

Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования

**РОССИЙСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ  
МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМ. Н.И. ПИРОГОВА**

**Академик РАН  
Заслуженный деятель науки РФ  
В.П. Чехонин**

**Достижения молекулярной и клеточной  
нейробиологии и роль медицинских  
биотехнологий в ее развитии**

**(Актовая речь)**

**Москва 2010**

Академик РАН Заслуженный деятель науки РФ В.П. Чехонин  
Достижения молекулярной и клеточной нейробиологии и роль медицинских биотехнологий в ее развитии (Актовая речь). М.: ИНЭК, 2010.  
- 64с.

ISBN 978-5-94857-080-8

Отпечатано в типографии ООО НВП «ИНЭК»  
Тираж 600 экз.

## Введение

Даже далекий от науки дилетант способен осознать, что на рубеже третьего тысячелетия мы весьма ограниченно понимаем механизмы проявления высших функций нервной системы, таких как анализ изображений и звуков, сознание, обучение, сон, координация движений. И вместе с тем, трудно переоценить достижения современной нейробиологии. Только представьте, в начале первой половины XIX века благодаря работам Пуркинье, Беца, Гольджи, Рамона и Кахалья, Вирхова, Ниссля, Робертсона, Шеррингтона были открыты клетки нервной ткани и закладывались первые представления об их уникальных функциях. Сегодня — в начале XXI века — мы находимся на пороге активного внедрения в практическую медицину не только методов визуализации структур центральной и периферической нервной систем, но и прижизненной оценки функций клеток нервной ткани и мозга в целом.

Биотехнологическая революция, произошедшая после открытия технологии рекомбинантных ДНК, не могла не найти отражения в нейробиологии. Появились новые биотехнологические препараты и технологии лечения первичных опухолей мозга, неизлечимых ранее болезней Альцгеймера и Гентингтона, нейродегенеративных, ишемических и демиелинизирующих болезней центральной нервной системы. Рассматриваются возможности клинического применения генетически реконструированных клеток, создаются высокоселективные системы доставки лекарственных препаратов в область патологического очага в мозге. А в последние десять лет, в связи с развитием методов исследования в наноразмерном диапазоне и накоплением критической массы данных по медицинским аспектам исследования наночастиц и наноматериалов, сформировалось новое научное направление: медицинские нанобиотехнологии. Российский государственный медицинский

университет, следуя давней традиции быть на передовом рубеже науки и понимая всю важность новых технологий для развития медицины и образования, первым из российских медицинских ВУЗов отреагировал на это созданием на медико-биологическом факультете кафедры медицинских нанобиотехнологий.

Кафедра медицинских нанобиотехнологий МБФ РГМУ, несмотря на молодой возраст, имеет тридцатилетнюю предысторию, непосредственно связанную с МОЛГМИ и, в последующем, с РГМУ имени Н.И. Пирогова. В 1970 — 1980-х годах на кафедре биохимии МОЛГМИ и в проблемной лаборатории по иммунохимии злокачественных и эмбриональных тканей под руководством выдающегося российского ученого Ю.С. Татарина и при прямом участии одного из талантливейших иммунохимиков страны доктора В.В. Калашникова закладывался методологический фундамент нового тогда научного направления — иммунохимии белков нервной ткани.

Уровень научных исследований в МОЛГМИ им Н.И. Пирогова в семидесятые – восьмидесятые годы прошлого века достиг невиданных высот, что послужило основанием для создания на его базе новых научно-исследовательских Центров, среди которых: НИИ физико-химической медицины — под руководством академика РАМН Ю.М. Лопухина, НИИ урологии — под руководством академика РАМН Н.А. Лопаткина, НИИ пульмонологии — под руководством академика РАМН А.Г. Чучалина, НИИ биомедицинской химии — под руководством академика РАМН А.И. Арчакова.

Центр нейробиологических исследований на основе современных достижений биотехнологии переместился в НИИ судебной психиатрии им. В.П. Сербского, где под руководством академиков РАМН Г.В. Морозова и Т.Б. Дмитриевой, а также при участии академика Ю.А. Овчинникова был организован научный отдел фундаментальной и прикладной нейробиологии, который возглавил академик РАМН В.П. Чехонин.

На протяжении всего периода исследований в отделе поддерживаются постоянные научные контакты с клиниками и кафедрами РГМУ им. Н.И.Пирогова. Среди них следует отметить:

- исследования структурно-функциональных свойств мембран нейронов и их коррекция у новорожденных, перенесших острую гипоксию в родах, изучение проницаемости гематоэнцефалического барьера (ГЭБ) у беременных, рожениц, плодов и новорожденных при ОПГ-гестозах, выполненные совместно с кафедрой академика РАМН Г.М. Савельевой;
- разработку клиничко-нейросонографических и иммунохимических критериев диагностики и прогноза у детей с перинатальным поражением ЦНС, у плодов и новорожденных с гипербилирубинемией, изучение состояния ГЭБ у детей раннего возраста, страдающих фебрильными судорогами, выполненные совместно с кафедрой академика РАМН Н.Н. Володина.
- изучение клиничко-иммунохимических характеристик ремиттирующего и вторично-прогрессирующего рассеянного склероза, цереброваскулярных и нейродегенеративных заболеваний, а также анализ перспектив применения препаратов стволовых клеток различного происхождения в терапии острых расстройств мозгового кровообращения выполненные совместно с кафедрой академика РАМН Е.И. Гусева.
- разработку принципиально новых методов анализа и прижизненной селективной коррекции функций эндотелиоцитов совместно с кафедрой академика В.С. Савельева

Открытие в 2009 году кафедры медицинских нанобиотехнологий и научно-исследовательского отдела создало предпосылки организации на их базе первого в стране научно-образовательного центра медицинских нанобиотехнологий, в состав которого помимо отдела фундаментальной и прикладной нейробиологии ГНЦССП им. В.П. Сербского, вошли НИИ химической физики им. Н.Н. Семенова РАН и 48-й НИИ МО РФ.

В данной речи будут освещены основные направления исследований, проводимых кафедрой медицинских нанобиотехнологий МБФ РГМУ и её научными партнёрами. Среди них, как фундаментальные аспекты иммунохимии, молекулярной и клеточной биологии нервной ткани, так прикладные направления, основанные на применении высокотехнологичных подходов: иммуноадсорбционная защита мозга от аутоантительной агрессии, разработка высокоселективных наноконтейнерных систем адресной доставки диагностических и лекарственных препаратов, а также современных клеточных технологий.

## **Нейроспецифические белки — уникальные маркеры функций клеток нервной ткани**

Одним из наиболее продуктивных разделов нейробиологии на рубеже XX — XXI веков, несомненно, стала нейроиммунохимия — научная дисциплина, изучающая нейроспецифические антигены и антитела к ним. Именно этому классу биологически активных молекул, характеризующихся высокой специфичностью для клеток нервной ткани, отводится значительная роль в биохимии и молекулярной биологии специфических интегративных процессов нервной системы (память, мышление, внимание, эмоции и т.п.).

Открытие нейроспецифических белков (НСБ) подтвердило концепцию, согласно которой специфические свойства любой ткани определяются паттерном экспрессируемых в ней кодирующих генов. Экспрессия генов этих белков значительно снижена или полностью заблокирована почти во всех клетках, за исключением клеток нервной ткани.

Из наиболее изученных на сегодняшний день нейроспецифических белков стоит отметить белки семейства S100, триплет нейрофиламентов (NF-68, -160, -200), нейронспецифическую енолазу (NSE), глиофибрилярный кислый белок (GFAP), основ-

ной белок миелина (МВР) и  $\alpha_2$ -гликопротеин мозга ( $\alpha_2$ GP). Кроме того, в наших исследованиях были впервые обнаружены два минорных белка, специфичных для нервной ткани, названные  $\alpha_1$ BG и  $\alpha_2$ BG (В.П. Чехонин, 1989), функция которых до настоящего времени неизвестна (Рис. 1).

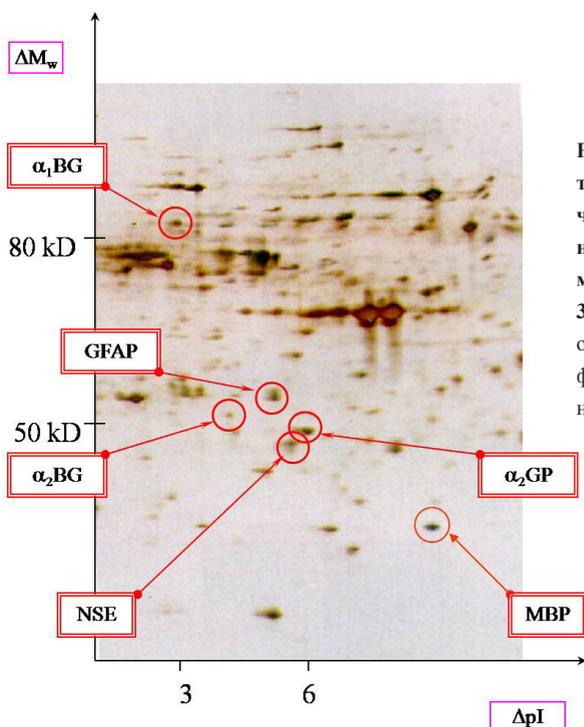


Рис. 1. Двумерный электрофорез по O'Farrell части протеома нервной ткани в диапазоне молекулярной массы от 30 до 120 КДа. Обведены основные нейроспецифические белки. Импрегнация серебром.

Крайне интересной проблемой является изучение роли НСБ в реализации конкретных молекулярных механизмов высших психических функций. Взаимосвязь экспрессии с высшими психическими функциями, пожалуй, наиболее изучена для гетеродимерных  $Ca^{2+}$ -связывающих белков семейства S100. В частности, можно считать доказанным прямое участие S100b в регуляции обучения и запоминания. В независимых экспериментах *in vivo* и *in vitro* было показано, что антитела к этому антигену препятствуют развитию долговременной потенциации гиппокампа (один из нейрональных механизмов па-

мяти), при которой происходит выброс свободного антигена S100 из глиальных клеток в интерстициальное пространство (Lewis D.1986; Fazeli M.S., 1990). Также показано, что белок S100 непосредственно участвует не менее чем в двух процессах, сопряженных с этой потенциацией: в облегчении проникновения  $Ca^{2+}$  внутрь клетки и в мобилизации цитоплазматического пула  $Ca^{2+}$  в нейронах и глиальных клетках. Кроме того, белок S100 ингибирует фосфорилирование некоторых белков, для которых доказано участие в этих механизмах. Внутрижелудочковое введение антител к S100 крысам приводило к снижению продуктивности обучения при экспериментах в лабиринте и к изменениям в предпочтениях право- или левосторонности.

Исследованиям поведенческих последствий гиперэкспрессии антигена S100 в мозге посвящены и работы R.Gerlai и соавт. (1996), в которых на примере трех линий трансгенных мышей с множественными копиями гена этого белка было показано достоверное снижение эффективности обучения. Эта система, в частности, может применяться в качестве одной из моделей для исследования роли антигена S100 при синдроме Дауна, также характеризующимся гиперэкспрессией этого антигена вследствие хромосомных нарушений (трисомия по 21-й хромосоме).

Важные результаты были получены относительно участия белка S100 в модулировании сборки цитоскелета глиальных клеток, в частности его влияния на полимеризацию еще одного нейроспецифического белка — глиофибрилярного кислого протеина (GFAP). В этих работах было показано, что S100 связывается с мономерами неполимеризованного GFAP и тем самым ингибирует его полимеризацию (Bianchi R. et al., 1996).

Для большинства других НСБ однозначно показана их роль в нейрогенезе — у животных с нокаутированными генами этих белков возникают в той или иной степени выраженные нарушения развития нервной системы (от летальных, до выявляемых лишь

специальными нейрофизиологическими тестами). Конкретные молекулярные механизмы высших психических функций, реализующиеся с помощью НСБ, ещё только предстоит выяснить.

В свете участия НСБ в реализации функций клеток мозга, хотелось бы сказать несколько слов о нейроспецифических белках промежуточных филаментов, в частности о триplete нейрофиламентов, специфичном для нейронов, и уже упомянутом GFAP (от англ. *glial fibrillar acidic protein*), специфичном для астроглии. Дело в том, что цитоскелет всех эукариотических клеток состоит из трёх главных белковых конструкций: микрофиламентов актина, диаметром 6 нм; микротрубочек, диаметром 20 нм; и промежуточных филаментов, диаметром 8 – 12 нм. В отличие от эволюционно-консервативных белков актиновых микрофиламентов и микротрубочек, белки промежуточных филаментов демонстрируют значительную гетерогенность, видовую и клеточную специфичность (к настоящему времени описано более 45 белков промежуточных филаментов, встречающихся в различных клетках позвоночных). Таким образом, специфические для той или иной ткани функции могут быть непосредственно связаны с уникальной структурой и свойствами промежуточных филаментов в клетках этой ткани.

Почти все из перечисленных выше НСБ широко применяются для иммунофенотипирования клеток нейроэпителиального происхождения в первичных и линеаризованных культурах из нервной ткани (Рис. 2). Триплет нейрофиламентов незаменим для идентификации нейронов, в частности для доказательства дифференцировки стволовых и прогениторных клеток по нейрональному пути. GFAP — астроглиальный белок промежуточных филаментов применяется для идентификации дефинитивных и реактивных астроцитов. С помощью иммунофлюоресцентной визуализации этого белка, в частности, можно легко дифференцировать незрелый астробласт от зрелого реактивного астроцита. Основной белок миелина явля-

ется специфическим маркером центральных олигодендроглиоцитов и периферических Шванновских клеток. Однако нужно отметить, что прикладные возможности нейроспецифических белков выходят далеко за рамки обычного иммунофенотипирования.

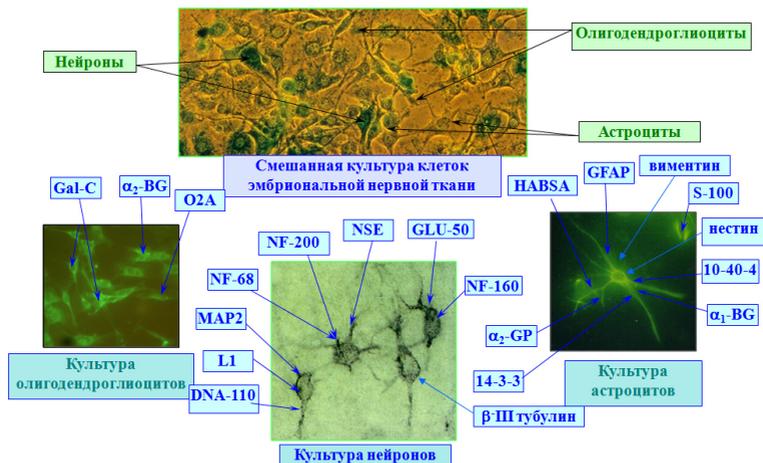


Рис. 2. Клеточная локализация известных на сегодняшний день нейроспецифических белков.

## Клинико-лабораторное значение НСБ

Уникальная экспрессия НСБ только в пределах нервной ткани имеет два важных следствия. Во-первых, эти белки почти полностью отсутствуют в периферическом кровотоке и могут появляться там только при патологии ЦНС и гематоэнцефалического барьера. Во-вторых, поскольку гематоэнцефалический барьер в норме полностью отграничивает мозг от клеток иммунной системы, у последних отсутствует иммунологическая толерантность к НСБ. Вследствие этого элиминация НСБ в кровотоке потенциально может запускать иммунный ответ и продукцию нейротоксических аутоантител.

Таким образом, нейроспецифические белки в системном кровотоке являются не просто высокоспецифическими диагно-

стическими маркерами поражения нервной ткани, но и патогенетическим звеном в механизме аутосенсibilизации в процессе развития заболеваний нервной ткани. Наиболее наглядно механизм аутосенсibilизации антигенами нервной ткани наблюдается в процессе развития демиелинизирующих заболеваний, когда в цереброспинальной жидкости и кровотоке многократно повышается титр аутоантител к основному белку миелина и другим специфическим для олигодендроглии белкам.

В многочисленных, в том числе и в наших, исследованиях показано, что анализ уровня некоторых нейроспецифических белков (NSE, S100b, MBP, GFAP и др.) в сыворотке крови позволяет охарактеризовать как степень патологических изменений в ЦНС, так и прогнозировать исход различных критических состояний нейропсихического генеза (*Reaz N, 2005; Rosengren L, 2007; C.S. Jung, and M. Sitzer, 2007, Чехонин В.П. 1989*). В частности, иммуноферментный анализ GFAP позволяет оценить степень астроглиоза и воспалительных изменений в головном мозге.

Реактивный астроглиоз сопровождается повышенной пролиферацией фибриллярных астроцитов в зоне патологии, гипертрофией их клеточных тел и цитоплазматических отростков, усиленным синтезом белков цитоскелета, в частности GFAP. GFAP-позитивные реактивные астроциты мигрируют в область патологического очага и образуют перифокальный реактивный вал. Такой вал, в частности, крайне выражен при первичных низкодифференцированных опухолях мозга (мультиформная глиобластома, медуллобластома). В процессе роста и распространения опухоли реактивные астроциты в большом количестве гибнут и их белки элиминируются через поврежденный ГЭБ. Вследствие этого концентрация GFAP в сыворотке крови находится в прямой зависимости от объема реактивного астроглиоза, и, следовательно, прямо пропорциональна размеру очага опухоли, даже несмо-

тря на то, что сами низкодифференцированные глиальные опухоли не экспрессируют ген GFAP.

Достоверная положительная корреляция уровня GFAP и объёма экспериментальной глиомы была показана нами в эксперименте с динамическим МРТ исследованием, что позволяет судить о диагностической и прогностической ценности мониторинга GFAP в сыворотке крови пациентов с глиобластомой. При этом особое внимание должно уделяться случаям как с резким возрастанием концентрации GFAP, так и с резким её падением, поскольку последний вариант может наблюдаться при достижении глиобластомой очень больших размеров и определенном «истощении» компенсаторных возможностей реактивных астроцитов. Конечно, иммуноферментный анализ GFAP в сыворотке крови не может заменить нейровизуализационных методов, однако, благодаря своей простоте и, что немаловажно, дешевизне этот метод может стать своего рода скрининговым тестом для отбора пациентов на МРТ.

Развитие количественных методов анализа индивидуальных антигенов в белковой смеси с чувствительностью менее 50 пг/мл существенно повысило диагностическое значение анализа нейроспецифических антигенов в сыворотке крови. Во всём мире в клинико-лабораторную практику внедрены тест-системы иммуноферментного анализа нейроспецифических белков. Три высокочувствительных иммуноферментных тест-системы для количественного определения MBP, GFAP и NSE разработаны и сертифицированы нами в России. Эти тест-системы успешно применяются для диагностики и прогнозирования исхода таких заболеваний ЦНС, как: критические состояния различной этиологии (*Морозов Г.В., Морковкин В.М., Кекелидзе З.И. 1986-1992*), инфекционные (*Покровский В.И., Лисукова Т.Е. 1987-1991*), цереброваскулярные (*Гусев Е.И., 1991-2001, Савельева Г.М., Шалина Р.И. 1989-2003, Володин Н.Н. 1987-2006*), травматические поражения мозга, демиелинизирующие заболевания (Гу-

сев Е.И., Бойко А.Н., Беляева И.А. 1987-2004), а также и некоторых других заболеваний. NSE, например, помимо того, что является маркером деструкции нервной ткани, гиперэкспрессируется при мелко-клеточном раке легкого и поэтому успешно применяется в качестве селективного онкомаркера. А иммуноферментное определение  $\alpha_2$ GP в сыворотке крови может быть полезно для диагностики и контроля за эффективностью лечения болезни Туретта. Установлено, что сывороточные концентрации этого мозгового антигена повышаются в прямой корреляции со степенью выраженности симптомов заболевания (Морковкин А.В., Чехонин В.П., 1986). Поскольку патогномичных лабораторных тестов для болезни Туретта не существует, иммуноферментное определение  $\alpha_2$ GP может быть хорошим подспорьем для дифференциальной диагностики.

В последние годы наметилась тенденция применения иммуноферментного определения панели из нескольких НСБ для проведения дифференциальной диагностики (Рябухин И.А., 2003). Применение таких панелей, в состав которых включены маркеры повреждения различных клеточных типов нервной ткани, значительно более информативно, чем анализ отдельных белков.

Следует отметить, что клиническое внедрение иммуноферментных тест-систем для определения НСБ в биологических жидкостях было бы невозможно без соответствующего уровня развития биотехнологической базы. Во-первых, тест-антигенами для «положительного контроля» в этих системах являются рекомбинантные нейроспецифические белки (Павлов К.А. 2006-2009). Трудно себе представить, насколько биотехнологическая процедура получения белка с заданной первичной структурой упрощает получение стандартного образца. Стандартизация тест-антигенов, которые получали рутинными препаративными методами из постмортального мозга, была невозможна. Во-вторых, не следует забывать, что и моноклональные антитела для иммуноферментных тест-систем получают с помощью гибридомной биотехнологии

(Гурина О.И., 1996-2005, Семенова А.В., 2001-2003), также позволяющей полностью стандартизировать производство антител.

В следующих разделах будут освещены два наиболее интересных прикладных аспекта исследований нейроспецифических белков: применение моноклональных антител (MAb) к НСБ для адресной доставки диагностических и лекарственных препаратов через поврежденный ГЭБ и защита мозга от аутоантительной агрессии с помощью экстракорпоральной иммуносорбции аутоантител к НСБ.

### **Моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам — один из основных биотехнологических инструментов в нейробиологии**

Антитела — созданный самой природой и пока незаменимый инструмент как для детекции антигена-мишени в сложном белковом растворе, так и для адресной доставки чего-либо в клетку, презентующую антиген-мишень. С учётом высокоселективной экспрессии нейроспецифических антигенов, моноклональные антитела к ним являются весьма перспективными векторными молекулами для транспорта диагностических и лекарственных препаратов через ГЭБ.

Особое значение в эпоху развития биотехнологий моноклональные антитела приобретают в нейроонкологии. Основу иммунотерапии опухолей заложили Pressman и Keighley впервые применившие сыворотку, содержащую антитела в лечении рака ещё в 1948 году. Гибридная технология, созданная в 1975 году Köhler G. и Milstein C. (Нобелевская премия 1984 года) позволила получить моноклональные антитела к уже известным онкомаркерам (канцеро-эмбриональный антиген, Gold P., Freedman S. O, 1965, альфа-фетопротеин, Bergstrand C. G., Czar B., 1956), а также открыть ряд новых опухоль-ассоциированных антигенов, в том числе и специфичных для глиобластомы. Были получены антитела к

эпидермальному, инсулино-подобному и сосудистому факторам роста, гиперэкспрессированным в глиомах.

Биотехнологическая революция сделала возможным создание нового класса рекомбинантных биспецифических антител и разработку на их основе многокомпонентных систем радиоиммунодиагностики и терапии. Были синтезированы так называемые «гуманизированные» антитела, т.е. антитела, содержащие последовательности человеческих иммуноглобулинов (как Fc фрагмента, так и полных человеческих антител со встроенными гипервариабельными областями CDR1-3 из иммуноглобулинов мыши). Системное введение таких антител человеку не вызывает иммунных реакций, что позволило перейти к клиническим испытаниям. В настоящее время на рынке биофармпрепаратов существует уже около двух десятков препаратов гуманизированных антител, одобренных FDA и другими аналогичными организациями для лечения различных опухолей человека. Например, “Tositumomab”, “Rituximab” — антитела к CD20, применяющиеся для терапии лимфом, “Gemtuzumab” — антитела к CD33, разработанные для лечения миелоидной лейкемии, “Lim-1” — антитела к HLA-DR, “Vitaxin” — антитела к опухоль-специфическому интегрину  $\alpha\beta 3$ , “Trastuzumab”, “Cetuximab”, и “Bevacizumab” — антитела к различным доменам рецепторов эпидермального и сосудисто-эндотелиального факторов роста. Уже сейчас доходы от продажи только двух из перечисленных выше препаратов гуманизированных антител — Херцептина® и Авастина® составляет около 15 миллиардов долларов в год, и аналитики прогнозируют дальнейшую интенсификацию спроса на биотехнологические антитела в ближайшем будущем.

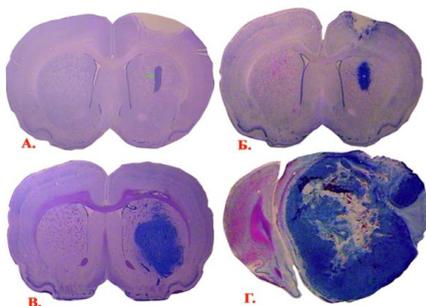
## **Адресная доставка в мозг с помощью антител к GFAP**

Концепция направленного транспорта в мозг с помощью антител тесно связана с преодолением гематоэнцефалического барьера. МАb, пригодные для этой цели, должны специфически

распознавать антиген-мишень и не терять иммунохимическую активность *in vivo*. Для создания направленности МАb антиген-мишень должен присутствовать в опухоли в концентрации, намного превышающей его уровень в нормальных тканях, и при этом быть доступным для антител, циркулирующих в кровотоке.

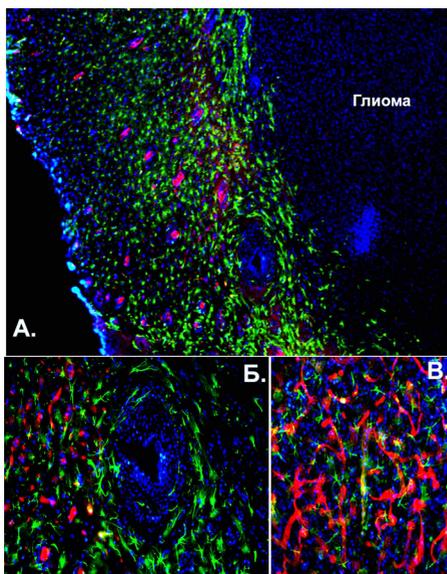
Известно, что опухоли головного мозга сопровождаются изменением проницаемости ГЭБ и реактивной астроглиальной реакцией, различные феномены которой подтверждены многими исследователями (*Sternberger N. H. 1987; Grabb PA, 1995; Risau W 1994, Чехонин В.П. и соавт 2009*). В эндотелиоцитах опухолевых микрососудов изменяется синтез белков, поддерживающих барьерные функции, в частности, исчезает ЕВА (endothelial barrier antigen) — эндотелиальный барьерный антиген, высокоспецифический маркер барьерных эндотелиоцитов церебральных микрососудов. Кроме того, отмечается увеличение экспрессии генов, нетипичных для барьерного эндотелия (Рис. 4).

В проведенных нами ранее исследованиях (*Чехонин В.П. и соавт., 2004*) удалось показать селективное накопление моноклональных антител к нейроспецифическим белкам (GFAP и нейронспецифическая енолаза) в мозге крыс с поврежденным ГЭБ в результате окклюзии средней мозговой артерии. Эти данные показали возможность применения антител к указанным нейроспецифическим антигенам для направленного транспорта лекарственных препаратов в патологические очаги, в частности, при экспериментальной глиоме С6. Факторами, которые могут обеспечить адресную доставку с помощью антител к GFAP, являются избыточная экспрессия антигена-мишени астроцитами в перитуморальной зоне и критическое повышение проницаемости гематоэнцефалического барьера в неопластических микрососудах. Возможность направленного транспорта антител к GFAP в очаг экспериментальной глиомы никем до нас не исследовалась.



**Рис. 3.** Общий вид имплантированной в стриатум глиомы С6 спустя 2 часа (А), 3 (Б), 15 (В) и 28 (Г) суток после имплантации.

Замороженные срезы, окрашенные 0,1% толуидином. Участки некроза окрашены с помощью ваннадиево-кислого фуксина по методике И.В. Викторова. Увеличение  $\times 20$



**Рис. 4** Иммунофлуоресцентная визуализация GFAP и EBA (зелёная и красная флюоресценция соответственно) на срезах глиомы.

А. Общий вид, увеличение  $\times 100$ .

Б. Увеличенный фрагмент  $\times 200$ . GFAP-позитивные астроциты вокруг участка инвазии (DAPI). В. Нормальная нервная ткань окрашенная с помощью антител к GFAP и EBA.  $\times 200$

Результаты наших экспериментов показали изменения в экспрессии эндотелиальных антигенов быстро растущих опухолевых микрососудов. Среди эндотелиальных антигенов мы оценивали уже упомянутый эндотелиальный барьерный антиген (EBA) и антиген, распознаваемый моноклональными антителами 2mB6, полученными в лаборатории иммунохимии ГНЦССП им. В.П.Сербского (Баклаушев В.П., Гурина О.И. 2003-2007). Моноклональные антитела 2mB6 распознают эндотелиальный антиген AMVB1, в норме почти не экспрессирующийся в микроциркуляторном русле, за исключением ми-

крососудов мозжечка и ствола мозга. При экспериментальной глиоме С6 было обнаружено значительное повышение экспрессии AMVB1 в собственной сосудистой системе опухоли. Начиная с седьмого-восьмого дня после имплантации, с помощью антител 2mB6 в опухоли визуализировалась разветвленная сеть AMVB1-положительных микрососудов. Наоборот, с помощью моноклональных антител к ЕВА мы обнаружили отсутствие экспрессии этого маркера в сосудах глиомы С6 и в прилегающей к ней интактной ткани уже на ранних сроках её развития (Рис. 4). Эти изменения свидетельствуют о молекулярной перестройке эндотелиального барьера как в собственно неопластических микрососудах, так и в микрососудах в области астроглиального вала (Юсубалиева Г.М., Баклаушев В.П. 2007-2010).

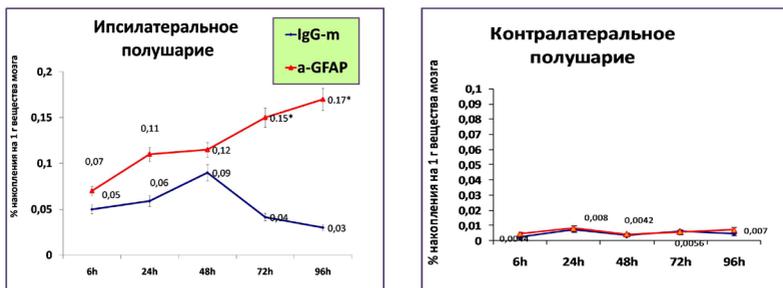


Рис. 5. Накопление меченных  $^{125}\text{I}$  антител к GFAP в пораженном глиомой полушарии после их внутривенного введения.

Дефект ГЭБ в области астроглиального вала и гиперэкспрессия GFAP обусловили избирательное накопление моноклональных антител к этому НСБ после их внутривенного введения. Было показано более чем 20-ти кратное накопление меченных радиоизотопом антител в опухоли, по сравнению с интактной тканью. При этом специфические антитела накапливались в опухоли в пять раз больше, чем неспецифические, содержание первых продолжало нарастать в пораженном полушарии вплоть до 96 часов после введения (продолжительность эксперимента), в то время как неспецифические IgG достаточно быстро элиминировались из мозга (Рис. 5).

Максимальное значение накопления — 0,17% от введенной дозы на 1г сырого вещества мозга, наблюдающееся через 96 часов после введения, было сопоставимо со значениями радиоактивности органов ретикулоэндотелиальной системы, которые колебались в пределах 0,1 — 0,3%/г от введенной дозы. Такое накопление не позволяет доставить в опухоль достаточное для радиотерапии количество радиоактивного изотопа (сделать это с помощью каких-либо антител не удавалось ещё никому), однако, его вполне хватит, чтобы с высокой специфичностью визуализировать границы опухоли с помощью того же радиоизотопа методом СРЕСТ или с помощью парамагнитной метки на МРТ. Кроме того, такого накопления может оказаться достаточным для доставки наноконтейнерных систем с генетическим материалом в очаг глиобластомы.

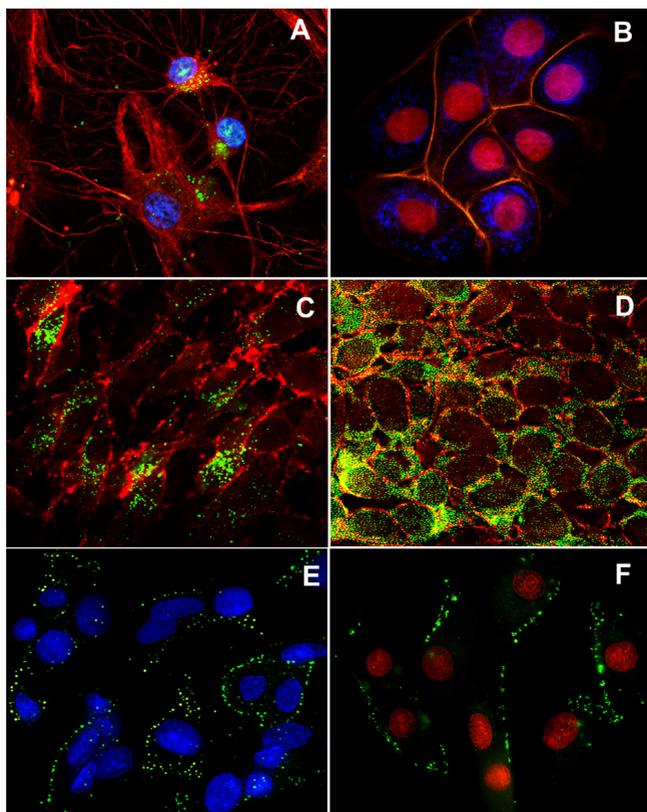
### **Адресная доставка в мозг с помощью антител к экстраклеточному фрагменту коннексина 43**

Ещё одной перспективной молекулярной мишенью для адресной доставки наносистем в мозг является коннексин-43 (Cx43). Этот белок — основной структурный компонент щелевых контактов (gap-junction) между астроцитами, участвующими в функциях гематоэнцефалического барьера (*Prochnow N. 2008*). С помощью четырех трансмембранных доменов Cx43 образует гексамеры — коннексоны, формирующие пору в клеточной мембране. Фосфорилирование и дефосфорилирование С-концевых участков позволяет «открывать» и «закрывать» трансмембранный канал. Посредством двух экстраклеточных фрагментов Cx43 (E1 и E2) гемиканалы соседних клеток формируют полноценный щелевой контакт, объединяющий цитоплазмы этих клеток. С помощью таких каналов осуществляется поддержание ионного гомеостаза и клеточного объёма, а также передача различных межклеточных сигналов, в том числе регулирующих пролиферацию, дифферен-

цировку, апоптоз и миграцию эмбриональных клеток в онтогенезе. Новейшие исследования показали взаимосвязь коннексина 43 и кадгеринов — другого класса интегральных белков, осуществляющих межклеточную адгезию. Предполагается, что помимо формирования щелевого контакта, коннексоны могут выполнять другие функции, связанные с регуляцией клеточной адгезии.

Большой интерес вызывает участие Cx43 в развитии инвазивных опухолей глиального происхождения. Существуют экспериментальные данные, показывающие активирующее влияние Cx43 на процессы инвазии мультиформной глиобластомы человека и её аналога у крыс — экспериментальной глиомы C6 (*Oliveira R, 2005*). В частности, было продемонстрировано, что Cx43-положительные клетки C6-глиомы обладают более высокой способностью к миграции, чем Cx-43 негативные, а также то, что они более устойчивы к оксидативному стрессу и различным другим повреждающим факторам (*Bates DC, 2007*). Последний феномен делает интересным исследование Cx43 в рамках концепции резистентных к химио- и радиотерапии популяций глиомных клеток.

Нами были получены моноклональные антитела к рекомбинантному экстраклеточному домену E2 Cx43, взаимодействующие с Cx43 в нативной конформации (*Баклаушев В.П., Гурина О.И. 2009*). Эти антитела визуализировали плакоидные структуры коннексонов на фиксированных первичных астроцитах и клетках глиомы C6 крысы, равно как и на клетках глиобластомы U251 и 293-й линии эмбрионального почечного эпителия человека (Рис.6., А — D). Наиболее яркая флюоресценция наблюдалась в препаратах эмбрионального почечного эпителия, что соответствует представлениям о высоком уровне экспрессии белков gap-junction в эмбриогенезе (Рис.6., D). У фиксированных клеточных препаратов визуализировался как мембранный, так и клеточный пул Cx43.



**Рис. 6. Иммунофлюоресцентный анализ Sx43 на фиксированных и живых клеточных культурах.**

**А.** Культура астроцитов. Красная флюоресценция — поликлональные антитела к GFAP; зеленая флюоресценция — МАb Sx43. Ядра клеток — DAPI (Invitrogen).

**В.** U251 глиобластома человека. Синяя флюоресценция — МАb Sx43. Оранжево-красная флюоресценция — актиновые филаменты (Phalloidin-TRITC, Fluka). Ядра клеток — TOTO 633 (Invitrogen).

**С.** Глиома С6 крысы. Красное —  $\beta$ -Катенин, зеленое — МАb Sx43 **Д.** Эмбриональный почечный эпителий (линия 293). Красное — пан-Кадгерины, зеленое — МАb Sx43.

**Е.** Визуализация Sx43 в живой культуре глиобластомы U251 (зеленая флюоресценция). Ядра клеток докрашены DAPI **Ф.** Визуализация Sx43 в живой культуре глиомы С6 (зеленая флюоресценция). Ядра клеток докрашены TOTO 633. Увеличение  $\times 1000$ .

Очищенные моноклональные антитела к экстраклеточному домену E2 хорошо визуализировали Cx43-положительные клетки низкодифференцированных глиом в живой культуре (Рис. 6., E, F). В этом случае наблюдалась флюоресценция только мембранных коннексонов. Ни в одном из препаратов не наблюдалось флюоресценции межклеточных соединений характерной для димерных коннексонов, интегрированных в gap-junction. На основании этого мы предположили, что полученные антитела позволяют визуализировать Cx43 на этапе презентирования коннексонов на цитолемме в виде гемиканала.

Мы испытали полученные нами антитела к E2 Cx43 в двух различных экспериментах *in vivo*. В обоих случаях антитела вводились в бедренную вену крысам с экспериментальной глиомой C6. В первом случае они содержали радиоизотопную метку ( $^{125}\text{I}$ ), а во втором — флюоресцентную метку в виде Alexa Fluor 660 с пиком эмиссии в дальней красной, близкой инфракрасной области. И в первом, и во втором случае нам удалось детектировать антитела к E2 Cx43 в патологическом очаге в мозге спустя 48 часов после внутривенного введения. В случае радиоизотопной метки мы наблюдали накопление 0,27% от введенной дозы в ткани пораженного глиомой полушария. Применение инфракрасного флюорофора позволило детектировать клетки, в которых происходит накопление антител к Cx43. Как и в случае с антителами к GFAP, анти-Cx43 накапливались в коннексин-положительных клетках астроглиального вала (Рис. 7).

Как видно из Рис. 7, далеко не все клетки, захватывающие антитела к Cx43 из кровотока являются GFAP-позитивными. Этот обнаруженный нами крайне интересный феномен может говорить о том, что преимущественное накопление антител к экстраклеточному фрагменту Cx43 наблюдается в дедифференцированных астроцитах перитуморальной зоны — астробластах (*В.П.Баклаушев, Г.М. Юсубалиева, 2010*).

Адресная доставка в перитуморальную область с помощью антител к GFAP и Cx43 имеет несколько очевидных перспектив.

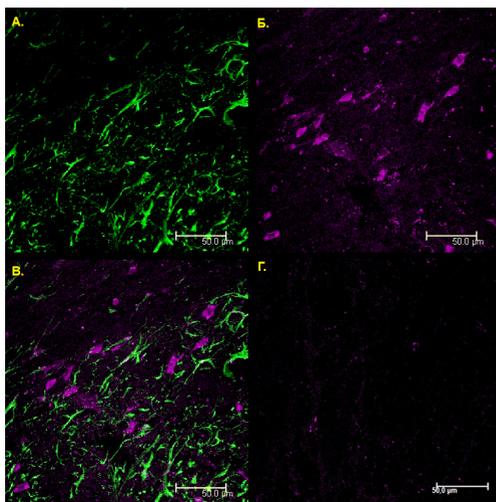


Рис. 7. Визуализация Sx43-положительных клеток в области перитуморального астроглиального вала при внутривенном введении антител к Sx43, меченных Alexa Fluor 660 (Invitrogen). А. Иммунофлюоресценция с помощью антител к GFAP. Б. Прижизненно визуализированные с помощью антител к Sx43-Alexa Fluor 660 клетки. В. Объединённое изображение. Г. Отрицательный контроль (внутривенное введение меченных Alexa Fluor 660 неспецифических антител).

Во-первых, крайне важно, например, при хирургической резекции опухоли правильно определить её границы с учётом всех имеющихся участков перивазальной и периневральной инвазии. Поскольку реактивные астроциты сопровождают все такие участки, их визуализация позволит чётко отграничить область инвазии глиомы от нормальной ткани. Во-вторых, в последних исследованиях показано, что именно в перитуморальной области идёт наиболее активная инвазия глиомы. В этой области локализуются так называемые стволовые опухолевые клетки, поддерживающие пул активно мигрирующих радио- и химио-резистентных клеток глиомы. Таким образом, с помощью полученных нами антител можно пытаться доставить в эти клетки перитуморальной зоны мощные цитостатики или терапевтические гены (см. раздел, посвященный иммунолипосомальным наноконтейнерам).

## Высокоселективные иммуноадсорбенты для защиты мозга от аутоантительной агрессии

Хорошо известно, что в сыворотке крови людей с некоторыми нервными, психическими и нейроонкологическими заболеваниями, с нейроинфекциями и черепно-мозговыми травмами отмечаются вы-

сокие концентрации аутоантител к НСБ. При этом аутоантительная агрессия в значительной степени мешает регенерации ГЭБ и служит дополнительным фактором, осложняющим течение заболевания. В связи с этим одной из эффективных терапевтических процедур, проводимых при критических состояниях, которые обусловлены подобными ситуациями, является как можно более полное удаление из организма больного циркулирующих АТ. Наиболее часто это выполняется методами плазмафереза или экстракорпоральной гемосорбции.

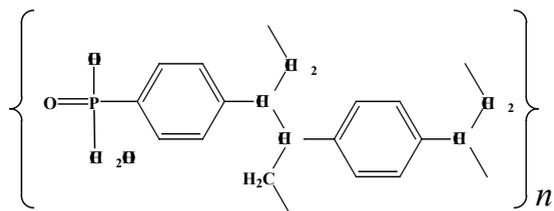
Различные варианты экстракорпоральной гемосорбции прочно вошли в арсенал терапевтических процедур, применяемых при лечении многих заболеваний (*Лопухин Ю.М. 1975-1990*). В последнее время заметно стремление к переходу от неизбежного извлечения широкого спектра компонентов крови к селективному удалению только отдельных патогенетических факторов. Поэтому большее внимание исследователей привлекает метод экстракорпоральной иммуноадсорбции, в основе которого лежит именно селективное удаление из биологических жидкостей компонентов реакции антиген — антитело.

Нами был разработан метод экстракорпорального извлечения АТ к НСБ непосредственно из крови пациента. Эта работа состояла из следующих этапов.

- Подготовка препаратов НСБ (GFAP, MBP, NSE,  $\alpha$ 1BG,  $\alpha$ 2BG,  $\alpha$ 2GP) к иммобилизации на твердофазном носителе (*Чехонин В.П., Рябухин И.А. 1986-2001*).
- Выбор твердофазного носителя и его подготовка к иммобилизации специфических антигенов мозга (*Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А. 1986-2001*.)
- Получение иммуноадсорбента и приготовление его лекарственной формы, пригодной для использования в процедуре иммуноадсорбции (*Чехонин В.П., Лейкин Ю.А., Черкасова Т.А. 1986-2001*).

- Непосредственная разработка процедуры экстракорпоральной иммуноадсорбции. (Чехонин В.П., Лейкин Ю.А., Морозов Г.В., Морковкин В.М., Кекелидзе З.И. 1986-2001.)

В качестве твердофазного носителя применялась высокомолекулярная матрица, представляющая собой сополимер стирола и дивинилбензола с введенными в его структуру оксиметилполистирилфосфоновокислотными группами (К-2-6), любезно предоставленная лабораторией синтеза и исследования сорбентов МХТУ им. Д.И.Менделеева (зав. лабораторией – профессор Ю.А.Лейкин):

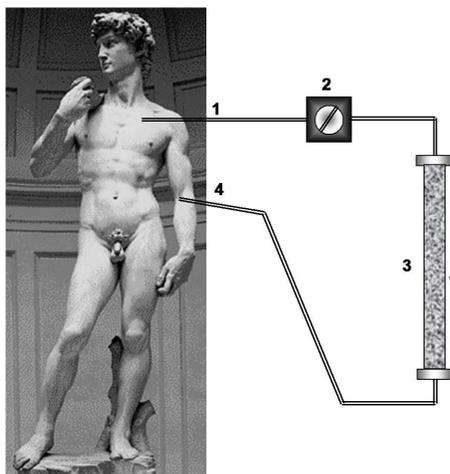


Иммобилизация белков на твердофазном носителе осуществляется за счет ковалентного связывания между оксигруппами матрицы и свободными аминогруппами в молекулах соответствующих НСБ. Это связывание происходит при инкубации носителя с растворами антигенов, после чего сорбент промывается и оставшиеся на нем избыточные активные группы блокируются обработкой глицином. Затем он еще раз отмывается и стерилизуется  $\gamma$ -облучением (1 кГр). Обычная стерильная колонка иммуносорбента содержит 80 г твердофазного гранулированного носителя с иммобилизованными на нем препаратами НСБ.

Преклинические испытания иммуносорбентов с иммобилизованными нейроспецифическими белками показали их безопасность, гемо- и биосовместимость, что позволило применить их в комплексной терапии критических состояний, возникающих при целом ряде нейropsychических заболеваний.

После соответствующей премедикации пациента проводилось пунктирование и канюлирование подключичной и кубич-

тальной вен (Рис. 8). Кровь из центральной вены через аппарат для гемосорбции АГ-01 направлялась в колонку с иммуноадсорбентом и возвращалась в кубитальную вену. Для предотвращения свертывания крови в поливиниловых трубках и в колонке с иммуноадсорбентом система в течение 1 ч промывалась 1 л изотонического раствора NaCl, содержавшего 15 000 – 20 000 ЕД гепарина. Пациенту внутривенно также вводился гепарин в дозе 130 ЕД/кг.



**Рис. 8. Схема экстракорпоральной иммуноадсорбции.**

1 — забор крови из подключичной вены; 2 — перистальтический насос; 3 — колонка с твердофазным иммуноадсорбентом; 4 — возвращение крови в локтевую вену.

Оценка эффективности иммуноадсорбции проводится иммуноферментным методом по двум позициям: (1) определение концентраций АТ к НСБ в сыворотке крови в разные моменты времени до и после иммуноадсорбции; (2) определение количества АТ к НСБ, элюируемых с иммуноадсорбента после процедуры иммуноадсорбции 0,05 М раствором глицинового буфера с рН 2,2, по сравнению с общим количеством этих антител в крови пациента, рассчитанным по их сывороточным концентрациям до и после иммуноадсорбции.

Испытания поглотительной способности иммуносорбента по отношению к препаратам соответствующих АТ показали его высокую ёмкость (Таблица 1). Одна такая колонка позволяет извлекать из крови в общей сложности приблизительно 112 мг антител,

Таблица 1.

Поглотительная способность иммуносорбента К-2-6 для антител к НСБ

№ п/п	НСБ	Максимальное количество антител (мкг), извлекаемое из крови 1 г иммуносорбента
1	$\alpha_1$ ВG	216 ± 24
2	$\alpha_2$ ВG	264 ± 36
3	GFAP	440 ± 24
4	$\alpha_2$ GP	480 ± 32
<b>Итого</b>		~1400
<b>Всего на колонку (80 г)</b>		~112000

специфичных к иммобилизованным антигенам. Прочность связей иммобилизованных антигенов с твердофазным носителем проверяли по количеству белков, перешедших в раствор при различных условиях обработки (при пропускании через колонку в рециркуляционном режиме в течение 1 ч изотонического раствора NaCl и сливной сыворотки кроликов, не содержавшей НСБ, при различных температурах, скоростях потока, величине рН, а также после  $\gamma$ -облучения). Одновременно проверялась устойчивость иммобилизованных антигенов к денатурации. Отрыв молекул иммобилизованных антигенов от полимерного носителя не наблюдался ни при одном из рассмотренных воздействий (механических, термических, химических и ионизирующих радиационных).

При исследовании стерилизующей способности  $\gamma$ -облучения было установлено, что ионизирующая радиация в дозе до 25 кГр не приводит к значительному снижению сорбционной способности по отношению к соответствующим антителам, но полностью удовлетворяет необходимым критериям стерильности.

Исследование процессов адсорбции антител выполнялось на кроликах, предварительно иммунизированных очищенными препаратами нейроспецифических белков (GFAP,  $\alpha$ 1BG,  $\alpha$ 2BG и  $\alpha$ 2GP). После 2-й или 3-й реиммунизации, когда сывороточные концентрации антител к этим антигенам достигали 10 мкг/мл, проводили процедуру их экстракорпорального извлечения. При этом основное внимание уделялось контролю за общим состоянием животных и регистрации скорости восстановления уровней антител в сыворотке крови после их иммуносорбционного удаления.

Необходимо отметить, что сама по себе экстракорпоральная иммуносорбция не вызывала сколько-нибудь заметных изменений в поведении и общем состоянии животных. Лишь в некоторых случаях наблюдалось снижение двигательной активности, продолжавшееся не более 8 - 10 ч.

### **Опыт применения экстракорпоральной иммуносорбции аутоантител к НСБ в клинике психических заболеваний**

Для клинических испытаний иммуносорбентов были отобраны три больных, находившихся в критическом состоянии, обусловленном тяжелой нейрелепсией, которая возникла при лечении шизофрении. Основными критериями при отборе служили наличие АТ к НСБ в ликворе и начинавшийся отек мозга. Иммуноадсорбцию проводили на стандартной колонке с иммуносорбентом на основе очищенных препаратов GFAP,  $\alpha$ 1BG,  $\alpha$ 2BG и  $\alpha$ 2GP, иммобилизованных на носителе К-2-6. Дальнейшие наблюдения показали, что в течение 12 ч после иммуносорбции удаленные АТ в сыворотке крови больных не обнаруживались. В конце первых суток их концентрации восстанавливались в среднем на 1 - 6% от досорбционного уровня, в конце вторых — на 6 - 12%, третьих — на 30 - 50%, а к концу четвертых-пятых суток достигали исходных значений. Как

отмечалось, трое больных, которым проводилась иммуносорбция, находились в крайне тяжелом, критическом состоянии с симптомами отека мозга и объективно диагностированным прорывом ГЭБ. В двух случаях, когда наблюдался благоприятный выход из критического состояния, уже к концу 2-х суток после проведенной процедуры иммуносорбции отмечалась стабилизация гемодинамики и биохимических показателей сыворотки крови, на третьи сутки пациенты приходили в сознание, а к пятым-шестым суткам их состояние уже не вызывало опасений. Исследование резистентности ГЭБ после перевода этих больных из отделения реанимации показало, что к 36-му дню с момента проведения иммуносорбции ни НСБ, ни АТ, специфичные к ним, в сыворотке крови этих пациентов не обнаруживались, т.е. к этому времени собственно барьерная функция ГЭБ восстанавливалась практически полностью (*Чехонин В.П., Лейкин Ю.А., Морозов Г.В., Морковкин В.М. 1986-2001*).

Анализируя случай неблагоприятного исхода заболевания, приходится признать, что, несмотря на проводившиеся комплексные лечебные мероприятия, восстановить функции ГЭБ не удалось, о чем может свидетельствовать факт обнаружения АТ в ликворе на 17-е сутки после их извлечения из крови. При морфологическом исследовании ткани мозга умершего больного были обнаружены признаки как неспецифического воспаления, проявлявшиеся в пролиферации глии и глиальных макрофагов, так и интерстициального и клеточного отека нервной ткани. Нет сомнения, что в формирование подобной морфологической картины существенный вклад был внесен и аутоиммунными процессами в ткани мозга, обусловленными проникновением аутоантител к НСБ из крови через поврежденный ГЭБ.

Проведенное клинико-экспериментальное исследование показало, что иммуносорбенты на основе очищенных препаратов НСБ, иммобилизованных на гранулированном полимерном носи-

теле, обладают высокой емкостью по отношению к сорбируемым молекулам АТ, гемосовместимы и специфичны. Экстракорпоральная иммуносорбция антител к НСБ может быть рекомендована в качестве составной части комплексной терапии критических состояний, сопровождающихся прорывом ГЭБ и аутоантительной агрессией в мозг.

Разработка новых образцов твердофазных матриц с улучшенными характеристиками гемосовместимости и с пониженной способностью к неспецифической сорбции компонентов крови позволит значительно снизить частоту постсорбционных осложнений и более широко внедрить данный метод в практическое здравоохранение. Дополнительные перспективы применения иммуносорбции в комплексной терапии практически любого аутоиммунного заболевания открываются также благодаря исследованиям механизмов образования быстрого пула АТ («rebound-феномена»), результаты которых помогут разработать способы коррекции биосинтеза этих антител в раннем постсорбционном периоде.

Побочный (но исключительно важный и ценный) продукт процедуры иммуносорбции — извлекаемые человеческие антитела — могут с успехом применяться для разработки высокочувствительных методов качественного и количественного детектирования НСБ (например, при иммунохроматографическом их выделении). Но наиболее перспективное их использование — в качестве гомологичных человеческому организму векторных носителей фармакологических препаратов для их целенаправленной доставки непосредственно к тем клеткам, в которых находятся соответствующие белковые антигены, т.е. минуя прочие органы и ткани, прямо в клетки мозга.

## **Наночастицы и наноконтейнеры в диагностике и векторной терапии заболеваний ЦНС**

Разработка новых нейропсихофармакологических препаратов существенно ограничена двумя фундаментальными проблемами: преодолением гематоэнцефалического барьера и проблемой селективности действующего агента по отношению к клеткам-мишеням в центральной нервной системе. Для решения этих проблем на сегодняшнем этапе развития нейропсихофармакологии особенно перспективным представляется применение нанотехнологических подходов, позволяющих создавать многофункциональные высокоселективные наносистемы, способные доставлять транспортируемый агент сначала в церебральные микрососуды, а затем в интерстициальную жидкость и непосредственно к клеткам-мишеням в головном мозге. Такие препараты и системы способны действовать на субклеточном уровне, близком к молекулярному, но при этом они сохраняют те преимущества, которые имеются у макросистем (в частности, высокий уровень загрузки транспортной конструкции активными агентами).

Чаще всего наносистемы представляют собой биологически активные вещества, связанные с полимерными наночастицами или заключенные в наноконтейнеры, образованные полимерами или низкомолекулярными соединениями. Такие системы повышают растворимость и стабильность активных агентов и обеспечивают их адресную доставку к органам и клеткам-мишеням. Некоторые из таких систем уже представлены на фармацевтическом рынке или проходят клинические испытания (*Duncan R., 2006; Papaldo P., 2006*). Они явились первыми примерами наночастиц-контейнеров и фармакофоров, нашедших практическое применение в медицине — в тех ее областях, которые теперь стали называть наномедициной, нанофармакологией и нанофармацией.

## Мицеллярные наноконтейнеры

Мицеллярные наносистемы в настоящее время достаточно широко применяются для разработки адресных препаратов, способных преодолевать гистогематические барьеры. Некоторые из них, в частности, цитостатические препараты в составе мицеллярных контейнерных лекарственных форм на основе плуроников успешно прошли клинические испытания и применяются в комбинированной противоопухолевой терапии (Danson S., 2004).

Эксперименты, проведенные нами, показали высокую эффективность мицеллярной наноконтейнерной системы для усиления физиологического действия нейролептического препарата (*Чехонин В.П., Лейкин Ю.А., Морозов Г.В., Морковкин В.М. 1986-2001*). В качестве наноконтейнеров использовались мицеллы, самоорганизующиеся в растворах полимера, имеющего фирменное название плуроник Р-85. Это линейный блок-сополимер, состоящий из средней гидрофобной части (полипропиленгликоль), с обоих концов которой присоединены гидрофильные фрагменты (полиэтиленгликоль). В водных растворах молекулы этого вещества самопроизвольно образуют агрегаты, называемые мицеллами, которые имеют гидрофобные центральные части и гидрофильные внешние оболочки. Сам по себе этот плуроник в биологическом отношении абсолютно инертен и разрешен для фармакологического применения.

Для придания мицеллярным наноконтейнерам биологической специфичности в мицеллообразующий полимер добавлялось определенное количество плуроника, конъюгированного с векторными антителами к глиофибриллярному кислому протеину (GFAP). При этом образуются смешанные мицеллы, к внешней оболочке которых прикреплены векторные молекулы фрагментов антител. Полная наноконтейнерная система образуется после солюбилизации галоперидола в растворе таких мицелл (Рис. 9).

Биологическая активность препарата уже после простой солюбилизации в растворе плуроника возросла пятикратно. Можно предположить, что причиной этого не является специфическое направленно-транспортное действие мицеллярной системы — в данном случае более вероятен неспецифичный общетоксический эффект.

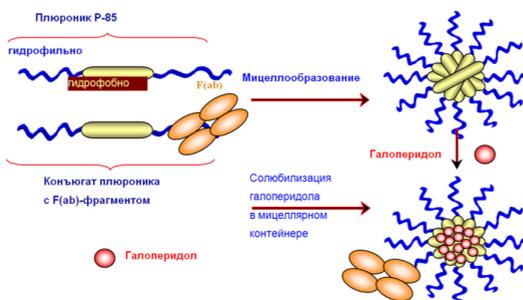


Рис. 9 Схема образования мицеллярной наноконтейнерной системы направленного транспорта.

Примерно таково же действие и галоперидола, солюбилизованного в растворах смесей модифицированного плуроника (с окисленными до альдегидов терминальными группами) с немодифицированным полимером. Не меняет величины этого эффекта и введение в систему свободного инсулина. Однако ковалентное присоединение инсулина к модифицированному плуронику (подобно векторным антителам) дополнительно усиливает токсическое действие галоперидола, содержащегося в мицеллах. По-видимому, в этом случае проявляется взаимодействие инсулина с его рецепторами, которые имеются на клетках почти всех типов (в том числе и в ЦНС). Но по этой же причине инсулин не может служить вектором, селективно и специфично нацеливающим транспортную систему на преодоление ГЭБ. Последнее представлялось более вероятным для конъюгатов плуроника с антителами к нейроспецифическим белкам. И действительно, эффект практически 100-кратного снижения величины LD95 наблюдался при использовании мицеллярных систем доставки галоперидола векторного типа (конъюгаты плуроника с анти-GFAP антителами) по сравнению с

аналогичными значениями, полученными для простой солюбилизации этого нейролептика в мицеллах плюроника.

В настоящее время исследования по дизайну адресных мицеллярных наносистем продолжаются в рамках совместного проекта между кафедрой и отделом медицинских нанобиотехнологий РГМУ (руководитель НИР академик РАМН В.П. Чехонин) и Центром доставки лекарств и наномедицины, Медицинского центра университета Небраски в Омахе, США. С американской стороны этот проект возглавляет директор Центра, профессор фармацевтического факультета и Института исследования рака в Медицинском центре университета Небраски, председатель экспертного совета Национального института здоровья США по биоматериалам и биоповерхностям (BMBI) профессор А.В. Кабанов.

## **Липосомальные наноконтейнеры**

Наиболее разработанными контейнерами для доставки лекарственных препаратов и генетического материала через гематоэнцефалический барьер являются липосомы. Это везикулярные структуры, состоящие из униламеллярных или мультиламеллярных липидных бислоев, окружающих внутренние водные компартменты. Их размеры составляют от нескольких нанометров до нескольких микрон. Главными молекулярными компонентами липосом являются липиды, которые при эмульгировании в водной среде образуют систему жировых пузырьков, ограниченных внешней бислоистой липидной мембраной и содержащих в своем внутреннем пространстве некоторый объем водной фазы, захваченной при механическом эмульгировании.

Основным структурообразующим элементом липосомы является именно бислоистая липидная мембрана, которая может быть построена из амфифильных липидов, имеющих в своих молекулах как гидрофобные, так и гидрофильные группировки (Рис.

10). Среди природных липидов к этой группе относятся многие соединения, но для построения искусственных липосом наиболее часто используются различные лецитины (фосфатидилхолины), фосфатидилсерины и фосфатидилэтаноламины, которые имеют относительно небольшие гидрофильные «головки» и длинные гидрофобные «хвосты», образованные протяженными углеводородными остатками жирных кислот (как насыщенных, так и моно- или олигоненасыщенных).

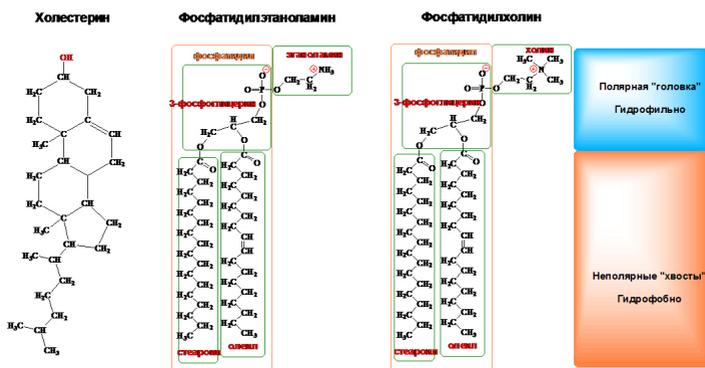


Рис. 10. Липиды, входящие в состав липосом.

В состав липосом обычно вводят и холестерин, амфифильность которому придает гидроксильная группа, присоединенная к гидрофобной молекуле этого стероидного компонента практически всех естественных биологических мембран.

Главное достоинство липосом — это очень высокая емкость загрузки лекарственным средством как гидрофильной, так и гидрофобной природы. Загружаемые полярные или гидрофильные вещества будут находиться преимущественно во внутренней водной фазе липосом, хотя некоторая степень их связывания с липидами бислоя также возможна. И наоборот, липофильные или амфифильные вещества внедряются в липидную мембрану. Особую группу агентов составляют вещества, образующие хелатные или

другие комплексные связи с лигандами, специально включенными в состав липидных мембран или дополнительно прикрепленными к ним для получения липосомальных скинтиграфических препаратов с радиоактивными изотопами.

Современные методы позволяют приготовить липосомы, модифицированные инертными гидрофильными полимерами, образующим экранирующую «щетину» из цепочек полимера длиной 10-20 нм. Чаще всего в этом качестве используется полиэтиленгликоль (ПЭГ) с молекулярной массой около 2000 Да. Такие ПЭГилированные липосомы становятся «невидимками» (stealth-liposomes) для ретикулоэндотелиальной системы млекопитающих; они в гораздо меньшей степени, чем неПЭГилированные липосомы, подвергаются опсонизации, хуже распознаются макрофагами печени и селезенки и поэтому дольше циркулируют в кровотоке (период полувыведения составляет 15 и более часов). Как правило, заключение в липосомы значительно продлевает среднее время пребывания лекарственного средства в кровотоке, уменьшает выраженность его побочных эффектов и повышает терапевтическую эффективность.

## **Векторные иммунолипосомы на основе антител к НСБ**

В наших экспериментах с липосомами в качестве векторных молекул применялись моноклональные антитела к нейроспецифическим белкам (GFAP, MBP, NSE). Эти эксперименты проводились с ПЭГилированными иммунолипосомами, в которых с одним наноконтейнером размером 70-120 нм было конъюгировано примерно 90 молекул моноклональных антител. Факт связывания липосом с клетками определялся по появлению специфического красного свечения, обусловленного липидным флюоресцентным индикатором DiI, введенным в состав липосомных мембран. Это свечение появлялось уже при минимальной применявшейся дозе липосом и при самой короткой их инкубации с клеточной культурой, что доказывало адекватность векторной функции

приготовленных наноконструкций по их связыванию с антигенами клеток нервной ткани, в частности, с астроцитарным GFAP (Чехонин В.П., Жирков Ю.А., Гурина Ю.И., Дмитриева Т.Б. 1986-2001).

Точно такие же результаты были получены и с фиксированными культурами обкладочных клеток обонятельного эпителия (Ensheathing cells) и живыми культурами шванновских клеток. В этом случае ПЭГилированные иммунолипосомы также содержали флюоресцентный липидный индикатор DiI, а в качестве вектора — моноклональные антитела к основному белку миелина (Chekhonin VP, 2007). Но соединялись эти антитела с липосомальной мембраной не коротким малеимидным производным фосфолипида, а были связаны с терминальными группами некоторых цепочек полиэтиленгликоля. При инкубации с фиксированными клетками, как и в случае с астроцитами, наблюдалось окрашивание клеточных структур, содержащих белок-мишень векторных моноклональных антител (Рис. 11).

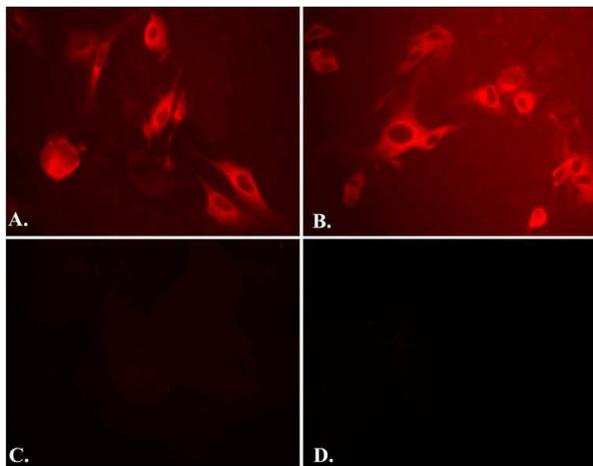


Рис. 11. Визуализация шванновских клеток с помощью векторных липосом. А., В. — DiI-ПЭГилированные иммунолипосомы с антителами к МВР в течение трёх (А) и шести (В) часов. С., D. — Неспецифические иммунолипосомы  $\times 400$ .

## Иммунолипосомы на основе антител к Сх43

Не так давно мы попытались применить в качестве векторных молекул для адресной доставки иммунолипосом уже описанные выше антитела к экстраклеточному фрагменту коннексина-43. Напомним, что

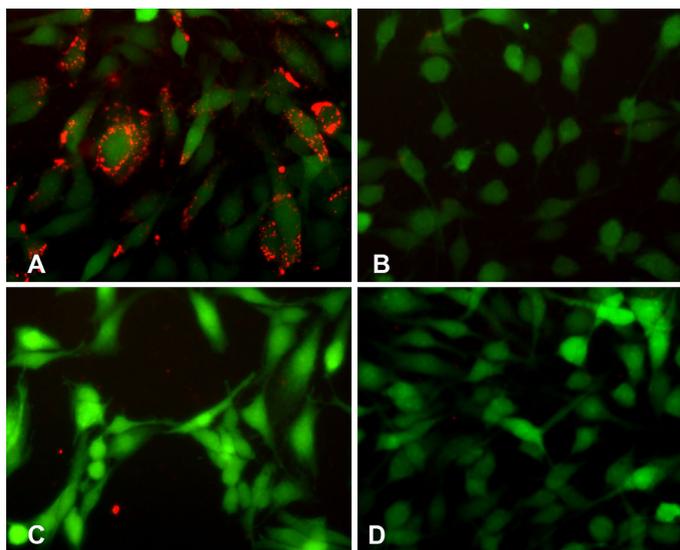
они хорошо визуализируют живые Сх43-позитивные клетки глиомы и реактивные астроциты и астробласты. Последний эксперимент мы проводили с разработанной нами бинарной иммунолипосомальной системой, включающей биотинилированные антитела к E2 Сх43 и липосомы со стрептавидином, содержащие красную флюоресцентную метку DiI C<sub>18</sub> (Баклаушев В.П., Белорусова А.Е., Гриненко Н.Ф. 2009).

Полученные РЕГирированные липосомы характеризовались по диаметру и концентрациям суммарных липидов и белка (в образце липосом с пришитым стрептавидином). Диаметр липосом, определенный методом фотодинамического рассеивания, находился в пределах 80 — 100 нм. Средняя концентрация липидов в полученных липосомальных препаратах составляла  $20.5 \pm 1.1$  мг/мл, концентрация стрептавидаина в готовой эмульсии соответствующих липосом была равна 0,4 мг/мл.

Эксперимент с двухкомпонентной системой направленного транспорта показал специфическую флюоресценцию DiI в препаратах глиомных клеток последовательно инкубированных с биотинилированными антителами к E2 Сх43 и липосомами со стрептавидином и флюоресцентной меткой (Рис. 12.А).

Прединкубация клеток с избытком небитинилированных антител к Сх43 почти полностью блокировала появление флюоресценции после добавления биотинилированных антител и липосом с SA<sub>v</sub> (Рис. 12.В). В контрольных лунках с неспецифическими биотинилированными антителами и векторными липосомами с SA<sub>v</sub> (Рис. 12.С), также как при применении невекторных липосом (Рис. 12.Д), специфической флюоресценции не наблюдалось ни в одной из трёх серий эксперимента.

Интенсивная красная флюоресценция Сх43-положительных клеток глиомы С6 свидетельствовала о селективной адгезии векторных липосом со SA<sub>v</sub> и DiI на мембранах этих клеток. Подсчёт клеток с флюоресценцией DiI и сравнение их с общим количеством клеток, оцененных по флюоресценции CFDA SE, показал, что в среднем 10% клеток С6-глиомы в опытных лунках связывали липосомы, и, следовательно, являлись Сх43-положительными.



**Рис. 12.** Накопление векторных липосом на мембранах живых Sx43 положительных клеток глиомы С6. А. Биотинилированные anti-E2 Sx43 антитела + липосомы со стрептавидином. Б. Конкурентное ингибирование связывания биотинилированных антител к клетками-мишенями путем прединкубации с избытком небитинилированных антител к E2 Sx43. В. Биотинилированные неспецифические иммуноглобулины мыши + липосомы со стрептавидином. Г. Биотинилированные моноклональные антитела к E2 Sx43 + липосомы без стрептавидина. Увеличение  $\times 630$ .

До настоящего времени продолжается дискуссия относительно уровня экспрессии и роли Sx43 в процессах инвазии глиомных клеток. Поэтому нам было интересно оценить долю Sx43-положительных клеток в культурах крысиной глиомы С6 и глиобластомы человека U251. Обе эти клеточные линии являются низкодифференцированными (IV стадия), характеризующимся, по данным литературы, низким уровнем экспрессии Sx43 и других белков щелевых контактов. Иммунофлуоресцентный анализ с антителами к фрагменту E2, однако, позволил выявить около 10% Sx43 положительных клеток. Эти данные воспроизводились с помощью различных вариантов им-

муноцитохимического анализа (проявление с помощью вторичных антител или стрептавидина с Alexa Fluor, визуализация с помощью векторных липосом с Dil). Таким образом, предположение о полном отсутствии в низкодифференцированных глиомах экспрессии Sx43 не подтвердилось. Это соответствует результатам исследования Bates D.C. et al. 2007, в котором также наблюдали экспрессию Sx43 в клетках глиомы С6 и даже получили Sx43-положительную линию глиомы, обладающую большим инвазивным потенциалом, чем Sx43-отрицательные глиомы. Справедливости ради следует уточнить, что экспрессия Sx43, выявляемая с помощью иммунофлюоресцентного анализа, совершенно не доказывает формирование в глиомных клетках исследуемых линий функциональных щелевых контактов. Для доказательства наличия последних необходимы другие подходы, в частности метод S. Goldberg с переносом цитоплазматического флюоресцентного красителя.

В экспериментах по направленному транспорту бинарная авидин-биотиновая система была выбрана из нескольких соображений. Во-первых, константа диссоциации комплекса стрептавидин-биотин ( $10^{-15}$  М) почти в два раза ниже, средней константы диссоциации комплекса антиген-антитело (не менее  $10^{-9}$  М), вследствие чего применение первого комплекса должно повысить специфичность накопления транспортируемых липосомальных контейнеров. Во-вторых, в случае применения бинарной системы, конъюгация стрептавидина с липосомой приводит к образованию существенно меньшего комплекса, чем при конъюгации с липосомой антител (молекулярная масса стрептавидина почти в три раза меньше молекулярной массы иммуноглобулинов G). Кроме того, весьма важным является следующий методический аспект: при биотинилировании сукцинимидным методом иммунохимическая активность моноклональных антител изменяется в меньшей степени, чем при тиолировании, необходимым для пришивки антител к липосомам

малеимидным методом. С учётом всех перечисленных факторов, для экспериментов *in vitro* и, особенно, *in vivo* двухкомпонентные системы предпочтительнее, чем простые иммунолипосомы.

Разработанная нами двухкомпонентная система на основе биотинилированных антител к Сх43 и липосом со стрептавидином показала высокую селективность по отношению к Сх43-положительным клеткам глиомы *in vitro*. Адгезия векторных липосом на мембранах клеток может способствовать слиянию билипидных слоёв и интернализации содержимого липосом. Для интенсификации процесса интернализации в состав векторных липосом могут быть введены дополнительные компоненты (в частности ТАТ пептид или другие вирусные транскрипционные факторы).

Полученные результаты дают основания предполагать, что бинарная система на основе биотинилированных антител к экстраклеточному фрагменту Сх43 и ПЭГилованных липосом со стрептавидином может применяться для направленного транспорта диагностических и терапевтических агентов к Сх43-положительным клеткам глиомы *in vivo*.

### **Адресная доставка иммунолипосом в системах *in vivo***

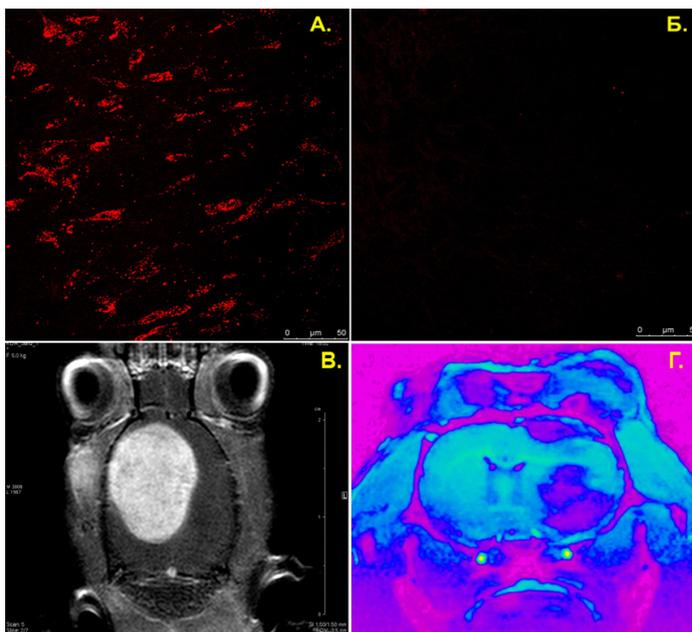
Наиболее интересным для нас было проверить разработанные и испытанные *in vitro* иммунолипосомальные системы в экспериментах *in vivo* на животных с индуцированной внутримозговой глиомой. Неоднократно было замечено, что далеко не все блестящие результаты, полученные на культурах клеток и на препаратах *ex vivo* столь же блестяще воспроизводятся при переходе к реальным преclinical испытаниям на животных.

Визуализацию иммунолипосомальных контейнеров выполняли двумя методами: с помощью сканирующей лазерной конфокальной микроскопии (совместно с Е.Б. Цитриным, НИИ биологии развития РАН) и с помощью МРТ (совместно с ЦМТС МГУ им. М.В. Ломо-

носова, руководитель: д.ф-м.н., профессор Ю.А. Пирогов). В качестве маркеров иммунолипосомальных наноконтейнеров мы применяли очень устойчивый в биологических системах липофильный флюорофор Dil C18 и хорошо известный T1-контраст Gd-DTPA для иммунофлюоресценции и МРТ соответственно. В роли векторных молекул выступали уже описанные выше моноклональные антитела к GFAP и экстраклеточному фрагменту коннексина-43. Как и в экспериментах с мечеными антителами, иммунолипосомальные контейнеры вводились в бедренную вену. Спустя 48 часов после их введения часть животных усыпляли, извлекали мозг, готовили срезы и исследовали флюоресценцию в области глиомы и перитуморального вала. Второй группе крыс выполняли прижизненную МРТ.

Как это ни странно, флюоресцентный анализ срезов мозга после внутривенного введения иммунолипосом крысам с экспериментальной глиомой выявил их накопление в области перитуморального астроглиального вала (Рис. 13., А, Б). Точно так же и на МРТ было обнаружено накопление T1-сигнала в перитуморальной области, в месте максимальной экспрессии антигенов-мишеней (Рис. 13., В, Г).

Таким образом, мы с удовлетворением можем констатировать, что, спустя более десяти лет экспериментальной работы с иммунолипосомами, нам удалось создать систему адресной доставки в перитуморальную зону, работающую в системе *in vivo*. Возможности этих систем в настоящее время испытываются в экспериментах по доставке цитостатических препаратов и генотерапевтического материала, и нам хочется надеяться, что нашего века хватит на то, чтобы увидеть плоды своего труда, внедренные в клиническую практику.



**Рис. 13.** Визуализация иммунолипосомальных наноконтейнеров, доставленных в перитуморальную зону после внутривенного введения их крысам с экспериментальной глиомой с **флуоресцентной (А,Б) и парамагнитной — Gd-DTPA (В,Г) метками**. А. Иммунолипосомы на основе антител к GFAP, визуализированные с помощью сканирующей лазерной конфокальной микроскопии. Б. Невекторные иммунолипосомы. Бар = 50 мкм. В. Визуализация глиомы с помощью МРТ после внутривенного введения T1-контраста Gd-DTPA. Г. Визуализация перитуморальной зоны с помощью МРТ после внутривенного введения иммунолипосом с Gd-DTPA.

## Порфириновые аддукты фуллерена C60

Одним из самых «молодых» научных направлений кафедры медицинских нанобиотехнологий МБФ РГМУ является создание и изучение углеродных катионообменных наночастиц медицинского назначения, проводимое группой д.б.н. профессора Д. А. Кузнецова совместно с сотрудниками Института химической физики им. Н. Н. Семёнова РАН. Эта работа осуществляется в рамках программы «Нанотехнологии в медицине и ветеринарии»,

координируемой комитетом по научно-техническому сотрудничеству ШОС (STC06/12-067).

Исследования углеродных нанокатионитов являются логическим продолжением нового научного направления, названного «спин-селективная биохимия», основы которого были заложены в Институте химической физики им. Н. Н. Семёнова академиком РАН А.Л. Бучаченко в результате обнаружения магнитных изотопных эффектов в биологических системах. В частности, им было впервые показано, что магнитный изотоп магния  $^{25}\text{Mg}$ , в отличие от наиболее распространенного немагнитного изотопа  $^{24}\text{Mg}$ , является специфическим гиперактиватором большинства  $\text{Mg}^{2+}$ -зависимых реакций синтеза АТФ в клетке. Примечательно, что гиперактивация энергетического метаболизма ионами  $^{25}\text{Mg}^{2+}$  требует незначительного количества этих ионов и имеет место даже при отсутствии кислорода (глубокая тканевая гипоксия и ишемия). Здесь, вероятно, следует отметить, что тканевая гипоксия и последующая за ней ишемия являются центральными патогенетическими механизмами в развитии двух наиболее значимых в медико-социальном отношении заболеваний: инфаркта миокарда и ишемического инсульта. Таким образом, актуальность создания адресного индуктора синтеза АТФ в условиях гипоксии — огромна.

Причины тканевой гипоксии весьма разнообразны: это и врожденные нарушения метаболизма (синдром Ледерера-Вальдека), и отравления (СО, нитрофенолы), и избыточные физические нагрузки, и ингаляторное кислородное голодание, и побочные эффекты лекарств — ингибиторов окислительного фосфорилирования. В частности, цитотоксичность доксорубицина связана преимущественно с подавлением окислительного фосфорилирования АДФ в митохондриях клеток. Это значит, что запасной путь регенерации АТФ, а именно фосфорилирование АДФ, катализируемое ферментами семейства киназ, может быть выбран для фармакологического воздействия с целью минимизации, т.е. уменьшения или даже

исключения побочного эффекта доксорубицина во время (или до) длительной цитостатической терапии.

И субстратный, и окислительный пути фосфорилирования являются  $Mg^{2+}$ -зависимыми процессами и поэтому могут быть ускорены вплоть до 2.5 раз ультрамикрочемическими  $^{25}Mg^{2+}$ . Простое «эндоосмотическое давление» вызывает замещение одного изотопа Mg другим ( $^{25}Mg$ , также как  $^{24}Mg$ , и  $^{26}Mg$  стабильные изотопы) в активном сайте креатинкиназы, наиболее эффективном участнике резервного синтеза АТФ, что приводит к значительной интенсификации образования АТФ в очаге гипоксии.

Специально для адресной доставки  $^{25}Mg^{2+}$  в очаги гипоксии была осуществлена сначала теоретическая разработка, а затем синтез и практические испытания нанокатионита на основе фуллерена-С60. В результате этих исследований создан новый класс медицинских наночастиц (нанокатионитов), представленных порфириновыми аддуктами фуллерена-С60, структура, методы синтеза и способы применения которых в фармакологии и биотехнологическом получении новых лекарств защищены шестью международными патентами в США, Германии (ЕС) и КНР.

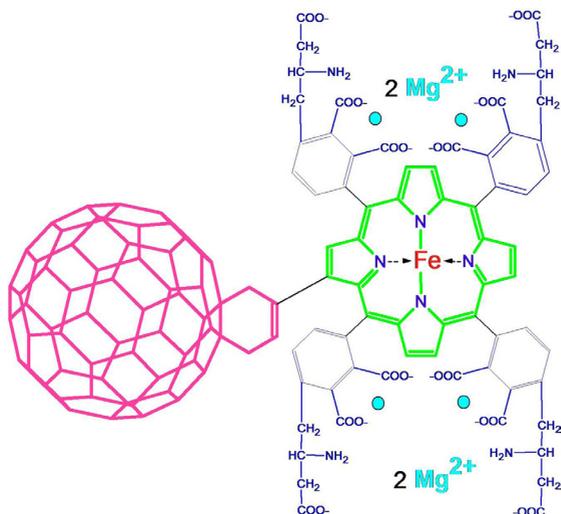


Рис. 14. Порфиллерен-МС16 (PMS16).

Бакминстерфуллерен (С60)-2-(бутadiен-1-ил)-тетра(о-γ-аминобутирил-о-фталил)ферропорфирин. Пояснения в тексте.

Один из представителей этого класса — новый лекарственный препарат, обладающий катионитными свойствами, является моноаддуктом железосодержащего порфирина с классическим бакминстерфуллереном — бакминстерфуллерен(С60)-2-(бутадиен-1-ил)-тетра-(о-γ-аминобутирил-о-фталил)-ферропорфирином (Рис. 14). Основываясь на методике синтеза, его назвали «Порфиллерен-МС16» или, коротко, РМС16. Этот препарат представляет собой низкотоксичные (ЛД50 = 896 мг/кг, крысы, в/в), амфифильные (растворимость в воде 430 мг/мл, рН 7.40), способные к образованию кластеров мембранотропные наночастицы размером 1.8 нм. В 2009 г РМС16 прошёл полный цикл доклинических испытаний и разрешён к использованию, правда, пока только в КНР и в ветеринарной практике, как средство, значительно понижающее зависимость энергетического метаболизма в клетках миокарда от содержания в них молекулярного кислорода.

Помимо размера, сопоставимого с размером молекулы АТФ, наночастица РМС16 удовлетворяет двум важным фармакологическим требованиям. Во-первых, ее структура позволяет осуществлять так называемое «умное высвобождение» магния *in vivo*, то есть высвобождение магния в ответ на тканевой ацидоз, вызванный гипоксией. Во-вторых, порфириновый домен РМС16 определяет тканевую и субклеточную селективность в результате взаимодействия с порфириновыми рецепторами, локализованными на мембранах митохондрий кардиомиоцитов (Kano K., 2004), лимфобластов и нейронов. Это позволило осуществить направленную доставку наночастиц в митохондрии этих клеток (Buchachenko A.L., Kuznetsov D.A., 2007).

Благодаря способности обеспечивать адресную доставку катионов парамагнитного изотопа <sup>25</sup>Mg к местам локализации тканеспецифических митохондриальных порфирин-связывающих белков, РМС16 является первым и пока единственным фармакологическим агентом, позволяющим избирательно использовать

магнитный изотопный эффект  $^{25}\text{Mg}$  для гиперактивации синтеза нуклеозидтрифосфатов (АТФ, ГТФ) в страдающих от гипоксии миокардиоцитах, нейронах, лимфоцитах и лимфобластах.

Проведённые исследования показали также значительную эффективность наночастиц из группы РМС16 как инструментов для изучения молекулярных механизмов и фармакологического потенциала магнитных изотопных эффектов биологически активных катионов  $^{25}\text{Mg}$ ,  $^{67}\text{Zn}$ ,  $^{43}\text{Ca}$ , и др. (Кузнецов Д.А., Бучаченко А.Л. 2006 — 2010).

Таким образом, создание новых фармакологически активных наночастиц на основе порфириновых аддуктов фуллерена-С60 впервые позволило раскрыть фармакологический потенциал такого уникального физического феномена как магнитный изотопный эффект. Следует отметить, что наночастицы РМС16 являются единственным пока примером такого рода. Кроме того, этот пример указывает на особый и исключительно плодотворный характер взаимодействия между фундаментальными исследованиями и прикладными работами, ориентированными на медицинскую и ветеринарную практику. К сожалению, в настоящее время найдётся немного свидетельств подобного взаимопроникновения теоретической физики, молекулярной биологии, экспериментальной и клинической фармакологии.

В группе под руководством профессора Д.А. Кузнецова, также разработан и внедрён биотехнологический процесс получения высокоочищенных пептидов, играющих роль факторов апоптоза раковых клеток (CAF), из культур В-лимфобластов больных острым лимфобластным лейкозом. В основе процесса лежит применение кобальт-несущих порфирин-фуллереновых наночастиц, индуцирующих (потенцирующих) выработку CAF in vitro. Препараты пептидов данного типа, полученные Д.А. Кузнецовым нанобиотехнологическими методами в настоящее время проходят клинические испытания в центре онкологии МАНАК-Shahid Beheshti University Clinic, Тегеран, ИРИ.

Изучение возможностей углеродных катионообменных наночастиц в фармакологическом применении магнитных изотопных эффектов, проводимое на кафедре и в отделе медицинских нанобиотехнологий МБФ РГМУ, является перспективным научным направлением, результаты которого востребованы такими областями медицины как онкология, неврология, кардиология, медицина катастроф и спортивная медицина.

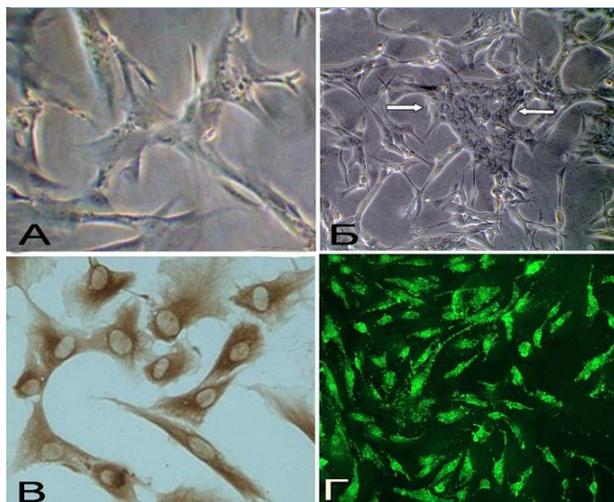
### **Клеточные технологии в терапии экспериментальных инсультов и травм спинного мозга**

Стволовые клетки различного генеза (эмбриональные, стволовые клетки субвентрикулярной и субгранулярной зон зрелого мозга, гемопоэтические, мезенхимальные клетки жировой ткани и др.), а, в последние годы — репрограммированные плюрипотентные соматические клетки (iPSC - induced pluripotent stem cells) находят всё более широкое применение в экспериментальной и клинической клеточной терапии. В РГМУ это направление продуктивно развивается в отделе клеточных технологий НИИ фундаментальных и прикладных биомедицинских исследований (руководитель отдела д.м.н., профессор С.Н. Быковская) и во входящем в состав НОЦ по медицинским нанобиотехнологиям РГМУ ФГУ ГНЦССП им В.П. Сербского, под руководством д.б.н., профессора И.В. Викторова.

Особое место в ряду клеточных препаратов, используемых для лечения травматических, ишемических повреждений и дегенеративных заболеваний нервной системы занимают глиальные и стволовые клетки обонятельной выстилки взрослых животных и человека. Это обусловлено тем, что обонятельная выстилка является уникальной структурой нервной системы, в которой происходит постоянная гибель нервных клеток — обонятельных рецепторных нейронов, и их регенерация в результате пролиферации и дифференциации шаровидных и горизонтальных стволовых кле-

ток, локализованных во внутреннем слое обонятельной выстилки. Регенерация рецепторных обонятельных клеток сопровождается ростом их аксонов, заканчивающихся синаптическими окончаниями на дендритах митральных клеток обонятельной луковицы. Процессы роста регенерирующих аксонов обонятельных рецепторных нейронов обеспечивают специализированные обкладочные глиальные клетки, которые обладают выраженными регенераторными и нейротрофическими свойствами. Интраоперационное выделение фрагментов ткани обонятельной выстилки, целостность которой восстанавливается вследствие присущей этой структуре способности к регенерации, не сопровождается нарушениями обонятельной функции, что позволяет получать аутологический клеточный материал для последующего культивирования и трансплантации.

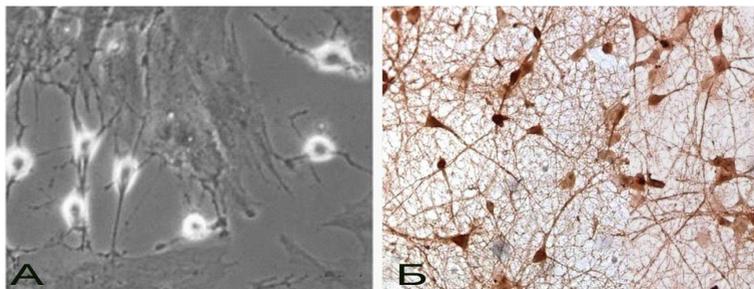
В длительно живущих культурах, полученных при ферментной диссоциации ткани обонятельной выстилки, происходит активная пролиферация обкладочных глиальных клеток (Рис. 15).



**Рис. 15. Монослойная культура клеток обонятельного эпителия человека.**

А – фазовоконтрастная микроскопия. Б – формирование островков пролиферирующих клеток (стрелки). В – клетки моноосля. Иммуноцитохимическая окраска антителами к нестину. Г – клетки моноосля. Иммуноцитохимическая окраска антителами р75.

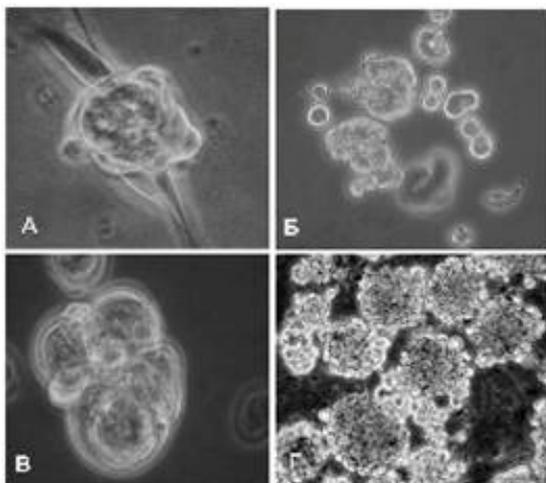
В части длительно живущих монослойных культур обонятельного эпителия при культивировании в среде, не содержащей нейроростовых факторов, происходит спонтанная дифференциация стволовых и прогениторных клеток и формирование нейронов, идентифицированных с помощью антител к нейроспецифической енолазе — NSE (Викторов И.В., Савченко Е.А., 2005 – 2009), (Рис. 16). Возможным фактором нейральной дифференцировки стволовых и прогениторных клеток может служить недавно идентифицированный астроглиальный нейротрофический фактор (ADNF).



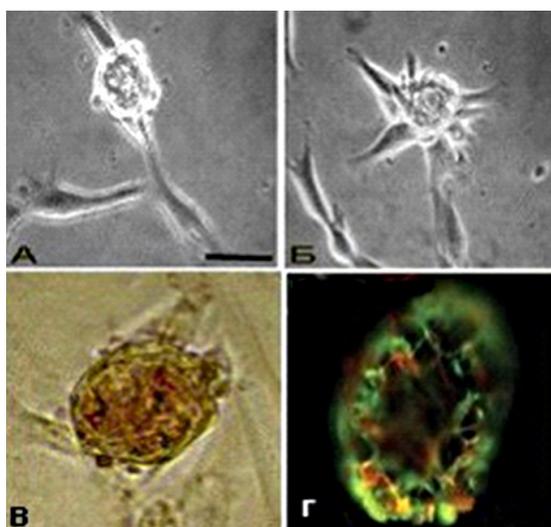
**Рис. 16.** Спонтанная нейральная дифференциация стволовых и прогениторных клеток в монослойной культуре обонятельного эпителия человека. А – Высокопреломляющие фазово-контрастные стволовые клетки на монослое глиальных клеток. Б – окраска культуры антителами к NSE.

В культурах обонятельного эпителия, культивируемых в средах, содержащих нейроростовые факторы, пролиферирующие стволовые и прогениторные клетки формируют нейросферы, фиксированные на глиальном подслое. По мере пролиферации и увеличения количества этих клеток, фиксированные нейросферы отделяются от глиального субстрата и трансформируются в свободноплавающие нейросферы (Рис. 17А). Свободноплавающие нейросферы могут формироваться также в суспензии клеток обонятельного эпителия (Рис. 17 Б,В). Выделение и ферментная диссоциация нейросфер позволяет получить вторичные и последующие популяции стволовых прогениторных клеток обонятельного

эпителия для интрацеребральной и интраспинальной трансплантации (Савченко Е.А., Викторов И.В., 2007 – 2009).



**Рис. 17. Нейросферы, образованные стволовыми клетками.** А – фиксированная нейросфера, формирующаяся на глиальном субстрате. Б, В – свободноплавающие стволовые клетки обонятельного эпителия и формирующиеся нейросферы. Г – множественные свободноплавающие нейросферы.



**Рис. 18 Иммунофлуоресцентный анализ нейросфер из культуры обонятельного эпителия человека.** А-Б – Нейросферы, формирующиеся на монослое подлежащих глиальных клеток. Фазовоконтрастная микроскопия. В – иммуноцитохимическая окраска нейросфер антителами нестину. Г – иммуноцитохимическая окраска антителами к нестину и кислому глиофибрилярному белку (GFAP).

По данным цитологических и иммуноцитохимических исследований, выполненных в группе клеточных технологий под руководством профессора И.В. Викторова, формирующиеся нейросферы гетерогенны по клеточному составу, поскольку помимо

стволовых клеток в них содержатся прогениторные клетки на разных стадиях дифференциации, а также и небольшое количество клеток глии (Рис. 18. В, Г).

При ферментной диссоциации нейросфер обонятельного эпителия образуется суспензия стволовых, прогениторных и глиальных клеток, которая после центрифугирования была использована для интраспинальной и интрацеребральной трансплантации. Предварительное иммуноцитохимическое фенотипирование (Рис.19) позволило определить состав клеточной суспензии и процентное соотношение в ней стволовых/прогениторных и глиальных клеток оптимальные для нейротрансплантации.

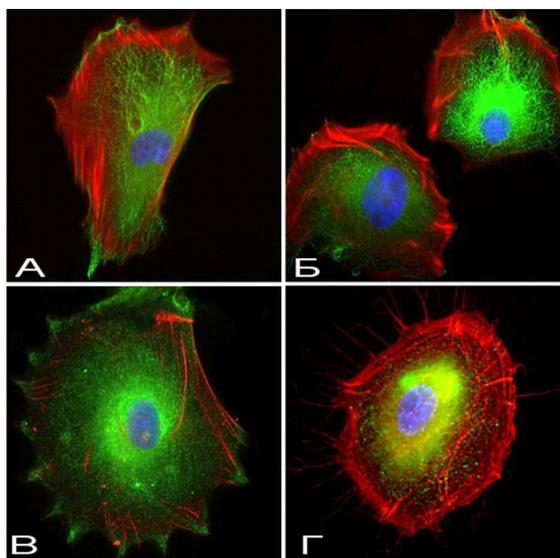


Рис. 19. Иммуноцитохимическое окрашивание стволовых клеток антителами к  $\beta$ -тубулину (А, Б), нестину (В) и олигодендроглиальному маркеру О4 (Г).  $\beta$ -актин окрашен фаллоидином-FITC.

## Стволовые клетки опухолей

В последнее десятилетие большое внимание уделяется исследованиям нового типа стволовых клеток - опухолевыми стволовым клеткам опухолей (cancer stem cells). Было показано, что в опухолях присутствует относительно небольшая популяция клеток, обладающих всеми основными характеристиками стволовых

клеток, за исключением ограничения их пролиферации, радиационной и хемотерапевтической устойчивости. Известно, что для каждого типа стволовых клеток, локализованных в специфических для них клеточном окружении, так называемых нишах, существуют механизмы регуляции количества стволовых и образуемых ими прогениторных клеток. Неограниченная пролиферация туморогенных стволовых клеток позволяет сохранить основной пул этих клеток и формирование прогениторных и нетуморогенных клеток, составляющих основную массу и определяющих прогрессивный рост опухолей. Миграция туморогенных стволовых и прогениторных клеток приводит к формированию отдалённых метастазов, в то время как мигрирующие нетуморогенные клетки опухолей не формируют метастатических опухолей.

В нашей лаборатории ведутся экспериментальные исследования стволовых опухолевых клеток двух линий низкодифференцированных глиом: глиомы С6 крысы и глиобластомы человека (линия U251).

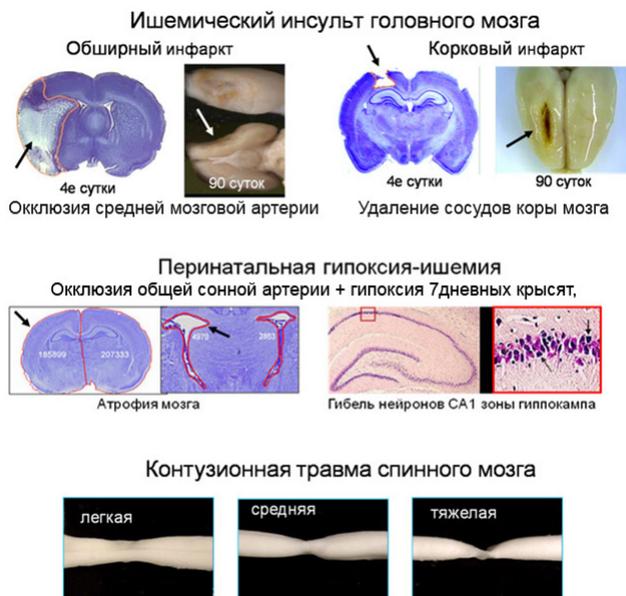
## **Экспериментальная клеточная терапия ишемических и травматических повреждений ЦНС**

Исследования эффективности стволовых и прогениторных клеток в терапии экспериментальных ишемического инсульта, перинатальных гипоксически-ишемических повреждений головного мозга и травм спинного мозга у крыс составляют основное направление научной деятельности группы экспериментальной нейробиологии ФГУ ГНЦССП Росздрава, возглавляемой С.В. Лебедевым. Фундаментальные исследования показали возможность применения клеточной терапии для достижения нейропротективного и нейрорепаративного эффекта. Анализ имеющихся работ, тем не менее, продемонстрировал наличие ряда нерешенных проблем по эффективности клеточной терапии на организменном уровне. В

частности, не ясно, какие функциональные нарушения могут корригироваться с помощью клеточной терапии и насколько специфичен эффект стволовых клеток по сравнению с клетками, не обладающими прогениторными свойствами. Обращает внимание также отсутствие очевидной связи между эффектом стволовых клеток и их количеством, доставленным в ЦНС, а также дифференцировкой клеток. В связи с этим нами была поставлена задача оценить эффект трансплантации нейрогенных стволовых клеток в сравнении с клетками, не обладающими прогениторными свойствами, а также сопоставить эффективность доставки клеток непосредственно в ЦНС с альтернативными путями введения.

Совершенно очевидно, что достоверные доклинические испытания клеточной терапии невозможны без разработки адекватных моделей заболеваний нервной системы на животных. Подход, предполагающий применение нескольких моделей с оценкой разнообразных функциональных показателей после клеточной терапии ишемической и травматической патологии ЦНС, позволяет выделить те состояния, при которых этот метод лечения может быть наиболее эффективен.

В группе экспериментальной нейробиологии были воспроизведены модели обширного корково-подкоркового инсульта головного мозга путем коагуляции средней мозговой артерии и фокальной ишемии коры головного мозга, которую моделировали удалением фрагмента мягкой мозговой оболочки (Рис. 20). Крайне актуальные в неонатологии перинатальные гипоксически-ишемические повреждения воспроизводятся у семидневных крысят с помощью односторонней окклюзии общей сонной артерии с последующей продолжительной экзогенной гипоксией. Подобные поражения у детей могут быть обширными и необратимыми. В этом случае они плохо поддаются терапии традиционными методами и являются крайне перспективными «кандидатами» для регенерационной клеточной терапии.



**Рис. 20.** Модели ишемического повреждения головного мозга и контузионной травмы спинного мозга у крыс.

Не менее актуальную проблему представляют тяжелые контузионные повреждения спинного мозга. В этом случае собственных регенераторных способностей поврежденных аксонов явно недостаточно для восстановления спинальных проводящих путей. Кроме того, на месте контузионного очага образуются патологические полости (миеломалация и кистозное перерождение) и участки глиоза, препятствующие регенерации. Вследствие этого, несмотря на все попытки консервативной нейрометаболической и оперативной терапии формируется тяжелейший двигательный дефект. Есть серьезные основания полагать, что клеточная терапия с помощью стволовых клеток и, в частности, обкладочных клеток эпителия верхнего носового хода, стимулирующих регенерацию и рост аксонов обонятельных нейронов в течение всей жизни, может способствовать восстановлению утраченных функций спинного мозга.

Спинальную травму в наших исследованиях моделировали путём дозированной контузии спинного мозга в нижнегрудном отделе. Для этого животным выполняли ламинэктомию, обнажали поверхность спинного мозга, на которую с помощью специального аппарата с определенной высоты сбрасывали тонкий металлический стержень.

На представленных моделях апробировали различные методы оценки двигательных нарушений и высшей нервной деятельности крыс, что позволило сформировать батареи тестов, выявляющих неврологический дефицит в течение не менее двух месяцев после повреждения (Рис. 21).

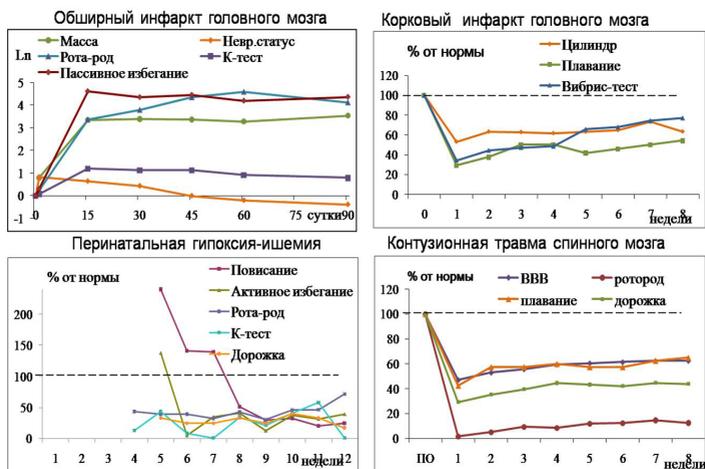


Рис. 21. Мониторинг функционального дефицита после моделирования повреждений ЦНС.

Впервые на модели ишемического инсульта описан феномен кетамин-индуцированной вращательной асимметрии (Лебедев С.В., Петров С.В., 2003). Подсчёт вращения животных после введения субнаркологических доз кетамина, проведенный с помощью автоматического ротометра U.Ungerstedt, позволяет количественно оценить односторонний моторный дефицит (К-тест).

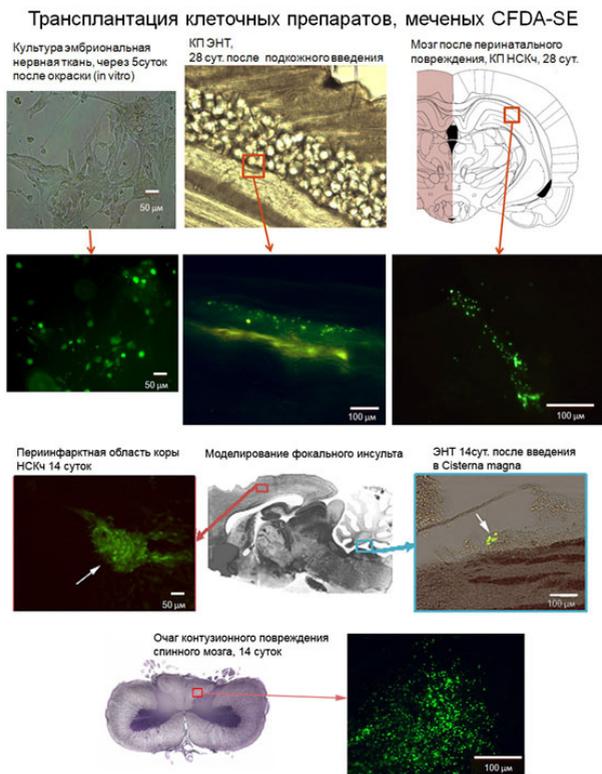
На модели контузионной травмы спинного мозга, наряду с традиционной шкалой оценки произвольных движений «ВВВ»

впервые применялись нагрузочные тесты: удержание на вращающемся стержне и прохождение суживающейся дорожки. Расширение набора методов оценки функций ЦНС позволило существенно повысить эффективность оценки клеточной терапии на выбранных нами моделях заболеваний нервной системы.

В наших исследованиях мы применяли клеточный препарат нейральных стволовых клеток, полученных из нейросфер культивированного обонятельного эпителия человека. Другим опытным препаратом были клетки аллогенной эмбриональной нервной ткани, полученные из мозговых пузырей семидневных эмбрионов крыс, содержащие 95% нестин-позитивных (прогениторных) клеток. В качестве контроля использовали клетки, которые не обладали прогениторными свойствами – фибробласты крыс.

При экспериментальных инсультах клеточные суспензии вводили в большую цистерну мозга и в перинфарктные зоны коры в количестве  $2 \times 10^6$  клеток сразу после воспроизведения ишемии. На модели перинатального поражения трансплантировали  $3 \times 10^5$  клеток в паренхиму мозга. После воспроизведения контузионной травмы спинного мозга клеточные препараты трансплантировали в 2 участка спинного мозга, выше и ниже эпицентра травмы, в количестве  $7,5 \times 10^5$  клеток. С целью изучения хоминга стволовых клеток их также вводили подкожно.

Прежде чем приступать к оценке эффективности трансплантации клеточных препаратов на функциональном уровне необходимо было убедиться, что введенные клетки выживают в местах введения. Для этой цели перед введением клеточные культуры окрашивались витальным красителем CFDA-SE, сохраняющим флюоресценцию только в жизнеспособных клетках. В местах трансплантации на различных сроках, вплоть до 28 суток после введения, обнаруживалось значительное количество введенных клеток (Рис. 22).

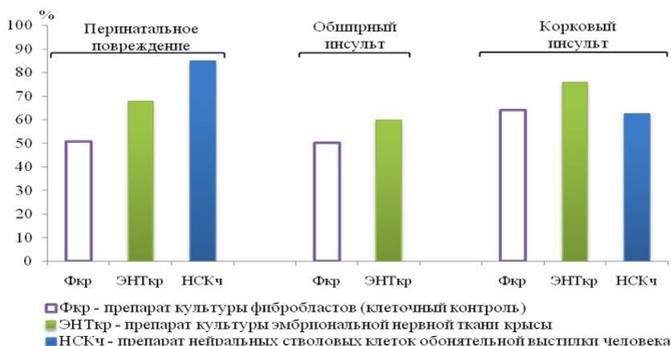


**Рис. 22. Исследование выживаемости клеточных препаратов после трансплантации**

Обобщенные результаты оценки функционального состояния ЦНС у крыс с клеточной терапией ишемических и гипоксических повреждений мозга представлены ниже (Рис. 23).

В этих исследованиях в качестве контрольной группы использовались крысы, которым трансплантировались фибробласты. Сравнение неврологического дефицита у крыс, получавших фибробласты, с животными с повреждениями мозга, не получавшими клеточную терапию, не выявило существенных различий ни по одному из исследуемых показателей. В отличие от контроля, трансплантация прогениторных клеток приводила к вос-

становлению соответствующих функций у крыс с гипоксическим-ишемическим перинатальным повреждением, причем его уровень приближался к показателям у интактных животных.



**Рис.23.** Влияние трансплантации прогениторных клеток на интегральные показатели функций ЦНС у крыс с гипоксическими и ишемическими повреждениями мозга (8 недель после трансплантации). За 100% принято значение функциональных показателей интактных крыс.

Менее выраженный эффект наблюдался после трансплантации клеточных препаратов на модели ишемического инсульта. Так, интегральный показатель у крыс с трансплантацией нейральных прогениторных клеток человека и крысы при корковом инфаркте не отличался от контроля. Вместе с тем, по отдельным неврологическим тестам эффект клеточной терапии был значительным. В частности, у крыс с обширным инсультом после введения прогениторных клеток крысы показатели функции памяти в тесте пассивного избегания на 30% превышали эти же значения у контрольных животных. В цилиндр-тесте и тесте плавания (анализ моторики передних лап) у крыс с корковым инсультом эффект нейральных прогениторных клеток крысы составлял 14% и 25%, соответственно. В подавляющем большинстве тестов положительные изменения функций ЦНС фиксировались уже с первой недели после терапии прогениторными клетками и сохранялись на протяжении всего периода наблюдений.

Мониторинг функционального состояния крыс после контузионной травмы спинного мозга показал, что трансплантация нейральных стволовых клеток человека привела к существенному улучшению произвольных движений задних конечностей, а также координации при нагрузке по сравнению с животными со спинальной травмой, не получавшими клеточную терапию (Рис. 24) (Лебедев С.В., 2009).

Данные эффекты сохранялись до конца периода наблюдений, что позволяет говорить о продолжительном и специфичном эффекте клеток со стволовыми и прогениторными свойствами. Полученный эффект подтверждается и морфологическими исследованиями. Совместное исследование с Казанским медицинским университетом (профессор Чельшев Ю.А.) показало существенное уменьшение патологических полостей в эпицентре травмы. По данным электронной микроскопии у крыс после трансплантации прогениторных клеток обонятельной выстилки человека в очаге травмы миелиновая оболочка нервных трактов более сохранна, активно протекает процесс ремиелинизации, в отличие от нелеченных животных, где отсутствуют процессы ремиелинизации и имеет место разрушение осевых цилиндров.

Обобщая наши исследования по моделированию заболеваний центральной нервной системы, можно заключить, что к настоящему времени разработаны экспериментальные модели ряда актуальных заболеваний и повреждений нервной системы, на которых возможна объективная доклиническая оценка новых средств и методов лечения. Первостепенную задачу будущих исследований мы видим в стандартизации и объективизации научно-методического аппарата с целью создания единых протоколов доклинических исследований новых средств и способов лечения нарушений функционирования ЦНС.

Резюмируя проведенные преклинические испытания клеточной терапии на моделях ишемических и травматических по-

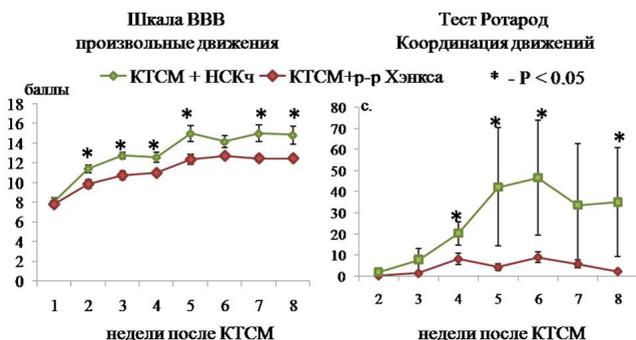


Рис. 24. Влияние трансплантации нейральных стволовых клеток человека (НСКч) из обонятельной выстилки на восстановление произвольных движений и координации после моделирования контузионной травмы спинного мозга (КТСМ) у крыс.

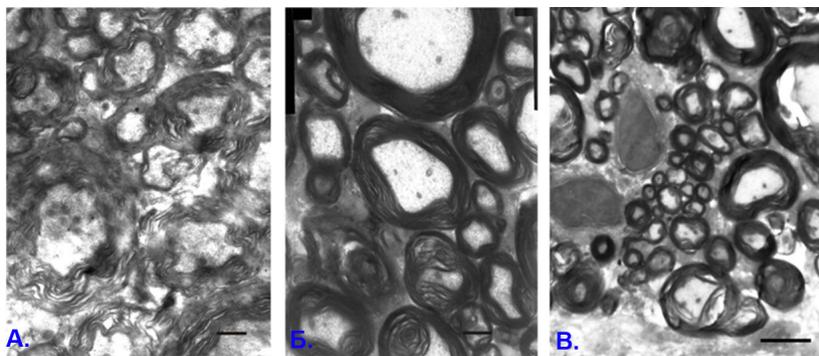


Рис. 25. Электронные микрофотографии белого вещества в эпицентре контузионной травмы спинного мозга у нелеченных крыс (А) и после трансплантации нейральных стволовых клеток обонятельной выстилки человека (Б, В). Миелиновая оболочка более компактна, осевой цилиндр не разрушен.

вреждений ЦНС у крыс, можно заключить, что нейрогенные стволовые и прогениторные клетки оказывают специфичный и стабильный положительный эффект в отличие от клеток, не обладающих прогениторными свойствами. Полученные данные делают обоснованными дальнейшие исследования эффективности терапии клетками-прогениторами нейрального происхождения с перспективой последующего клинического применения.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Открытие молекулярных механизмов формирования, хранения и передачи биологической информации в XX веке задало вектор развития науки о живом на несколько десятилетий вперед. Биотехнология и генная инженерия уже сегодня стремительно преобразуют жизнь каждого из нас. Какие же направления науки будущего будут определять наше завтра? Несомненно, одним из таких направлений является нейробиология. Понимание принципов работы мозга способно качественно расширить возможности высшей нервной деятельности и изменить жизнь человека уже в XXI веке. Еще недавно поведение человека не рассматривалось как результат интегрированных электрохимических процессов в клетках мозга. Сегодня же учёные умеют не только расшифровывать эти процессы, но и активно вмешиваться в них — например, блокировать и создавать ложное восприятие информации, стимулировать и угнетать внимание и память, влиять на обучение и т.д. Достигнуты серьезные успехи в понимании этиологии и патогенеза некоторых нейродегенеративных заболеваний. Опровергнуто догматическое утверждение, будто нервные клетки неспособны к восстановлению: открыты десятки факторов роста, вызывающих их регенерацию. Современные биотехнологические подходы обеспечили системный протеомный анализ нервной ткани и последующее получение нейроспецифических белков с помощью рекомбинантных технологий. Рекомбинантные нейроспецифические белки в свою очередь открыли возможность получения соответствующих моноклональных антител на основе современных гибридомных технологий. Таким образом, в арсенал клинично-диагностических лабораторий поступили стандартизованные высокоселективные системы иммуноферментного анализа НСБ и анти-НСБ антител в биологических жидкостях. Для клиницистов эти системы — мощный инструмент контроля функций гематоэнцефалического барьера, позволяющий не только диагностировать деструкцию нервной ткани, но и в динамике оценивать эффективность проводимой терапии при нервно-психических заболеваниях.

С другой стороны, применение технологии получения рекомбинантных НСБ и соответствующих моноклональных антител сделало возможным, практически одновременно с ведущими зарубежными исследователями, разработать отечественный иммуносорбент для защиты мозга от аутоантительной агрессии и провести его клиническую апробацию при комплексной терапии гипертоксической шизофрении и восходящего бокового амиотрофического склероза (*Шумаков В.И., Брюховецкий А.С. 2007*).

Успешные зарубежные и отечественные исследования, проведенные в последние десятилетия, позволили разработать многочисленные инновационные подходы к адресной доставке лекарственных средств в ЦНС. Некоторые из них имеют хорошие клинические перспективы. Тем не менее, даже само разнообразие этих подходов свидетельствует о той сложности, которая характерна для проблемы транспорта терапевтического или визуализирующего агента через ГЭБ. Стало очевидным, что по-настоящему эффективным могут оказаться только комплексные подходы. Наиболее перспективным в этом плане представляется создание наноконтейнерных систем, конъюгированных с иммунохимическими, биохимическими и/или другими молекулярно-биологическими векторами. И в этом аспекте клиническая апробация систем визуализации периглиомного пространства при мультиформных глиобластомах с помощью наночастиц на основе антител к GFAP и антител к экстраклеточному фрагменту Cx43 — вопрос уже сегодняшнего дня.

Большое значение в современной прикладной нейробиологии придается клеточным технологиям. Особое место в ряду клеточных препаратов, используемых для лечения травматических, ишемических и дегенеративных заболеваний нервной системы занимают глиальные и стволовые клетки обонятельной выстилки взрослых животных и человека. Интраоперационное выделение фрагментов ткани обонятельной выстилки позволяет получать аутологический клеточный материал для последующего культивирования и трансплантации. Технология выделения и ферментной

диссоциации формируемых стволовыми клетками нейросфер позволяет получить вторичные и последующие популяции стволовых и прогениторных клеток обонятельного эпителия для интрацеребральной и интраспинальной трансплантации. Проведенные исследования показали, что нейрогенные стволовые и прогениторные клетки способны оказывать специфичный и стабильный положительный регенерационный эффект. Наиболее выраженный положительный эффект клеточной терапии выявляется у крыс с перинатальными повреждениями ЦНС, что вероятно связано с большей способностью к репарации и компенсаторными возможностями незрелого мозга (*Лебедев С.В., Карасев А.В. 2007-2009*). Вопрос клинической апробации клеточных препаратов в аспекте терапии инсультов и травм спинного мозга стоит весьма остро и, по-видимому, будем решен в ближайшем будущем.

В заключении хочется отметить, что высокотехнологические исследования, о которых шла речь выше, были бы невозможны без участия коллектива кафедры и учреждений национального образовательного центра по медицинским нанобиотехнологиям, без поистине бесценной помощи других кафедр РГМУ, а также без поддержки, оказываемой Ректоратом Университета. Благодаря этой поддержке в настоящее время в Университете, впервые в стране, создан национальный образовательный центр по медицинским нанобиотехнологиям, возрождаются и развиваются ведущие клиничко-исследовательские базы, проводятся приоритетные научные исследования, формируется и постоянно совершенствуется система подготовки специалистов.

Интеграция научной и образовательной деятельности, провозглашенная Президентом РФ, равно как и продуктивное внедрение полученных результатов в практическое здравоохранение, позволят нашему Университету по праву занимать позиции ведущего научно-образовательного центра в области нейробиологии и медицинских нанобиотехнологий.