

3. F.H. Netter, R.K. Shapter, G. Gollmann, E. Renner; „Farbatlant der Medizin Band 2: Niere und Harnwege“; 2. unveränderte Auflage; Stuttgart 1983; Georg Thieme Verlag.

4. D. Rasidovic, D. Kearney, Kate-Marie Boyle, S.J. Bund. “The assessment of rat ureteral pressure generation in-vitro: regional heterogeneity and influence of distending pressure”; Acta Physiologica Hungarica, Volume 97 (3), pp. 307-315 (2010); DOI: 10.1556/APhysiol.97.2010.3.7.

УДК 547.9:581.19

**Гильманова С.М., Гильманов М.К., Гуккенгеймер Е.Ю., Бегзат А.Н., Есиббаева А.С.
ФОСФАТИДИЛИНОЗИТОЛЬНЫЕ НАНОКАПСУЛЫ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ ТЯЖЕЛЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ**

Институт проблем биотехнологии при КазНУ им. аль-Фараби РГП «Институт молекулярной биологии и биохимии им. М.А. Айтхожина» КН МОН РК, г. Алматы, Казахстан baltakay@mail.ru

Введение

В настоящее время лечение любой болезни осуществляется путем приема таблеток или инъекционным путем. В результате лекарство попадает во все клетки организма, хотя надо лечить один больной орган. Таким образом, лишь 1/50 доля введенного лекарства осуществляет терапию, а остальная громадная часть лекарства токсически воздействует на все клетки организма. Все это приводит к возникновению различных патологий. Эта проблема может быть решена только путем создания системы транспорта лекарств в больной орган. Проблема направленного транспорта лекарств в больной орган до настоящего времени не нашла удовлетворительного решения. Широко используемые для этого лецитиновые липосомы имеют громадный размер, и, кроме того, вследствие большой гидрофобности они легко агрегируют, чем вызывают опасность закупорки не только мелких, но и крупных сосудов. Напротив, пластиковые наноконтейнеры имеют малые размеры, но, к сожалению, имеются большие проблемы по их применению. Они изготовлены из чужеродных для организма материалов, поэтому они вызывают различные иммунные, аллергические и пирогенные реакции. Кроме того, имеются большие методические трудности по загрузке их лекарствами. И наконец, лекарства из пластиковых контейнеров выходят очень медленно и долго в них задерживаются, что резко снижает эффективность их применения. Поэтому все вышеуказанные системы транспорта лекарств в медицине до сих пор не применяются. Все это обусловило необходимость разработки принципиально новой системы транспорта лекарств в больные органы.

Отправной точкой для постановки нашего исследования явилась разработанная нами методика получения фосфатидилинозитола из растительного материала. Эта методика защищена патентами США и Венгрии [1, 2]. В отличие от электронейтрального и гидрофобного лецитина (фосфатидилхолина), фосфатидилинозитол (ФИ) имеет отрицательный заряд. Поэтому липосомы, изготовленные из ФИ, имеют небольшие размеры и очень стабильны в буферных растворах. Наличие отрицательного заряда ФИ липосом исключает возможность их агрегации. Целью данной работы явилась разработка способов получения нагруженных лекарствами ФИ липосом и их испытание для лечения тяжелых заболеваний. Исходя из целей, решались следующие задачи:

1. Разработка способов получения ФИ липосом.
2. Разработка способов загрузки ФИ липосом.
3. Применение нагруженных ФИ липосом для лечения тяжелых заболеваний.

Результаты и их обсуждение

Для получения ФИ липосом раствор чистого ФИ впрыскивали с помощью шприца в 0,05М трис – хлоридный буфер рН 7,4. Суспензию ФИ в буферном растворе подвергали

ультразвуковому диспергированию на ультразвуковом диспергаторе типа UD-11 производства фирмы «Техпан» (Польша) при средней силе тока в течение 5 минут. В результате были получены однородные ФИ липосомы размером около 1мкм. Это размер позволил назвать ФИ липосомы ФИ нанокapsулами. Нами разработан оригинальный метод загрузки ФИ нанокapsул лекарственными средствами [3]. Принцип метода заключается в следующем. В гидрофобном растворе ФИ нанокapsулы раскрываются подобно раковине, как это видно на рисунке 1.

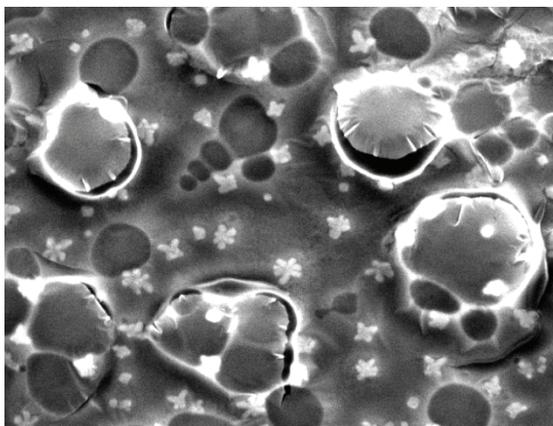


Рисунок 1- Электронная микроскопия ФИ нанокapsул в гидрофобной среде - 96% этаноле

При переводе раскрытых ФИ нанокapsул в гидрофильный буферный раствор с растворенным лекарством ФИ нанокapsулы начинают закрываться, зачерпывая при этом буферный раствор, содержащий лекарство. Для очистки нагруженных ФИ нанокapsул от лекарства, растворенного в буфере, раствор подвергали гель хроматографии на колонке с Сефадексом G-50. При разделении первый пик содержал чистые нагруженные ФИ нанокapsулы, а второй пик - только лекарства. Затем была изготовлена наномазь для лечения болезней. Для этого раствор очищенных ФИ нанокapsул смешивался в пропорции 1:1 с гидрофильным ланолином. Для лечения определенной болезни изготовленную наномазь наносили на кожу в области больного органа утром и вечером в течение всего времени лечения. Благодаря наноразмерам и тепловому движению, нагруженные определенным лекарством ФИ нанокapsулы легко проникают через кожу и мышцы, достигая больного органа через 10-15 минут. Нагруженные ФИ нанокapsулы легко проходят через межклеточные пространства, не взаимодействуя с клетками кожи и мышц, так как эти клетки также имеют отрицательный заряд. Благодаря наличию собственной ФИ мембраны, нагруженные ФИ нанокapsулы легко преодолевают внешние мембраны клеток больного органа и тем самым лекарство количественно попадает внутрь этих клеток.

Нами были проведены испытания созданных наномазей для лечения некоторых тяжелых заболеваний. Опыты по применению наномазей для лечения предынфарктного состояния проводили в Научно-исследовательском институте кардиологии и внутренних болезней МЗ РК под руководством профессора Ж.А. Аблай-улы и д.м.н. А.Т. Маншариповой. Для изучения нанокapsулированных кардиопрепаратов для лечения кардиологических заболеваний необходимо было выбрать препарат с ярко выраженным кардиотерапевтическим эффектом. В качестве такого препарата мы выбрали изосорбид динитрат (изокет), механизм спазмолитического действия которого заключается в резком увеличении обеспеченности кислородом миокарда, что обеспечивает снижение напряжения стенок желудочков, систолического артериального давления. Увеличение снабжения миокарда кислородом также обеспечивается за счет увеличения коронарного кровотока, снижения коронарного сопротивления, уменьшения спазма коронарных артерий и

увеличения коллатерального кровотока. Антиагрегационные эффекты нитратов могут рассматриваться как важное дополнение их антиишемическому действию.

Для изучения терапевтического эффекта нанокапсулированных кардиопрепаратов в качестве действующего вещества нами было выбрано использование изосорбида динитрата при развитии модели коронарной недостаточности. Материалом служили миокард и коронарные сосуды от 40 нелинейных крыс-самцов, весом 200 - 250 гр. Животные содержались при комнатной температуре, в аэрируемых клетках.

У 25 животных была создана модель коронарной недостаточности, вызванной иммобилизационным стрессом (опытная группа), которым на фоне развития коронарной недостаточности в течение 17 суток применялась трансдермальная аппликация нанокапсул с изосорбидом динитратом в дозе 0,12мг. Стресс создавался с помощью ежедневной 8-часовой иммобилизации животных в течение 14 дней. Для сравнения результатов была сформирована контрольная группа, состоящая из 15 животных, которые не подвергались иммобилизационному стрессу. На 12-19 сутки животным была сделана электрокардиограмма (ЭКГ) в I, II, III стандартных отведениях на аппарате ЭКГТ-3М2.

На 13 и 18 сутки животным было проведено ультразвуковое исследование сердца на аппарате "Aloka 1700" в В и М режимах по программе "Technoila" при 100-кратном увеличении. Оценивались следующие показатели: конечно-систолический размер (КСР) и объем (КСО) левого желудочка, конечно-диастолический размер (КДР) и объем (КДО) левого желудочка, % уменьшения полости левого желудочка в систолу (% дельта S), фракция выброса левого желудочка (ФВ), ударный объем левого желудочка (УО). На 13 -19 сутки животные были декапитированы, миокард и сосуды животных были подвергнуты гистологическому и биохимическому исследованию. Для изучения клеток миокарда из разных зон: область ишемии, непосредственную зону инфаркта и участки, прилежащие к зоне инфаркта применялся стандартный гистологический метод исследования с применением красителей гематоксилина и эозина. Вместе с миокардом извлекались фрагменты коронарных сосудов (по 2-4 фрагмента от каждого животного). Концентрация оксида азота в крови, в кардиомиоцитах и коронарных сосудах изучалось после лиофилизации методом ЭПР спектроскопии на аппарате "Bruker"(Япония).

Исследования проводили в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Полученные данные были подвергнуты статистической обработке с использованием критерия достоверности.

При электрокардиографическом исследовании животных опытной группы на 14-15 сутки наблюдалось повышение сегмента ST на 2-3 мм и появление патологического зубца Q в двух стандартных отведениях. После применения наномази с изосорбидом динитратом на 1-2 день развития модели коронарной недостаточности мы отметили снижение сегмента ST в стандартных отведениях и снижение зубца Q. В тоже время при исследовании интактных животных в контрольных отведениях ЭКГ повышения сегмента ST и появления зубца Q не наблюдалось.

При ультразвуковом исследовании сердца нами выявлено, что у животных при стрессовых нагрузках происходит ремоделирование полости левого желудочка (таблица 1). Так, конечно-диастолический размер и объем левого желудочка, конечно-систолический размер и объем левого желудочка у животных, подвергнутых стрессу, были достоверно выше по сравнению с аналогичными показателями миокарда контрольной группы, $p < 0,05$.

Ударный объем и минутный объем кровообращения значимо не различались. Фракция выброса и % дельта S у животных при модели иммобилизационного стресса были достоверно ниже аналогичных показателей животных контрольной группы, $p < 0,05$. Модель иммобилизационного стресса, вероятно, вызывает ремоделирование левого желудочка со снижением насосной и сократительной способности миокарда у животных опытной группы, что приводит к развитию коронарной недостаточности. При ежедневном применении наномази с изосорбидом динитратом на фоне развития коронарной недостаточности мы отмечали уменьшение полостей левого желудочка. Так, при трансдермальном применении

наномази с изосорбидом динитратом в течение 17 дней наблюдается снижение КДР на 63,9%, КСР на 55,6%. У животных при применении наномази с изосорбидом динитратом КДО снижалось в 1,9 раз, а КСО снижалось в 2,5 раз. Следует отметить, что при трансдермальном применении наномази с изосорбидом динитратом достоверно повышается насосная функция миокарда, что подтверждается ФВ, которая увеличивается в 1,6 раз.

Таблица 1 - Показатели ультразвукового исследования сердца животных опытной группы до и после применения наномази с изосорбидом динитратом

Показатели	Контрольная группа	Опытная группа	
		До применения	После применения
КДР	0,97 ± 0,13	1,86 ± 0,25*	1,19 ± 0,15°
КСР	0,61 ± 0,17	1,51 ± 0,29*	0,84 ± 0,27°
КДО	1,9 ± 0,56	7,2 ± 1,08*	3,8 ± 0,86°
КСО	0,53 ± 0,21	6,2 ± 1,56*	2,5 ± 1,34°
УО	1,4 ± 0,89	4,4 ± 2,3	2,4 ± 1,3
ФВ	72,4 ± 9,5	41,6 ± 8,7*	65,6 ± 4,2°
% дельта S	37,1 ± 5,8	18,8 ± 2,6*	29,7 ± 5,3

Примечание: * - достоверность различий между показателями животных опытной и контрольной группы, $p < 0,05$. ° - достоверность различий между показателями животных в опытной группе до и после применения наномази изосорбида динитрата, $p < 0,05$.

Также было проведено гистологическое исследование миокарда с подтверждением наличия некротических и апоптотических изменений у животных опытной группы. При исследовании кардиомиоцитов животных из опытной группы гистологическое исследование подтвердило наличие очагов некроза различной величины и наличие апоптозных телец. В зоне некроза у животных опытной группы обнаружены отек интерстиция миокарда, исчезновение поперечной исчерченности, изъеденные контуры мышечного волокна и лизис ядер. В периинфарктной зоне мы обнаружили апоптозные тельца, что, по-видимому, может оказывать влияние на процессы ремоделирования левого желудочка. При применении наномази с изосорбидом динитратом отмечалось снижение отека ткани миокарда и уменьшение апоптотических телец. В контрольной группе животных при исследовании миокарда патологических изменений не обнаружено.

Иначе говоря, возможно, препарат тормозит программированную клеточную гибель кардиомиоцитов.

Для подтверждения целенаправленного действия препарата в миокардиальной ткани мы изучили содержание оксида азота в крови, в ткани, в коронарных сосудах (таблица 2).

Эти исследования подтверждают векторную доставку препарата в миокард, так как мы наблюдали повышенный уровень оксида азота в ткани миокарда и в коронарных сосудах по сравнению с аналогичными показателями животных как контрольной группы, так и опытной группы до применения препарата, $p < 0,05$. Следует отметить, что наиболее повышен уровень оксида азота у животных опытной группы был в миокардиальной ткани. Важно и то, что концентрация оксида азота в коронарных сосудах была достоверно ниже в опытной группе до применения препарата ($p < 0,05$), а на 17 день применения препарата достигла уровня оксида азота в контрольной группе [5, 6].

Таблица 2 - Содержание оксида азота при применении наномази изосорбида динитрата (нмоль/мл)

Группы/ образцы	Контрольная группа	Опытная группа до применения	Опытная группа после применения
Коронарные сосуды	16,18±1,35	6,14±0,52*	18,92±1,31°
Кровь	35,47±1,14	7,47±0,68**	41,24±1,16°*
Ткань миокарда	14,25±1,96	3,11±0,24*	32,93±1,91°**

Примечание: * - достоверность различий между показателями опытной и контрольной группы, $p < 0,05$;

** - достоверность различий между показателями опытной и контрольной группы, $p < 0,001$;

° - достоверность различий между показателями в опытной группе до и после применения мицеллярной формы изосорбида динитрата, $p < 0,05$.

Таким образом, в опытах на животных с моделью инфаркта миокарда убедительно доказана терапевтическая эффективность наномази с изосорбидом динитратом.

Одним из тяжелых и распространенных заболеваний является артрит. Этим заболеванием болеет большой процент населения свыше 60 лет. Само заболевание сопровождается тяжелыми болевыми эффектами и часто приводит к инвалидизации. Для снятия болевого синдрома применяются нестероидные противовоспалительные лекарственные препараты, такие как, «Пироксикам», «Индометацин», «Кетопрофен», «Вольтарен», «Ибупрофен», «Диклофенак» и другие. Однако применение этих лекарств дает следующие осложнения. Во-первых, они сильно раздражают слизистую желудочно-кишечного тракта и их длительное употребление приводит к возникновению язв желудка и поджелудочной железы. Кроме того, они ингибируют синтез простагландинов, в результате чего резко снижаются противовоспалительные реакции организма и происходит поражение почек. Очень тяжелым осложнением приема этих лекарств также является изменение состава крови. В некоторых случаях прием таблеток приводит к головокружению и нарушению координации движений [7-10]. Таким образом, применение этих препаратов чревато возникновением различных серьезных патологий. Для успешного лечения болевых синдромов необходимо создать такие формы, которые бы непосредственно действовали только на больной орган, а не на весь организм.

Так как артрит поражает суставы конечностей, то, естественно, что мы применили наномази, содержащие ФИ нанокапсулы, нагруженные нестероидными противовоспалительными препаратами для лечения суставного артрита. Лечение проводили под руководством профессора А.Ш. Сейсенбаева в Алматинском городском ревматологическом центре. Для лечения брали опытную и контрольную группы больных с воспалительными явлениями в суставах. Каждая группа состояла из 30-ти человек, сопоставимых по полу, возрасту, давности заболевания, стадии и активности процесса. Суставы больных опытной группы обрабатывались наномазью утром и вечером, а суставы больных контрольной группы обрабатывались стандартной лечебной мазью содержащей пироксикам.

Через 3 недели после назначения испытуемого препарата отмечалось существенное уменьшение локального болевого синдрома: значительное уменьшение этого синдрома отметило 75,8% больных, без перемен - 24,2%.

Положительную оценку лечебному действию наномази дали 82,2% исследуемых больных, что говорит об очень высокой эффективности разработанного нами препарата.

Преимуществом наномази, содержащей ФИ нанокапсулы, нагруженные пироксикамом по данным опытной группы является:

1. Доза применяемого пироксикама уменьшается в 10 раз по сравнению с применяемыми на сегодняшний день лекарственными мазями при лучшем терапевтическом эффекте;
2. Более быстрое и глубокое проникновение лекарства в ткани сустава и более длительное их действие на воспаленные ткани;

Таким образом, впервые создана наномазь, содержащая ФИ нанокapsулы, нагруженные пироксикамом, которая оказалась эффективнее существующих противоартритных препаратов.

Проведенные испытания показали, что разработанные нами наномаззи позволяют лечить конкретный больной орган, не вызывая интоксикаций клеток других органов, сокращая при этом сроки лечения в два-три раза и уменьшая расход лекарств в десятки раз.

Литература

1. Gilmanov M.K., Dilbarcanova R, Sultanbaev B.E. // Eljaras foszfamidilinozit eljallitasara biologiai anyagokbil // Magyar Koztarsasag orszagos talalmania hivatal szabadalmi okirat, VNR Patent #199691, Budapest, 06.03.1991., Publ. 16.07.91.
2. Патент США (US Patent #4,977,091. // Method for preparing phosphatidylinositol from vegetable matter // Gilmanov M.K., et all., Publ. 11.12.90).
3. Саменов Н.А., Гильманов М.К., Гильманова С.М. // Способ загрузки липосом // Предварительный патент РК №17043 от 16.01.2006. Заявка №2004/1191.1 РК. – 17.08.2004.
4. Гильманов М.К., Гильманова С.М., Маншарипова А.Т., Аблай - улы Ж., Джусипов А.К., Ахсан Али// Патент №58227 /Изобретение 20611/ Способ снижения концентрации глюкозы в крови нанокapsулярным инсулином // 16.08.2006 г.
5. Маншарипова А.Т., Джусипов А.К., Абылайулы Ж., Ахсан Али, Лекеров Е.М. Запрограммированная клеточная гибель при ишемической болезни сердца: Республиканская научно-практическая конференция с международным участием. «Актуальные проблемы диагностики, лечения и медицинской реабилитации внутренних органов». - Ташкент, 2007. - С. 45-46.
6. Маншарипова А.Т., Гриневиц Е.Е., Бегдуллаев А.К., Ахсан Али . Регистрация апоптоза кардиомиоцитов при экспериментальной сердечной недостаточности и калькуляция апоптотического индекса: Материалы Всероссийского Конгресса по неинвазивной электрокардиологии в клинической медицине «8-й Конгресс Российского общества холтеровского мониторирования и неинвазивной электрофизиологии (РОХМИНЭ)». - Москва, 2007. - С. 65.
7. Страчунский Л. С., Козлов С. Н.Нестероидные противовоспалительные средства: Методическое пособие // Смоленская государственная медицинская академия.
8. Исаков В.А. Как определить степень риска у пациента, принимающего НПВП, выбрать алгоритм его ведения? / Гастроэнтерология. - №2. – 2006.
9. Лоуренс Д. Р., Бенитт П. Н. Клиническая фармакология: в 2 т./ пер. с англ. - М.: Медицина, 1991.
10. Bombardier C., Laine L., Reicin A., Shapiro D., Burgos-Vargas R., Davis B., et al. Comparison of upper gastrointestinal toxicity of rofecoxib and naproxen in patients with rheumatoid arthritis 2000; N Engl J Med 343(21):1520-8.

Түйін

Наномедицина деген ол нанотехнология және медицинаның тоғысуы нәтижесінде пайда болған жаңа сала. Наномедицина болашақта емделуі өте қиын әлемде кең таралған ауруларды емдеудің жаңа тәсілдерін ашады.

Осыған орай біз алғашқы рет теріс зарядты фосфотидилинозитол (фи) нанокapsулаларды алудың жаңа тәсілін таптық. Жүргізілген зерттеулер бойынша фи нанокapsулалар адам ағзасына ешқандай кереғар зиянды әсері жоқ екені дәлелденді. Біз фи нанокapsулаларын дәрі-дәрмектермен жүктеудің жаңа тәсілін ойлап таптық. Бұл тәсіл Қазақстан Республикасының патентімен қорғалған. Ауруды емдеу үшін ең алдымен дәрі енгізілген фи нанокapsулаларды ланолин майымен араластырып теріге жағатын жаңа нано крем алынды. Емделгенде сол нано кремді ауру мүше маңындағы теріге жағады. Алматы қаласының медициналық ғылыми зерттеу институттарында жүргізілген сынақтармен келесі емделуі өте қиын аурулардың жүректің ешимиялық ауруын, диабетикалық табан, глаукома, артрит ауруларын нано кремдердің өте жақсы емдік қасиеттері дәлелденді.

Summary

Nanomedicine is created by the fusion of nanotechnology and medicine. It is one of the most promising pathways for the development of novel strategies of the therapy of serious and widespread diseases.

For the first time we proposed to construct the medicine delivery system from negative charged PI liposomes. The created system we are named them as PI nanocapsules, because they have the size less than 1 mkm. The created PI nanocapsules did not cause undesirable and any adverse reactions of the organism. We developed methods of the effective loading PI nanocapsules by medicines which was protected by patent of Republic of Kazakhstan. Also there was prepared the nano ointments by mix of nanocapsules with lanolin. For therapy of disease the prepared nano ointments were rubbed on the skin on the area of the sick organ. Has been shown high efficiency nano ointment for the therapy of serious diseases such as ischemic heart disease, diabetic foot, glaucoma and arthritis.