

НОВОСТИ НАУКИ

ИЗОБРЕТЕНИЕ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА

Ишемическая болезнь сердца (ИБС) представляет серьезную угрозу для жизни сотен миллионов людей во всем мире. Поэтому так остро ощущается потребность в молекулярных факторах, способных стимулировать рост новых сосудов и, таким образом, обеспечивать реваскуляризацию ишемических тканей. Однако до сих пор прогресс в этом направлении был не особенно заметным. Главная проблема состоит в том, что некоторые потенциальные ангиогенные факторы обеспечивают васкуляризацию как в здоровых, так и в ишемических тканях, вызывая нежелательные побочные эффекты. Результаты исследований, представленные Kumar и его группой [1], вселяют надежду на то, что когда-нибудь такой лекарственный препарат появится. Ученые сообщают о том, что длительный систематический прием нитрита (NO_2^-) восстановленного до оксида азота (NO), восстанавливает кровоток в ишемической ткани, не вызывая ангиогенез в здоровых тканях.

Идея терапевтического ангиогенеза не нова. За прошедшее десятилетие были предприняты серьезные усилия, направленные на то, чтобы определить, улучшит ли реваскуляризацию прием таких ангиогенных факторов, как фактор роста, сигнальные молекулы и транскрипционные факторы. Но, несмотря на предварительные обнадеживающие перспективы, клинические испытания этих молекул оказались неудачными, поставив под сомнение саму целесообразность терапевтического ангиогенеза. Причинами неутешительных результатов клинических испытаний являются: технические трудности, связанные с эффективным введением ангиогенного фактора локально в ишемическую ткань в течение достаточно продолжительного времени; короткое время жизни этих факторов и необходимость множественным ангиогенным факторам формировать развитую, стабильную, функциональную сосудистую сеть [2, 3]. Более того, потенциальный риск возникновения побочных эффектов (понижение кровяного давления и стимуляция роста опухоли) исключает систематическое применение ангиогенных факторов, особенно тех, что беспорядочно влияют на сосуды в здоровых и больных (ишемических) тканях.

Многочисленные научные данные [4, 5] свидетельствуют о вовлечении NO - исходно открытого в качестве эндотелиального фактора релаксации сосудов, - в процесс стимуляции ангиогенеза. Эта сигнальная молекула повышает экспрессию различных ангиогенных факторов, включая VEGF (vascular endothelial growth factor - фактор роста эндотелия сосудов), который вместе с другими медиаторами, повышает уровень NO при помощи положительной обратной связи. Наряду со стимуляцией роста возникающих и недоразвитых сосудов, состоящих из хрупких эндотелиальных клеток, NO пополняет периваскулярные интрамуральные клетки, стабилизирующие сосуды, предоставляя им возможность стать полностью функциональными участками. Кроме того, NO улучшает кровоснабжение индуцируя дилатацию сосудов и, возможно, усиливая формирование коллатеральных сосудов, доставляющих большое количество крови в ишемические ткани.

Другое интересное свойство NO состоит в том, что он может защищать ткани от ишемического повреждения, замедляя клеточное дыхание. Это происходит, по крайней мере, частично, путем нитрозилирования белков комплекса I дыхательной

цепи, что сокращает образование токсичных активных форм кислорода, зачастую происходящее при ишемии [6]. Более того, при высоких уровнях NO, наблюдаемых в тканях при воспалении, нитрозилирование инактивирует PHD (prolyl hydroxylase domain-containing protein) сенсоры белки кислорода [7]. Ингибирование PHD1 защищает ткани от ишемического повреждения путем перепрограммирования клеточного метаболизма и уменьшения окислительного стресса [8]. Благодаря этим двум свойствам нитрозилирования, NO индуцирует "ишемическую толерантность"; поэтому, не удивительно, что NO рассматривался как кандидат для реваскуляризации и защиты ишемических тканей.

Но терапевтический потенциал NO зависит как от конкретной ситуации, так и от дозы. Несмотря на его положительное воздействие, высокие концентрации NO могут оказывать токсичный эффект. Более того, в дополнение к усиливающемуся запрограммированному некрозу клетки и уменьшающейся ее пролиферации (клетки), NO инактивирует гемоглобин - переносчик кислорода и ингибирует активность цитохром *c* оксидазы, ухудшая, таким образом, клеточное дыхание. Кроме этого, при определенных условиях, он стимулирует сенсоры кислорода и обеспечивает формирование активных форм кислорода. Наконец, по крайней мере, при систематическом применении в качестве органического нитратного соединения, NO действует одинаково на пораженные и здоровые ткани.

Двойственность активности NO можно объяснить, как это ни парадоксально тем, что молекулы, продуцирующие NO и молекулы-ингибиторы синтазы NO защищают клетки от ишемического повреждения [5]. Соответственно возникают вопросы о "безопасном окне" в отношении уровня NO применяемого в терапии. Почему же Kumar и его группа [1] рассматривают возможность использования нитрита в качестве ангиогенного фактора? Известно, что при ишемии нитрит восстановлен до NO [5, 9], тогда как в тканях с высоким содержанием кислорода он, по-видимому, окислен до нитратов. Другими словами, нитрит действует как сайт-селективный "про-препарат", предпочтительно генерируя NO в ишемических тканях, где он стимулирует реваскуляризацию и защиту клетки, предотвращая, при этом, накопление NO - потенциально опасного для здоровых тканей.

Благодаря такой безопасной форме, можно было бы преодолеть трудности локального введения ангиогенного препарата в пределах ишемического участка, и, более того, сделать возможной системную - даже пероральную - доставку препарата в течение длительных периодов времени. Kumar и его группа показали, что у мышей нитрит натрия обеспечивает реваскуляризацию ишемических тканей путем стимуляции формирования зрелых сосудов, тогда как при лечении NO акцептором этот эффект исчезает, подтверждая, таким образом, предположение о том, что в основе его позитивного воздействия при ишемии лежит превращение нитрита в NO.

Тем не менее, вопросы все же остаются. Активные формы кислорода, формирующиеся при ишемии, взаимодействуют с нитритом с образованием высокореактивного пероксинитрита, способного повреждать ДНК и белки. Будет ли такое повреждение, вызванное окислительными процессами, происходить при длительном лечении нитритом? Кроме этого, некоторые из положительных эффектов NO опосредованы его острыми сосудорасширяющими эффектами; возникает вопрос: сохранятся ли полезные свойства нитрито-терапии после прекращения ее применения?

Kumar и его коллеги полагают, что накопление нитрита в сердечной (ишемической) мышце стимулирует реваскуляризацию благодаря NO-зависимости через три дня после появления симптомов ишемического заболевания; но они также отмечают, что продукты NO метаболизма можно обнаружить только через семь дней. Эти озадачивающие наблюдения требуют проверки. Более того, степень защиты от ишемического повреждения ткани, обеспечиваемая нитритом и связанная с ишемической толерантностью, а не с реваскуляризацией, - остается всё еще не изученной.

В более поздних исследованиях [10] сообщается о кардио-протекторных свойствах нитрита всего лишь через день после реперфузии ишемической сердечной ткани - слишком короткий временной отрезок, чтобы мог происходить (иметь место) ангиогенез после постоянной блокады артерии. Если это толерантность к ишемии, предшествующая ревазуляризации, - как быстро нитрит может стимулировать её? Кроме этого, в отличие от хронической ишемии, случаи тяжелой формы острой ишемии характеризуются быстрым некрозом клетки и ишемическая толерантность, обусловленная нитритом, может быть недостаточна в качестве полезной адаптации. Итак, будет ли все еще (также) эффективно начальное лечение в случае острой ишемии?

Наконец, двойственная активность NO требует тщательного подбора дозы нитрита назначаемого для лечения, с тем чтобы оптимальная терапевтическая доза этого препарата не вызывала понижения общего давления крови. Вдыхание (ингаляция) NO могло бы стать перспективным способом доставки препарата, способным уменьшить колебания кровяного давления. Более того, этот способ доставки препарата выборочно повышает NO в тканях, пораженных ишемией с цитозащитными результатами [11]. Перспективные открытия, сделанные Kumar и его группой [1], несомненно, подтверждают необходимость дальнейшего изучения терапевтического потенциала этой молекулы.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Kumar D. et al.* (2008) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7540-7545.
2. *Yla-Herttuala S., Markkanene J.E., Rissanen T.T.* (2004) *Trends Cardiovasc. Med.*, **14**, 295-300.
3. *Tirziu D., Simons M.* (2005) *Angiogenesis*, **8**, 241-251.
4. *Luque Contreras D., Vargas Robles H., Romo E., Rios A., Escalante B.* (2006) *Pharmacol. Ther.*, **112**, 553-563.
5. *Moncada S., Higgs A.N.* (1993) *Engl. J. Med.*, **329**, 2002-2012.
6. *Shiva S. et al.* (2007) *J. exp. Med.*, **204**, 2089-2102.
7. *Metzen E. et al.* (2003) *Mol. Biol. Cell*, **14**, 3470-3481.
8. *Aragones J. et al.* (2008) *Nature Genet.*, **40**, 170-180.
9. *Dezfulian C., Raat N., Shiva S., Gladwin M.T.* (2007) *Cardiovasc. Res.*, **75**, 327-338.
10. *Gonzalez F.M. et al.* (2008) *Circulation*, **117**, 2986-2994.
11. *Liu X. et al.* (2007) *J. Am. Coll. Cardiol.*, **50**, 808-817.

НАНОТЕХНОЛОГИИ В МЕДИЦИНЕ

Нанотехнология - многопрофильная наука, включающая в себя создание и использование материалов, устройств или систем с нанометровыми размерами. Этот термин применим ко многим областям исследований и разработок: от медицинских препаратов до промышленного производства, вычислительной техники и даже для текстильной и косметической отраслей. Нанотехнологии играют решающую роль в различных областях биомедицины не только при адресной доставке лекарств, но и при молекулярной визуализации, в биомаркерах и биосенсорах. Фармакотерапия на специфичную мишень и методы ранней диагностики патологий - являются приоритетными областями исследований, где нанотехнологии будут играть жизненно важную роль.

Применение нанотехнологии в фармацевтической промышленности.

Существует два подхода в применении нанотехнологии: "нисходящий (top down)" и восходящий (bottom up)". Первый принцип состоит в минимизации объемов современных технологий, согласно которым материалы подвергаются обработке для последующего производства микроскопических изделий. Второй - предназначен для построения структур по принципу атом за атомом путем химического связывания и межмолекулярного взаимодействия для сборки наноструктур. Нанотехнологии уже проникают в фармацевтическое производство путем внедрения наноприборов, таких как наночипы и анализы LOC - лаборатория на микрочипе (ЛНМ) - во все процессы научных исследований и разработок, способствуя высоко-производительному скринингу потенциальных лекарственных препаратов, идентификации новых лекарств-мишеней и биомаркеров для доклинических и клинических исследований, а также для разработки средств диагностики и визуализации.

Скрининговая диагностика.

Нанотехнологии могут активизировать процесс изобретения новых лекарственных препаратов, благодаря минимизации скрининговых анализов, снижающих объем используемых дорогостоящих реагентов, возросшей автоматизации и уменьшению ошибок, обеспечивая получение дополнительной информации о клеточных и молекулярных взаимодействиях (например, белок-белковых взаимодействий) и содействуя идентификации новых лекарств-мишеней. Изобретением новых лекарств с использованием микроструйной лаборатории на микрочипе занимаются геномика и протеомика, где обычные устройства для анализа дороги и трудоемки и где большим спросом пользуется методика быстрого и дешевого анализа. Микрочиповый электрофорез (МЧЭ) образцов ДНК является одним из основных способов применения микроструйной техники в геномике. МЧЭ имеет много преимуществ, таких как более мелкие размеры, более низкий расход образца, высокая производительность и простота автоматизации. При этом, установки для микрообработки позволяют контролировать и автоматизировать множество этапов пробоподготовки образцов, используемых в протеомике, и предлагают новые возможности, труднодоступные для макроскопической области. Одной из областей применения микроструйной методики в протеомике было разделение на базе чипа в сочетании с масс-спектрометрией или лазерно-индуцированной флуоресценцией в качестве методов детекции.

Первый микроструйный чип был создан в 1991 г и к 1994 г чиповая концепция была запатентована. Первая ЛНМ была запущена компанией Agilent technologies - Agilent 2100 Bioanalyzer - представляет собой настольный прибор в виде платформы для анализа образцов ДНК, РНК, белков и клеток в микролитровом объеме. После этого многие другие компании стали запускать свои методики ЛНМ, внедряя чипы для использования в лабораториях: например, Affymetrix (продукт: GeneChip), BioTrove (продукт: Open Array TM RapidFire), Caliper Life Sciences (продукт: LabChip 90 и 3000 система изобретения препаратов) и многие другие. В июле 2003 г Caliper Technologies приобрела Zymark Corp. Это слияние позволило объединить методику использования платформы детектирования фирмы Caliper с опытом работы, накопленным фирмой Zymark в области манипулирования нанолитровыми объемами жидкости для поддержания микроструйной платформы и интерфейса существующей конструкции. Сегодня Caliper Life Sciences работает с другими компаниями, включая Agilent Technologies, Bio-Rad, QIAGEN и Affymetrix чтобы упрочить положение микроструйной продукции.

Исключив вариации в подготовке образца, условиях реакции и методах детектирования, микроструйная техника имеет возможность обеспечить эффективный скрининг большого количества лекарств за меньшее время и

существенно снизить стоимость разработки лекарств. Платформы для клеточных культур и исследования одной клетки с помощью чипов, будут полезны в протеомных исследованиях, которые, в свою очередь, ускорят идентификацию мишени. Микроцитометрия и клеточный сортинг, генерация\синтез и манипулирование небольшими жидкостными объемами также находят свое применение в изобретении новых препаратов, кристаллизации белков и скрининге сложных библиотек, которые могут облегчить идентификацию данных. Более того, ЛНМ могут использоваться для тестирования эффективности препаратов, фармакологического анализа профиля и токсикологического тестирования путем исследования действия препарата на живые клетки.

Однако, несмотря на развитие микроструйной техники за последние несколько лет, остается много проблем, требующих своего решения, особенно в контексте универсальности в применимости как в академических, так и в промышленных фарм. лабораториях. Кроме этого, необходимо проводить как можно больше исследований, чтобы определить надежность микроструйных чипов в тысячах образцов и в течение многих месяцев постоянного использования; т.е. необходимо продвигать эти новые достижения, чтобы еще больше упрочить использование микроструйных устройств при изучении проблем связанных с открытием новых лекарств и их разработкой.

Визуализация адресной доставки лекарств, диагностика.

Другая важная область применения нанотехнологии - это адресная доставка лекарственных средств путём применения нанорецептур или нано-адаптированных систем доставки. К 2015 г. достижения в области наноматериалов, наноструктур (например, квантовые доты, дендримеры, нанотрубки и фуллерены) и наносистем, как полагают, увеличат стоимость глобального рынка нанотехнологий до триллиона долларов. Сегодня исследователи сосредоточились на внедрении специально созданных наночастиц, состоящих из крошечных флуоресцентных "квантовых дотов", с иммобилизованными антителами против клеток-мишеней. Антитела, в свою очередь, могут соединяться с больными клетками, после чего квантовые доты начинают ярко светиться. Это свечение может улавливаться специально разработанными, усовершенствованными системами визуализации, позволяющими точно определить заболевание даже на самых ранних этапах. Нанокристаллы квантовых дотов производства Invitrogen являются примером флуорофореа с нанометровыми размерами.

Invitrogen находится в числе поставщиков наносфер, микросфер, магнитных шариков и нанокристаллов для тысяч областей применения в науках о жизни, включая визуализацию, разделение, проточную цитометрию, микроскопию, разработку диагностического теста, анализ кровообращения, эталонные приборы и многое другое.

Недавно в Журнале Американского Химического Общества (JACS) появилось сообщение о результатах работы ученых из Georgia Institute of Technology, занимающихся в настоящее время исследованием магнитных наночастиц с диаметром всего 10 нм или меньше, в активной зоне которых находится кобальтовый магнит. На поверхности частицы находится пептид, предназначенный для присоединения к маркеру, который локализован на поверхности большинства раковых клеток яичников. Для проверки этой технологии ученые сначала инъецировали в брюшную полость мыши раковые клетки, а затем вводили магнитные наночастицы. Раковые клетки соединялись с зеленым флуоресцентным маркером, а наночастицы - с красным. Когда магнит подносили к брюшку мыши, прямо под кожей появлялась концентрированная область зеленого и красного свечения, указывающая на то, что наночастицы "зацепились" на раковых клетках и тянут их к магниту. Есть основания полагать, что эта технология может быть использована в будущем для диагностики и детекции раковых клеток.

Визуализация и диагностика.

Другой развивающийся сектор в области нанотехнологии - использование недорогих и надежных нано-инструментов в науке и промышленности. Нано-устройства, такие как атомно-силовая микроскопия (АСМ), сканирующая электронная микроскопия (СЭМ), сканирующая оптическая микроскопия ближнего поля (СОМБП), просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), поверхностно усиленное рамановское рассеяние (ПУРР), резонансный поверхностный плазмонный (РПП) и резонансный перенос энергии флуоресценции (РПЭФ) - могут использоваться для нанометровой детекции и анализа наноструктур.

Самые ранние коммерческие нанотехнологии использовали АСМ в фармацевтике. Этот подход, при котором использовалась кремниевая микроскопически-заостренная игла, впервые был применен для визуализации рельефа поверхности с точностью атомных масштабов. Сверхтонкий наконечник сканирует образец и создает трехмерное изображение поверхности. Атомно-силовая микроскопия очень быстро становится основной технологией, используемой учеными в своих исследованиях, т.к. она позволяет им напрямую изучать отдельно-взятые атомы или молекулы и манипулировать образцами в нанометровой шкале. Несмотря на то, что АСМ была бесценна для визуализации объектов в нанометровом диапазоне в различных областях (таких как науки о жизни, о материалах и о полимерах), до недавнего времени АСМ использовалась для лучшего понимания химической динамики реакции клетки на раздражение, что может быть очень важно для открытия нового препарата. Ковалентная связь биолигандов с наконечниками АСМ переводит их в мономолекулярные биосенсоры, с помощью которых сходные рецепторы можно локализовать на поверхности образца и детально изучать изображения взаимодействия лиганд-рецептор.

Заключение.

Современная система изобретений новых препаратов нуждается в непрерывном развитии, повышении эффективности и снижении времени, затрачиваемом на весь процесс: от начала разработки до выхода препарата на рынок. Постгеномная эра привела к открытию многих потенциально важных мишеней. Однако, чтобы полностью использовать их полезные качества, необходимо улучшить эффективность процессов скрининга и легализации.

Контрольные органы ряда стран поддерживают развитие нанотехнологий, усовершенствующих разработку фарм. и диагностических средств; с этой целью пересматриваются многие нормативные правила, чтобы гарантировать новизну и надежность при использовании нанотехнологий. Использование наноматериалов и наночастиц "в пробирке" (при диагностике *in vitro*) не представляет никакого риска для человека, но есть опасение при использовании *in vivo* наночастиц размером <50 нм, которые могут попасть в клетки; к тому же до сих пор без ответа остается много вопросов о поведении наночастиц в живом организме. Для применения нанотехнологий в клинике необходимо разрешение федеральной комиссии по контролю за лекарствами\европейского агентства по оценке лекарственных средств (FDA/EMA), т.к. при аттестации продуктов полученных с помощью нанотехнологий можно столкнуться с серьезными нормативными проблемами.

Применение нанотехнологии в нанобиотехнологии уже оказывает влияние на диагностику и адресную доставку лекарств, в процессе которых используются наномерные анализы, значительно снижающие затраты на скрининг. Более того, появление продуктов на базе нанотехнологий, таких как нано-чипы и дендримеры (новейший класс трехмерных, нанометровых и оклюдантных структур), как ожидается, полностью изменит диагностику на ранней стадии такого заболевания как рак, предоставляя больным шанс на излечение. Кроме этого, нанотехнологии позволяют не только проводить тестирование сравнительно небольших объемов, но нанометровые частицы, используемые в качестве этикеток или бирок, повышают чувствительность, скорость и гибкость выбранной субстанции.

НОВОСТИ НАУКИ

Понимание того, что нано-шкала, благодаря своим особенностям, может применяться для решения важных медицинских проблем, способствует продвижению нано-медицинских исследований. Все больше внимания учёные уделяют исследованию новейших химических и физических свойств нано-размерных материалов с целью разработки и создания новой аппаратуры для восстановления здоровья человека.

ЛИТЕРАТУРА

1. OBBeC.com: Nanotechnology: Roadmap to Early Diagnosis of Disease
<http://www.obbec.com/specialreports/134-nanotechnology/1999-nanotechnology-road....>
16.01.2009
2. Laleh Safinia. Research Analyst - Drug Discovery Technologies,
Frost & Sullivan, 19 авг., 2008.

Подготовлено при участии Григорян Е.А.