК также обеспе- чивает эффективную трансфекцию ней- ронов, сопоставимую с результатами использования вируса простого герпеса, но и иммунологически более безопас- ную (Bharali D.J. et al., 2005).

Вместо заключения. Борьба на рынке медицинских нанотехнологий началась

Нанотехнологии в фарминдустрии и клинической практике — это не фан- тастика, а сегодняшний день, не рево- люция в медицине, а скорее эволюция