

# Нанотехнологии в медицине: состояние и перспективы

**В.А. Ткачук**



Факультет Фундаментальной Медицины  
МГУ имени М.В. Ломоносова

# Наномедицина:

применение макромолекул и наночастиц для диагностики и лечения болезней, а также репарации поврежденных тканей (*National Institutes of Health, USA*)



# Нанотехнологии в медицине

```
graph TD; A[Нанотехнологии в медицине] --> B[Высокочувствительное определение биомаркеров]; A --> C[Создание нанороботов]; A --> D[Визуализация патологических процессов в организме]; A --> E[Разработка систем адресной доставки лекарственных веществ];
```

## Высокочувствительное определение биомаркеров

(ДНК, белки, метаболиты)

в целях диагностики заболеваний и контроля за процессом лечения

## Создание нанороботов

для коррекции клеточных и молекулярных дефектов в организме

## Визуализация патологических процессов в организме

с помощью селективных контрастных агентов на основе наночастиц

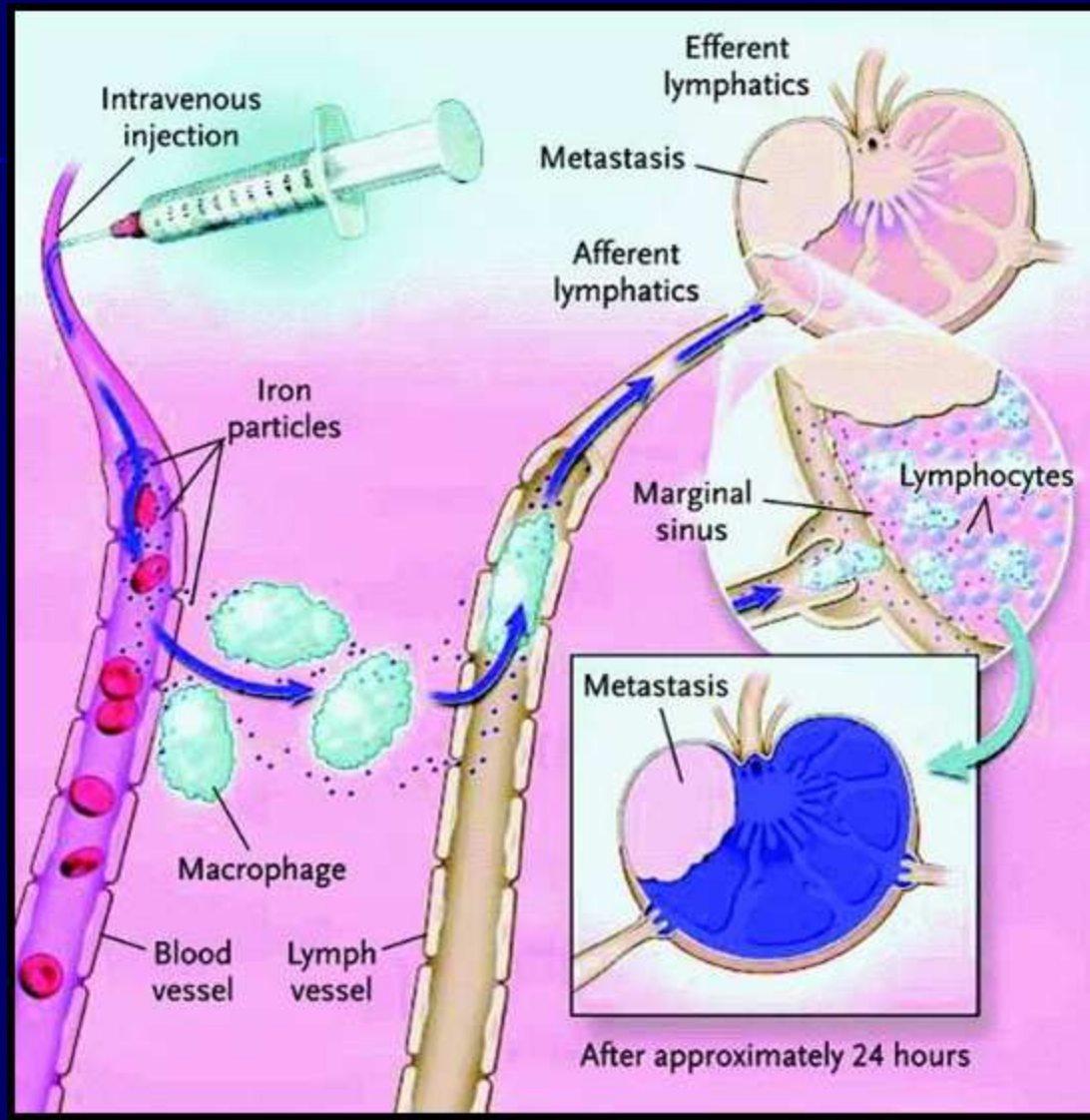
## Разработка систем адресной доставки лекарственных веществ, генов и белков в клетки и ткани с помощью наночастиц, вирусных частиц, липосом и молекулярных моторов

с помощью наночастиц, вирусных частиц, липосом и молекулярных моторов

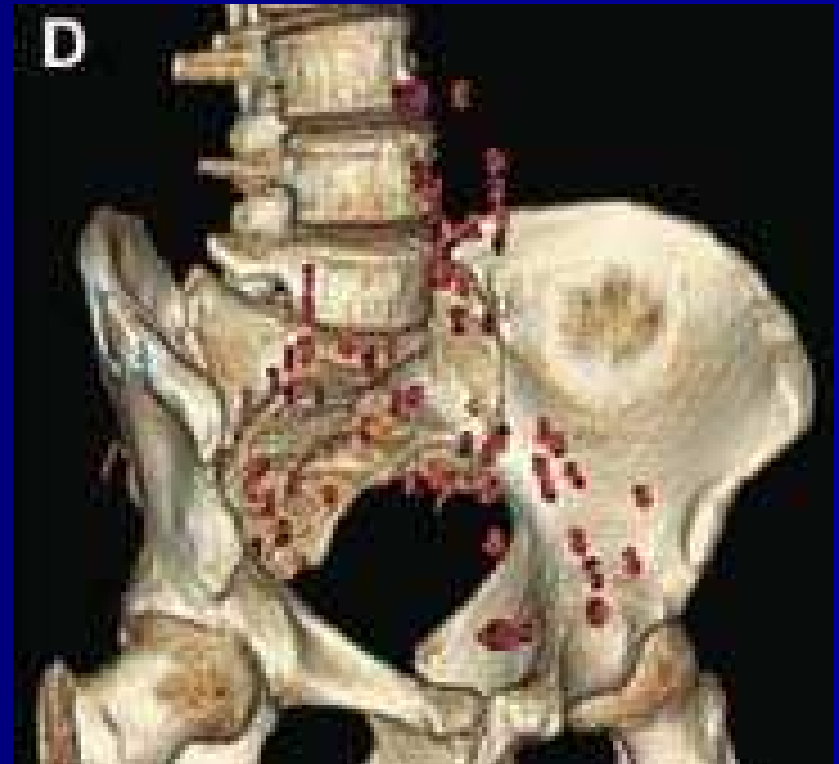
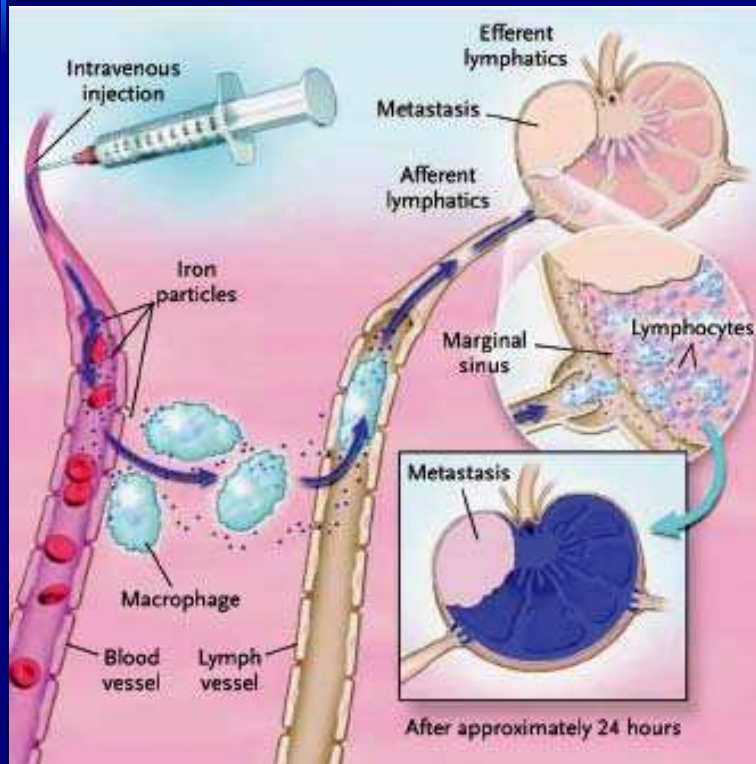
# Применение нанотехнологий для визуализации в медицине

Наночастицы	Область применения	Характеристики
Квантовые точки	Флуоресцентные метки для живых клеток, рецепторов, раковых маркеров	Полупроводниковые нанокристаллы с задаваемым спектром эмиссии
Магнитные наночастицы	Определение ДНК, белков, вирусов, контрастные агенты для МРТ	Содержат суперпарамагнитное кристаллическое ядро из оксида железа
«Перешитые» наночастицы оксида железа	Определение раковых маркеров, визуализация внутричерепных опухолей	«Перешитая» поверхность наночастиц легче модифицируется антителами

# Наночастицы позволяют выявлять метастазы в лимфоузлах

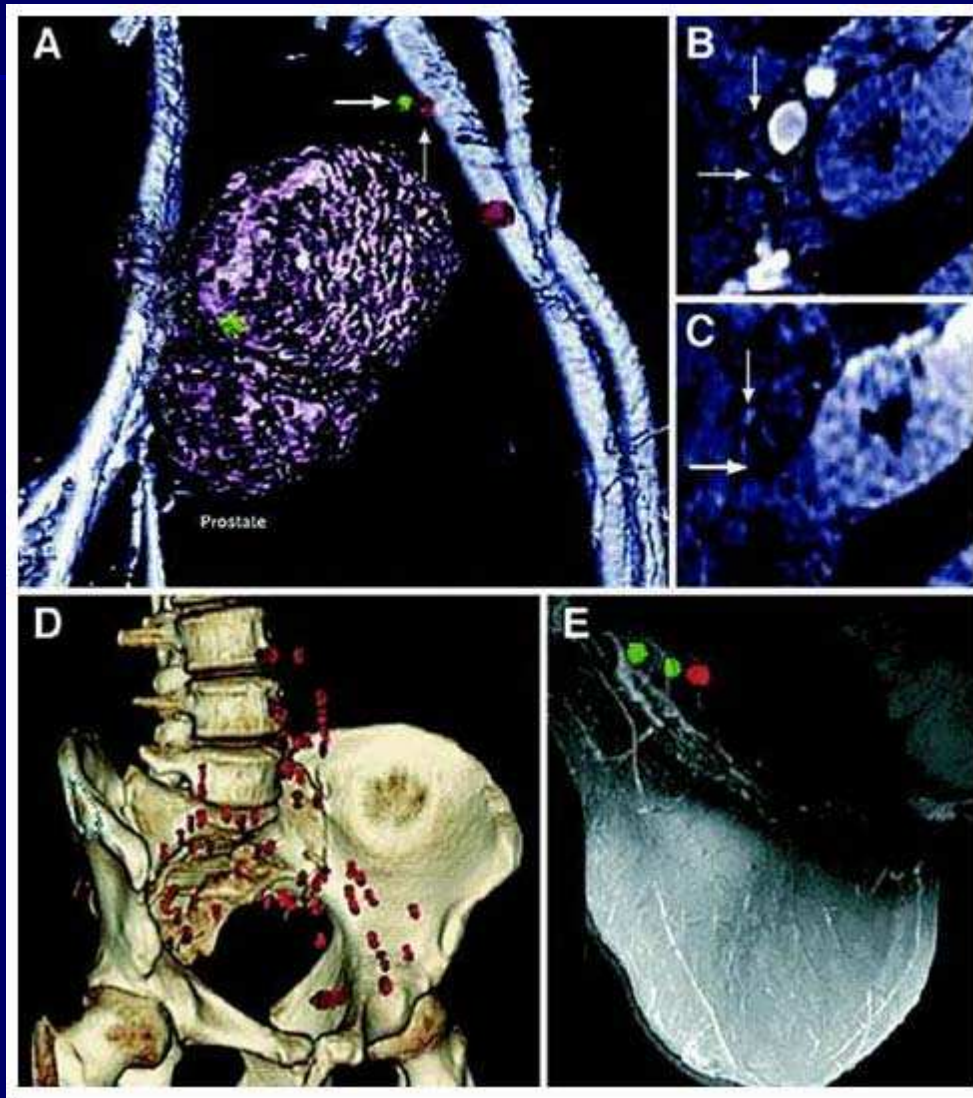


# Металлические наночастицы для выявления метастаз методом ЯМР



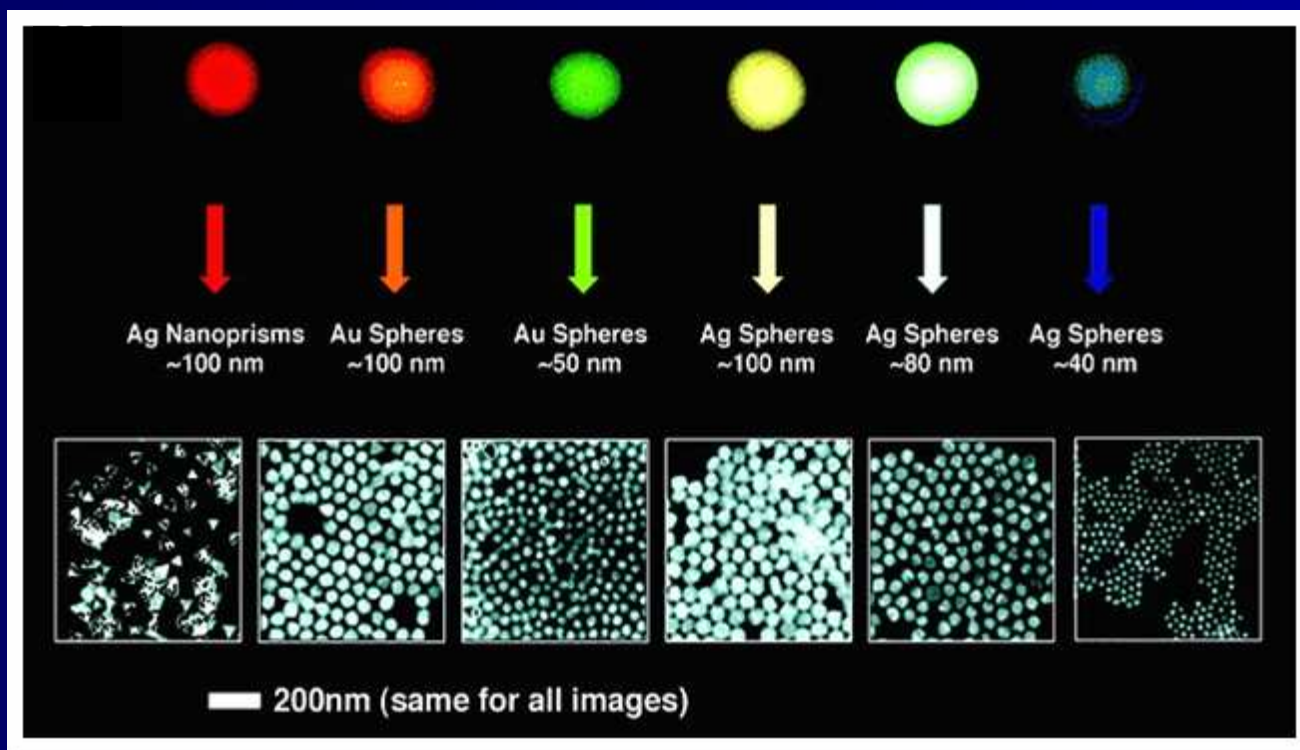


# Визуализация метастазов в лимфоузлах при раке простаты с помощью лимфотропных наночастиц и магнитно-резонансной томографии



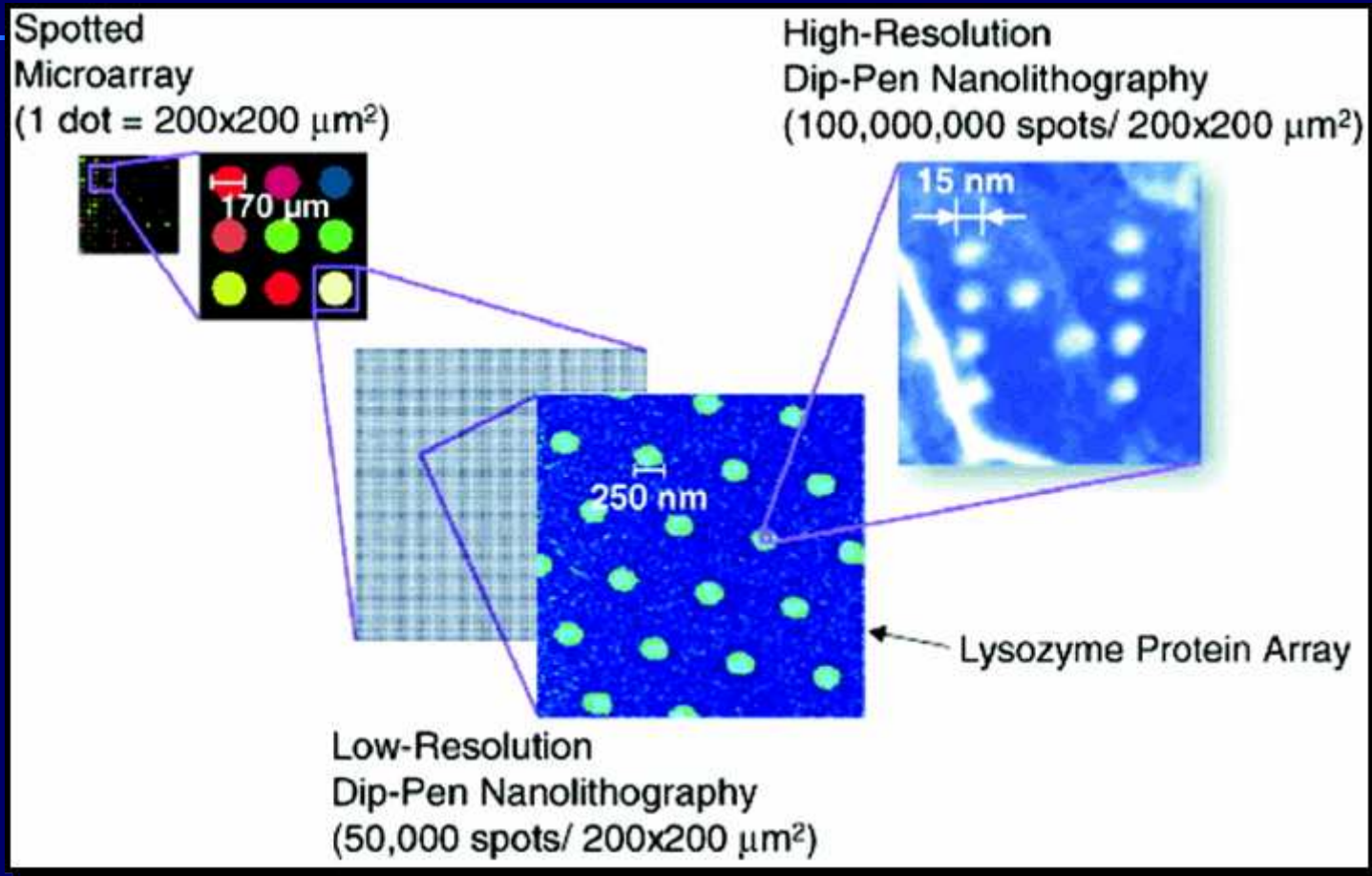
*Jaffer FA , Weissleder R.  
JAMA293:855–862,2005.*

# Применение полупроводниковых нанокристаллов (квантовых точек) и металлических нанокристаллов для создания систем мультиплексного анализа (наночипов)

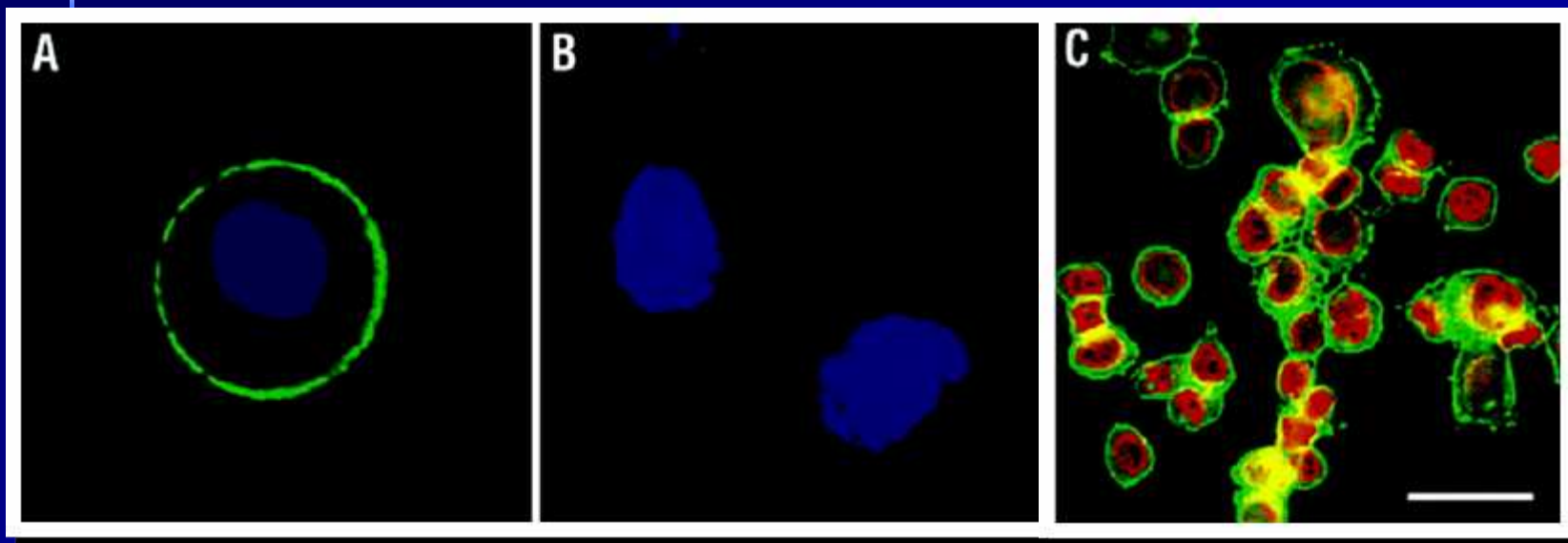




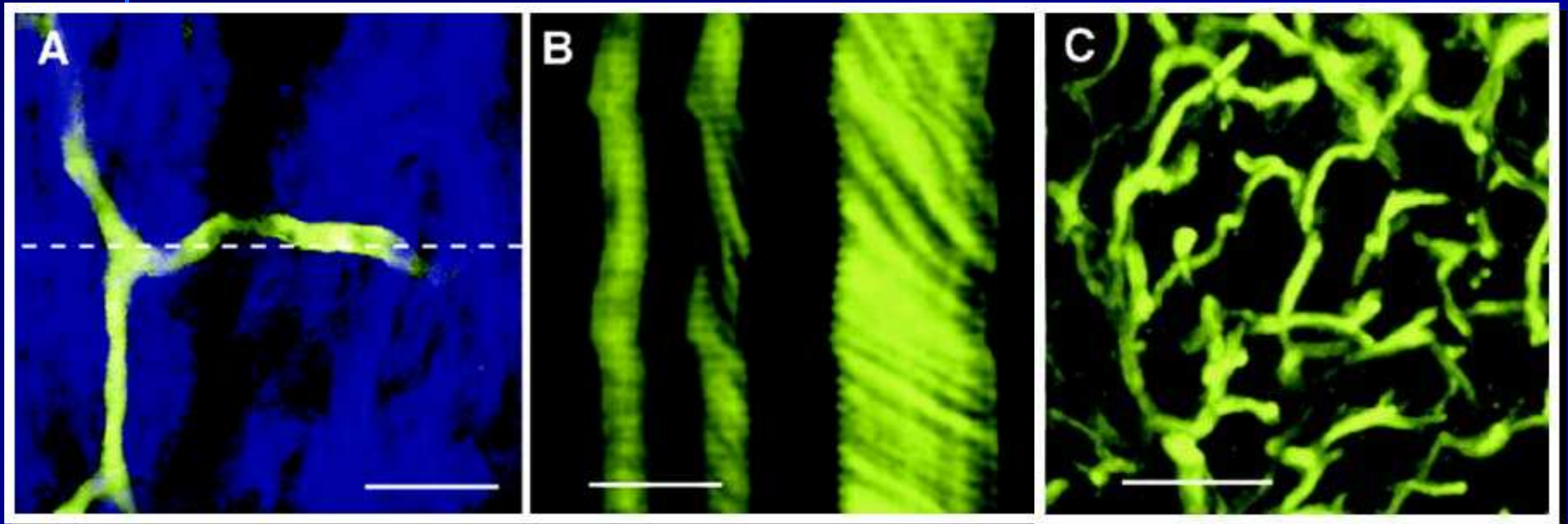
# Наночиповая технология позволяет генерировать 100 миллионов точек на той же площади, которую занимает одна точка в микрочипе



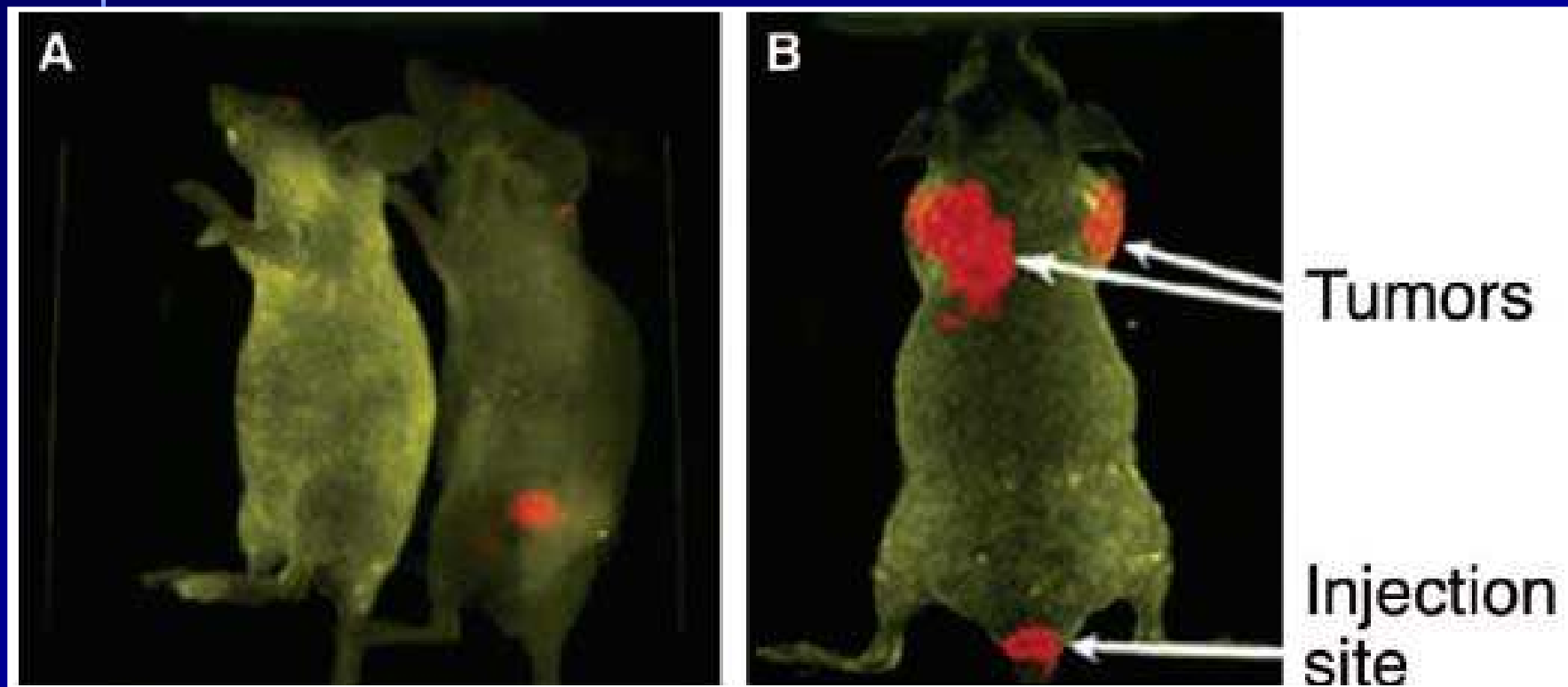
# Выявление раковых маркеров на клетках с помощью квантовых точек



# Визуализация микрососудов с помощью водорастворимых квантовых точек в коже мышы (глубина 100 мкм)



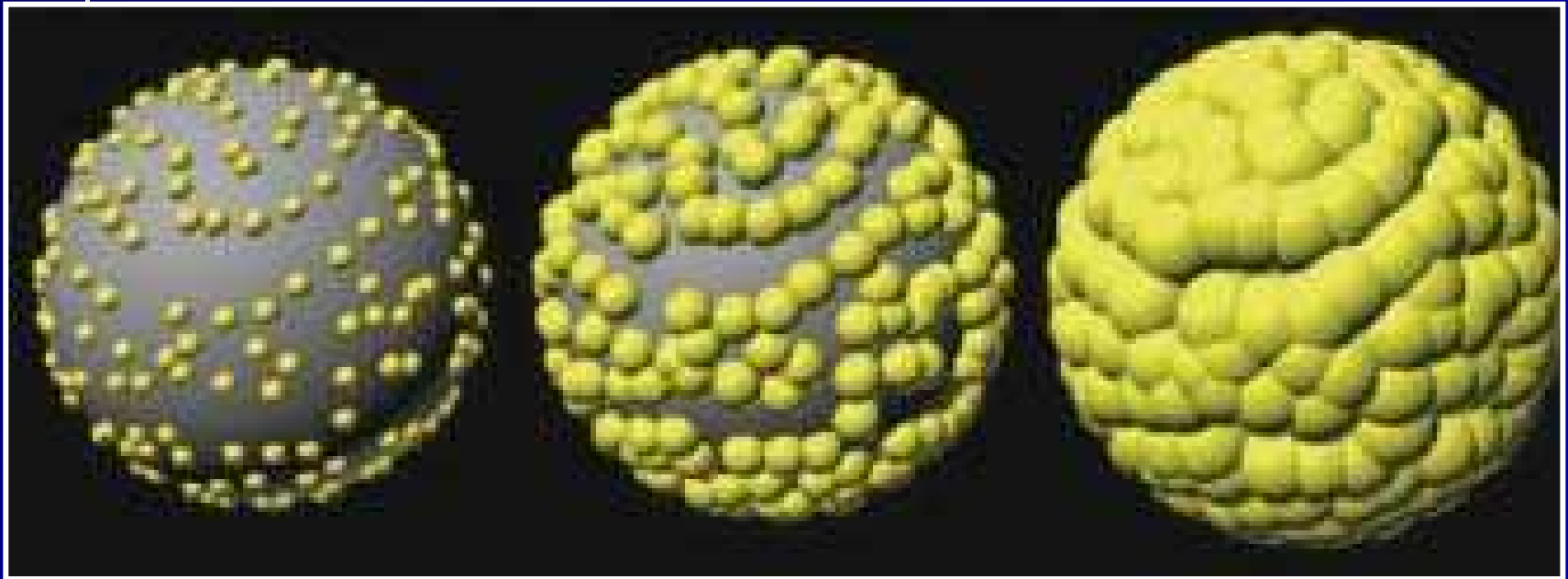
# Наночастицы quantum dots для выявления очагов опухолей



# Применение нанотехнологий для диагностики в медицине

Нанотехнологический продукт	Область применения	Характеристики
Наночастицы золота	Определение ДНК	Быстрый тест с простым оптическим считыванием
Наночастицы кремния	Определение ДНК	Микрочиповый «сендвич»-анализ ДНК
Сканометрический метод с использованием наночастиц золота в качестве зондов	Определение ДНК	<b>100</b> -кратное повышение чувствительности по сравнению со стандартными методами
Био-штрихкодированное усиление сигнала с помощью многофункциональных наночастиц	Определение ДНК и белков	Золотые наночастицы и магнитные микрочастицы обеспечивают очень высокую чувствительность при связывании мишеней
Золотые нанораквины	Определение белков	Антитела конъюгируются с поверхностью нанораквинов
Нанотрубки и нанопровода	Определение ДНК и белков	Нанотрубки и нанопровода покрываются соответствующими антителами
Нанорычаги	Определение генов, РНК, белков, бактерий, вирусов	Высокочувствительные сенсоры массы, могут быть дериватизированы биологическими молекулами
Наноматрицы	Определение ДНК и белков	Огромный потенциал для мультиплексного анализа и создания универсальных биочипов
Нанофлюидика	Определение ДНК, сортировка клеток, генетическое рофиллирование	Разработка чипов-лабораторий

# Наночастицы (nanoshells) как контейнеры для переноса генетического материала



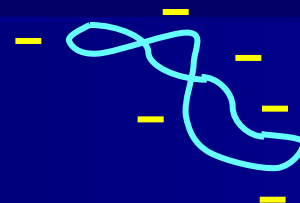
*Halas N: Cancer nanotechNOVAscienceNOW,  
[www.pbs.org/wgbh/nova/sciencenow/3209/03-canc-nf.html](http://www.pbs.org/wgbh/nova/sciencenow/3209/03-canc-nf.html).  
Accessed March 2006.*



# Приготовление комплексов ДНК с наночастицами

плазмидная ДНК

поликатион



комплекс ДНК/  
поликатион

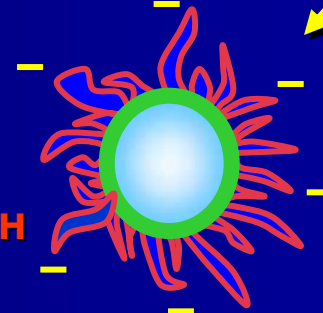


полианион



комплекс ДНК/  
поликатион/полианион

комплекс ДНК/  
поликатион/полианион

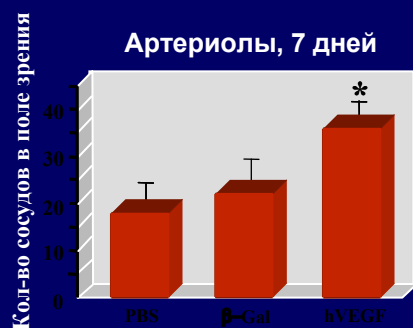
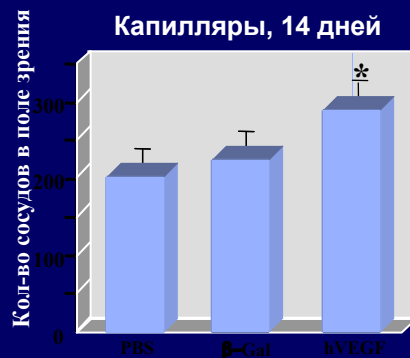
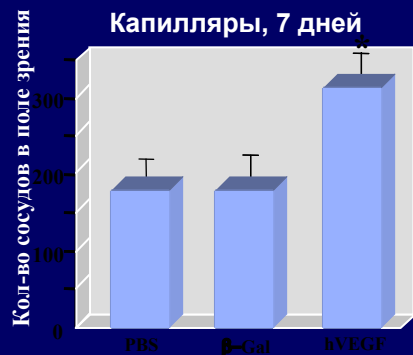


*Pharmaceutical Research, Vol. 21, No. 9, September 2004 (© 2004)*

## Polyelectrolyte Nanoparticles Mediate Vascular Gene Delivery

Sergey Zaitsev,<sup>1,2</sup> Régis Cartier,<sup>1</sup> Oleg Vyborov,<sup>3</sup>  
Gleb Sukhorukov,<sup>4</sup> Bernd-Reiner Paulke,<sup>5</sup>  
Annekathrin Haberland,<sup>1,6</sup>  
Yelena Parfyonova,<sup>3</sup> Vsevolod Tkachuk,<sup>3</sup> and  
Michael Böttger<sup>1,7</sup>

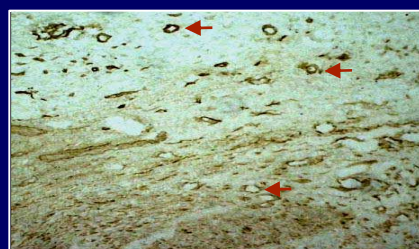
# Стимуляция ангио-артериогенеза и уменьшение размера инфаркта при введении плазмиды с кДНК VEGF -165 в периинфарктную зону сердца крысы



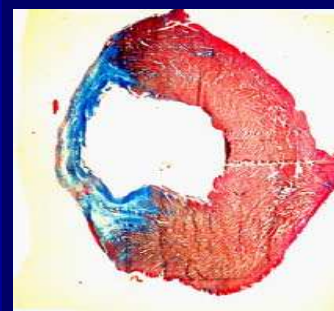
n=8 в каждой группе



Контроль



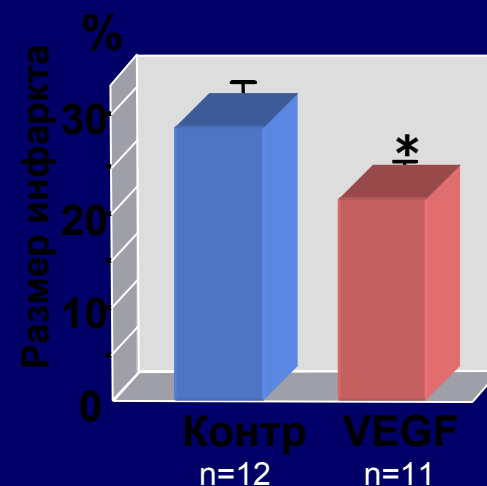
VEGF



контроль

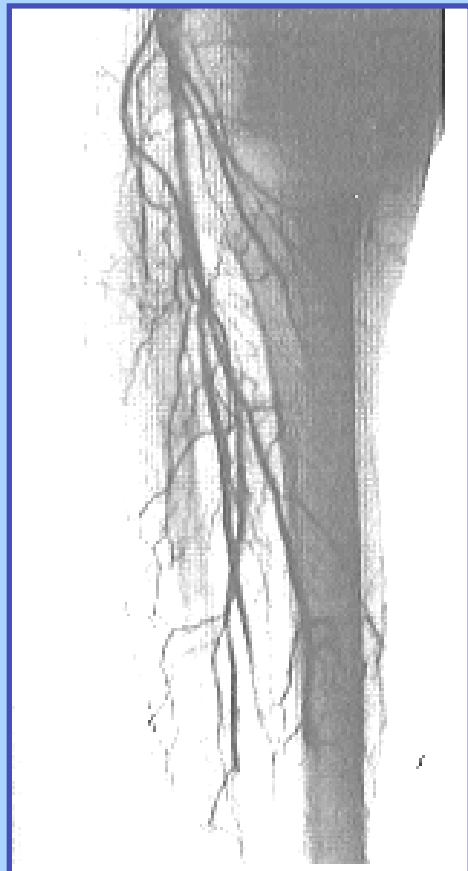


VEGF

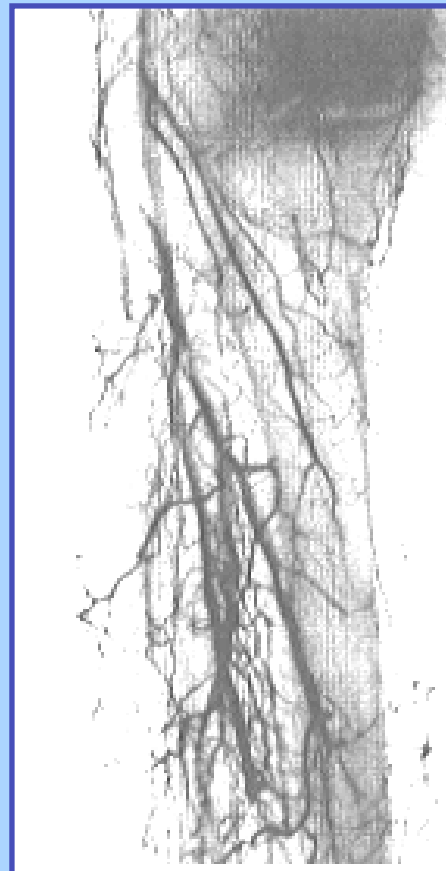


\* - p < 0.05

# Образование новых кровеносных сосудов после инъекции гена $phVEGF_{165}$

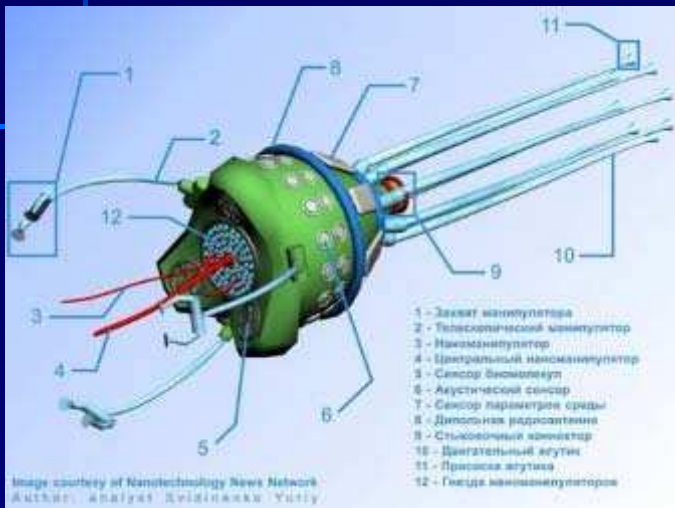


До инъекции

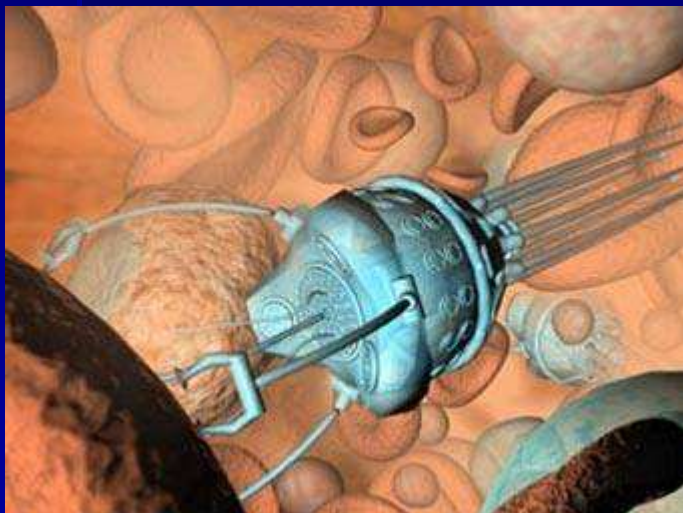


Через 8 недель

# Нанороботы

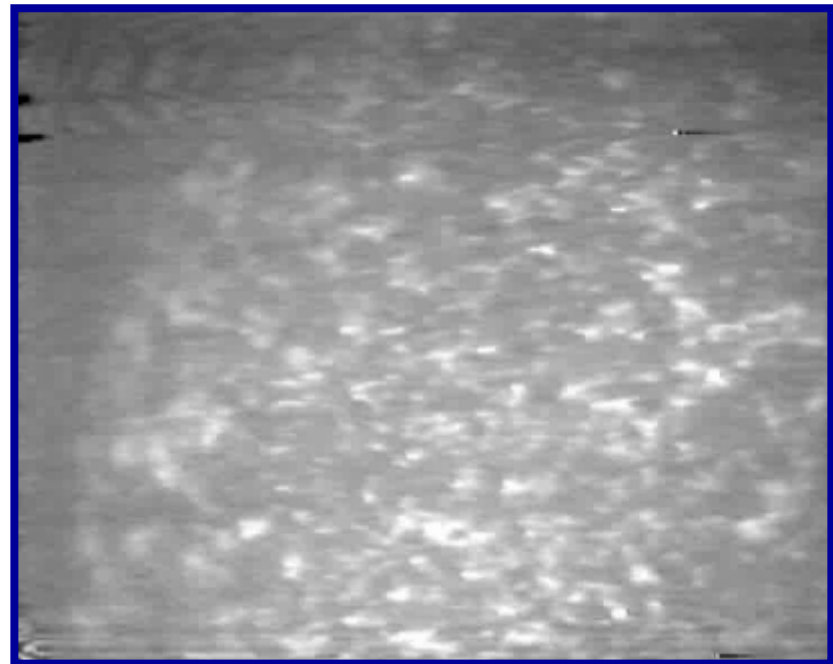
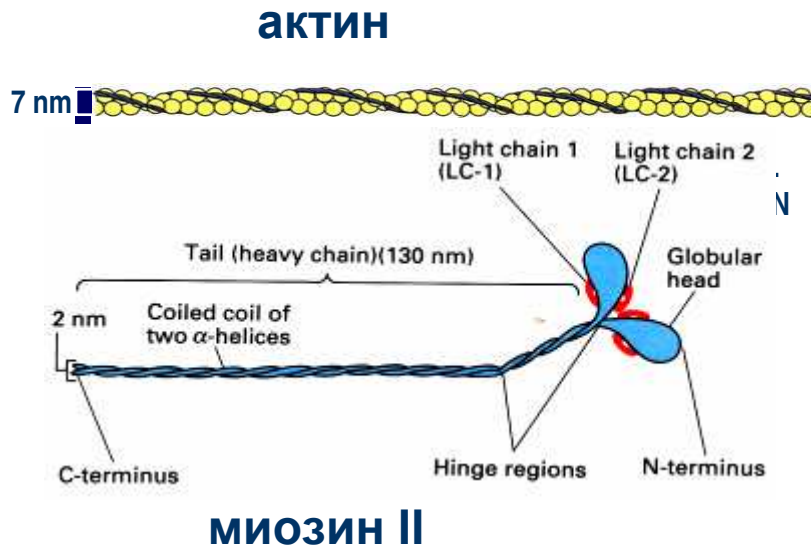


*Julian Baum/Science Photo Library*



# Молекулярные моторы – биосовместимые двигатели для нанороботов

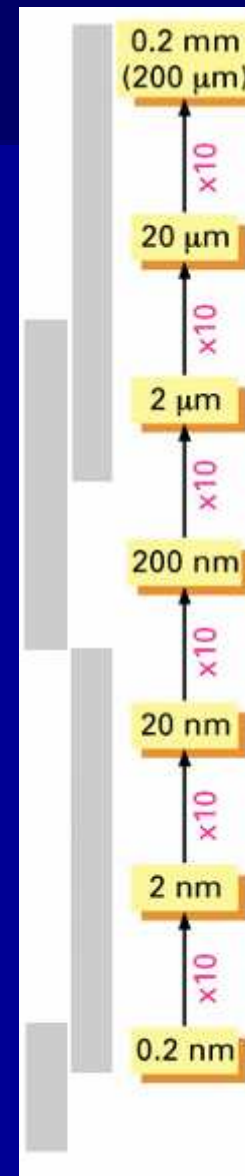
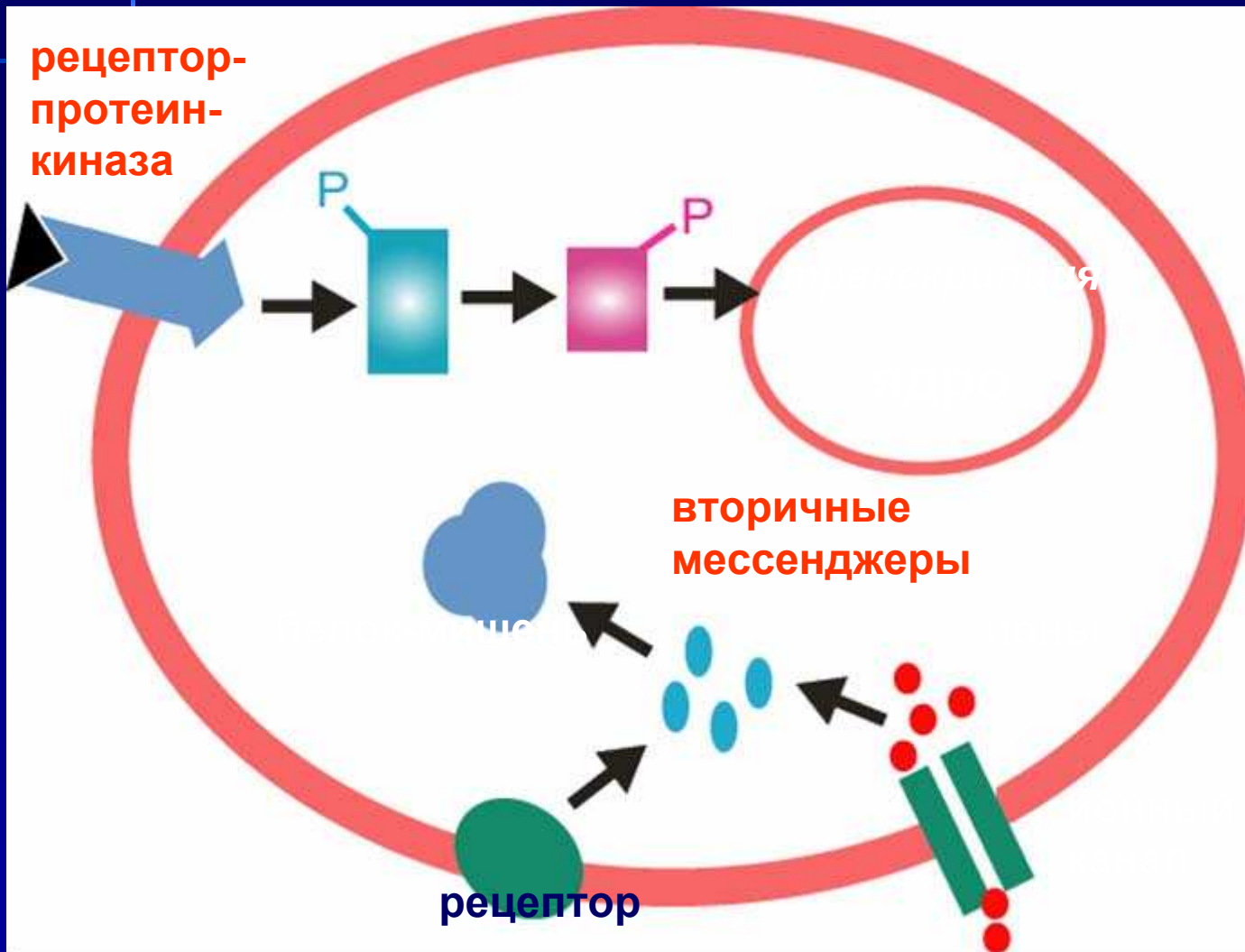
МИОЗИНЫ • КИНЕЗИНЫ • ДИНЕИНЫ



Движение полимеров актина по стеклу, покрытому миозином

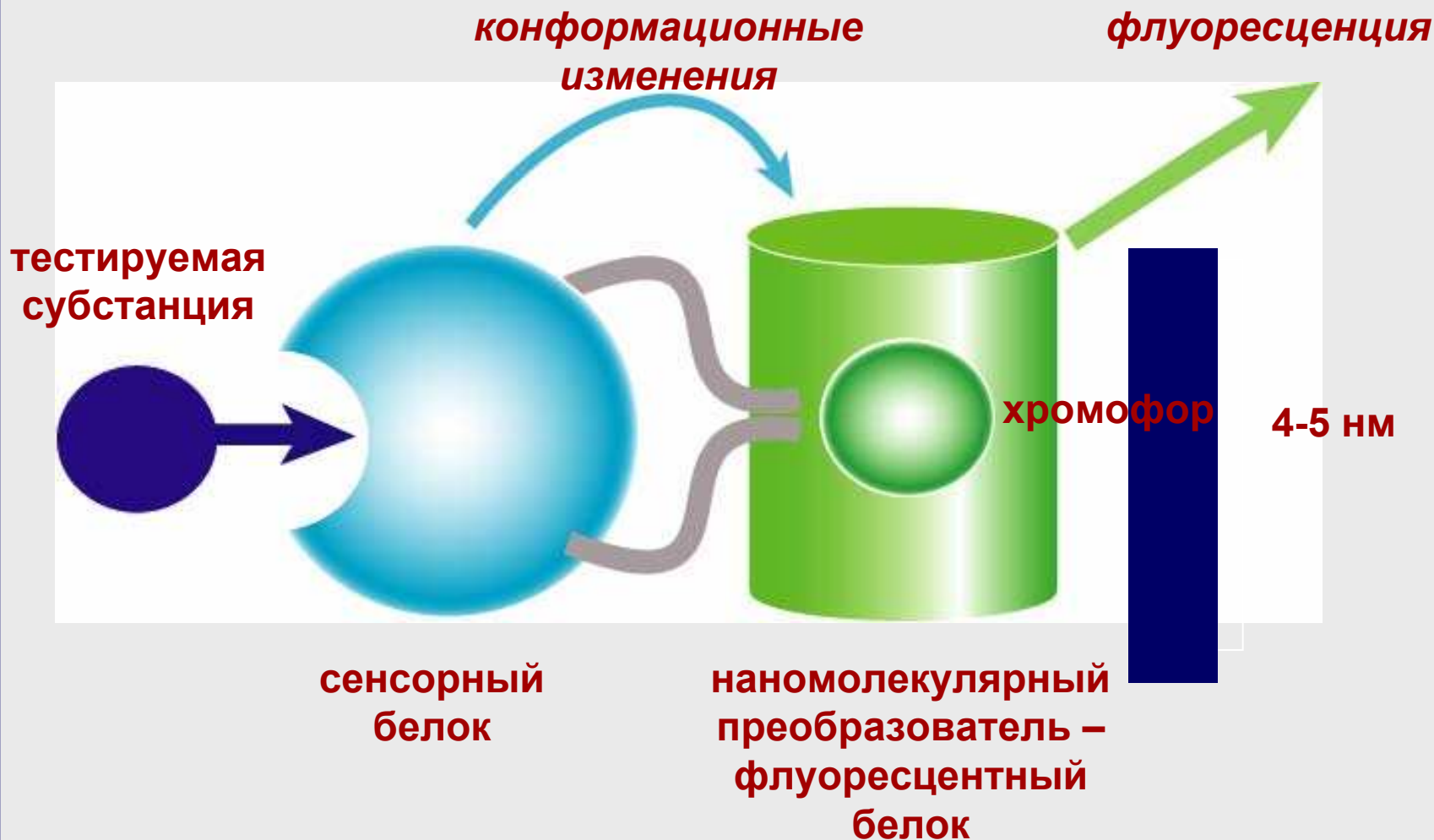


# В передачу внутриклеточных сигналов вовлечены белки и низкомолекулярные сигнальные молекулы

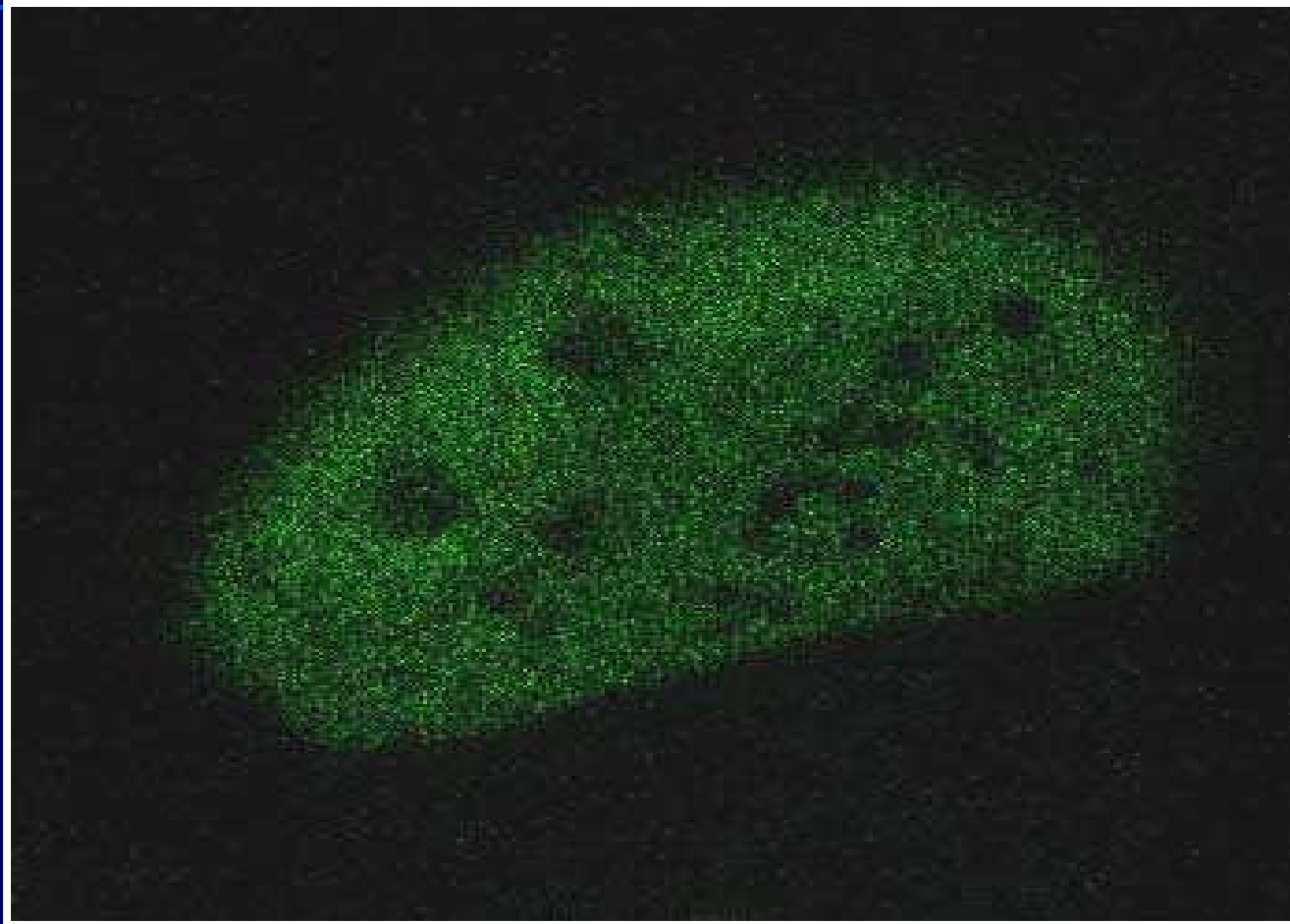




# Наномолекулярные биосенсоры – ключ к исследованию внутриклеточных процессов в живых системах на молекулярном уровне



# Регистрация изменений концентрации пероксида водорода в ходе апоптоза раковой клетки линии HeLa



*Belousov VV et al. Nature Methods. 2006 Apr;3(4):281-6*

# Возможное участие наночастиц в развитии патологий

## Наночастицы

↓  
Проникновение наночастиц в клетки различных тканей

↓  
Накопление наночастиц в ядре и цитоплазме клеток

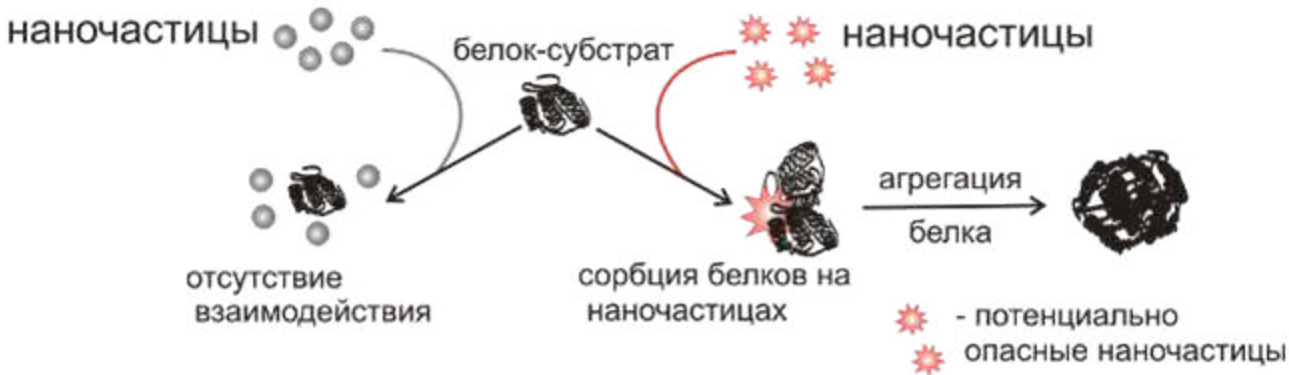
↓  
Инициация аморфной или прионоподобной агрегации белков, нарушение защитных систем клетки (шапероны, убиквитин)

↓  
Накопление в клетке нерастворимых агрегатов белков

↓  
Смерть клеток, развитие патологий, связанных с накоплением агрегатов белков (болезни Паркинсона, Альцгеймера, трансмиссивные нейропатии и др.)

# Методы оценки биобезопасности наночастиц *in vitro*

## 1. Влияние наночастиц на агрегацию модельных белков-субстратов



## 2. Влияние наночастиц на защитные системы клетки на примере малых белков теплового шока (sHSP)



Методы, используемые для оценки взаимодействия наночастиц с белками:

1. Прямое и динамическое лазерное светорассеяние
2. Гельхроматография
3. Флуоресцентная спектроскопия

# Оценка биобезопасности наночастиц на культивируемых клетках человека

- **Морфология клеток**
- **Деление клеток**
- **Движение клеток**
- **Экспрессия специфических маркеров**
- **Апоптоз**

# Нанотехнологии в медицине

**Всеволод Арсеньевич Ткачук**



Факультет Фундаментальной Медицины  
МГУ имени М.В. Ломоносова



# Публикации по теме

1. Lukyanov KA, Chudakov DM, Fradkov AF, Labas YA, Matz MV, Lukyanov S. Discovery and properties of GFP-like proteins from nonbioluminescent anthozoa. **Methods Biochem Anal.** 2006; 47:121-38
2. Bulina ME, Lukyanov KA, Britanova OV, Onichtchouk D, Lukyanov S, Chudakov DM. Chromophore-assisted light inactivation (CALI) using the phototoxic fluorescent protein KillerRed. **Nature Protocols.** 2006;1: 947-953
3. Gurskaya NG, Verkhusha VV, Shcheglov AS, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Fradkov AF, Lukyanov S, Lukyanov KA. Engineering of a monomeric green-to-red photoactivatable fluorescent protein induced by blue light. **Nature Biotechnology.** 2006 Apr;24(4):461-5
4. Belousov VV, Fradkov AF, Lukyanov KA, Staroverov DB, Shakhbazov KS, Terskikh AV, Lukyanov S. Genetically encoded fluorescent indicator for intracellular hydrogen peroxide. **Nature Methods.** 2006 Apr;3(4):281-6
5. Bulina ME, Chudakov DM, Britanova OV, Yanushevich YuG, Staroverov DB, Chepurnykh TV, Merzlyak EM, Shkrob MA, Lukyanov S, Lukyanov KA. A genetically encoded photosensitizer. **Nature Biotechnology.** 2006; 24(1):95-9
6. Chudakov DM, Lukyanov S, Lukyanov KA. Fluorescent proteins as a toolkit for in vivo imaging. **Trends Biotechnology.** 2005 Dec;23(12):605-13

# Создание новых нанобиосенсоров

- Создание линейки биосенсоров для регистрации изменений концентрации сигнальных молекул – вторичных мессенджеров в клетке (активные формы кислорода, NO-радикал, цАМФ, цГМФ, Ca<sup>2+</sup>)
- Создание линейки биосенсоров для регистрации активности важнейших протеинкиназ
- Разработка систем скрининга лекарственных препаратов

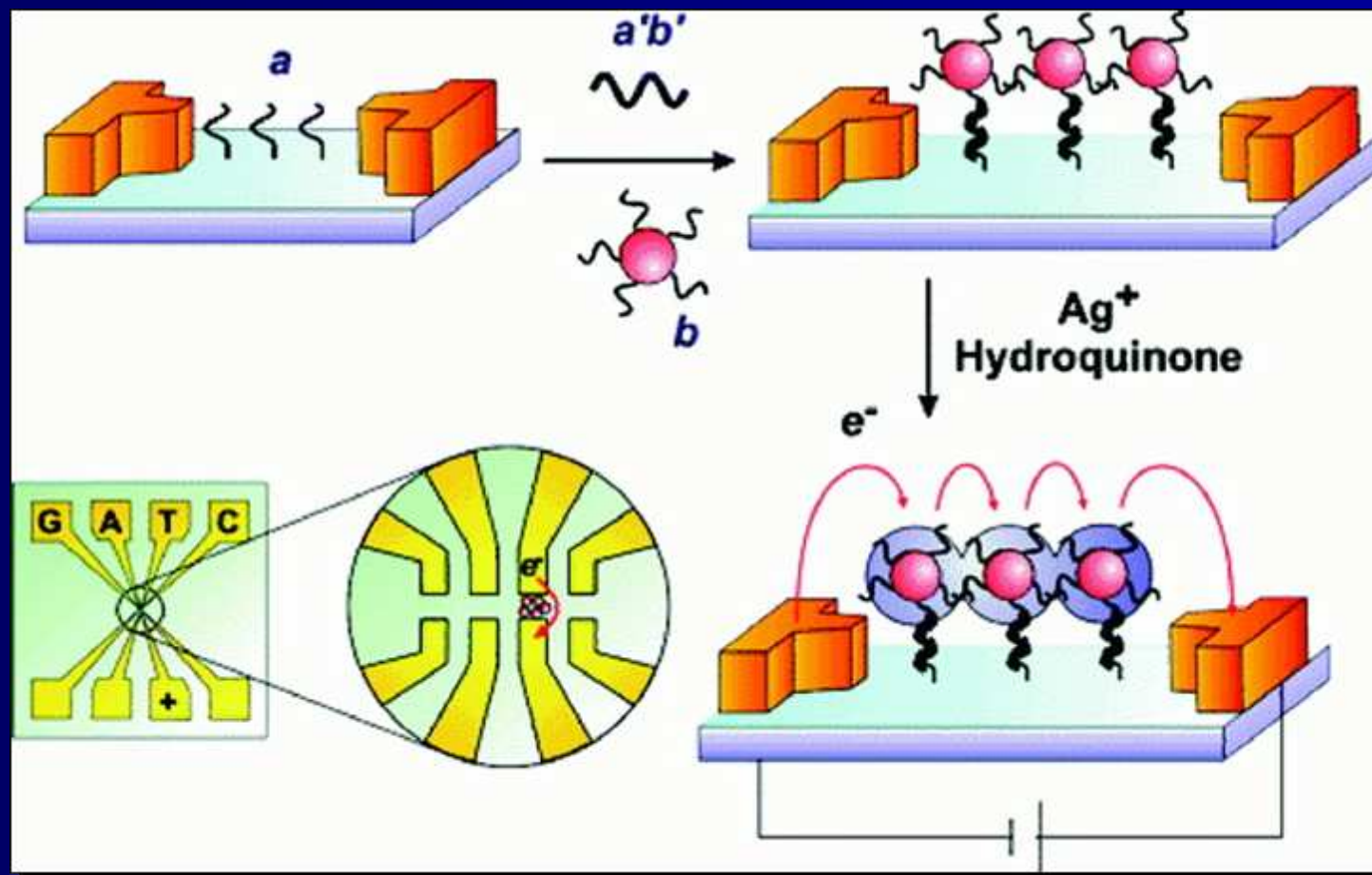
# Первый наномолекулярный биосенсор для детекции пероксида водорода (HyPer)

- Разработан в нашем научно-исследовательском коллективе
- Работа опубликована в престижном научном журнале **"Nature Methods"**
- Работа удостоена награды за инновационность на международной конференции **"Society for Free Radicals Research"**

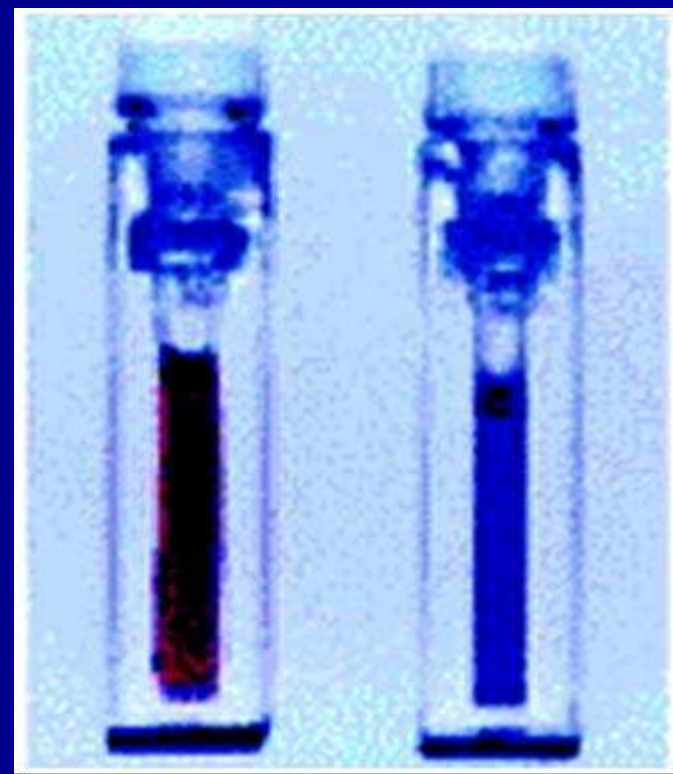
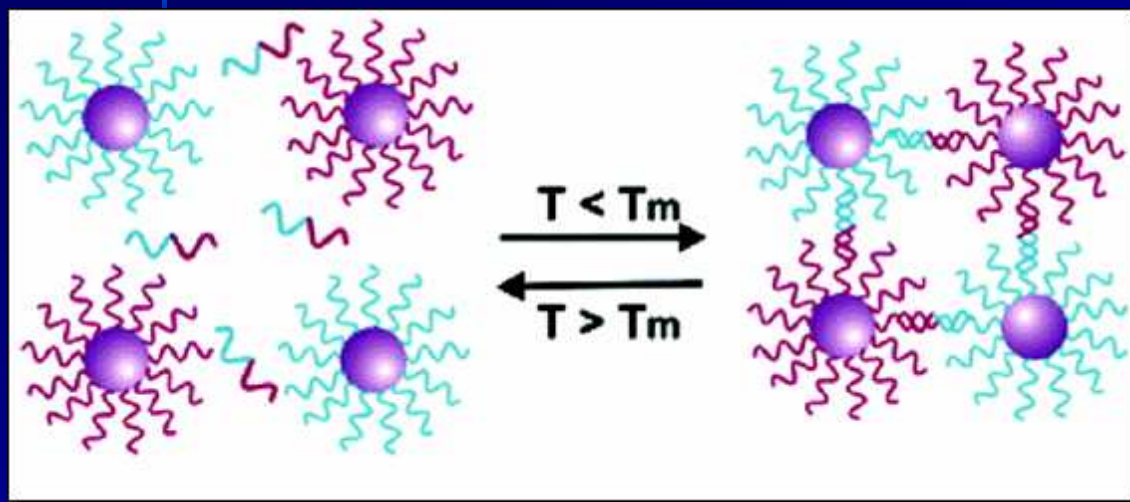
# Актуальность проблемы

- Многоклеточный организм состоит из клеток с разнообразными функциями, координация которых осуществляется путем передачи химических сигналов.
- Клетки распознают внешние сигналы и приводят в действие внутриклеточные пути передачи информации, которые ведут к регуляции клеточных процессов.
- Нарушения в передаче внутриклеточных сигналов – причина многих патологий, в том числе онкологических, нейродегенеративных и сердечно-сосудистых заболеваний.

# Электродетекция ДНК с помощью зондов на основе наночастиц на основе наночастиц



# Определение ДНК по агрегации наночастиц золота, конъюгированных с олигонуклеотидами

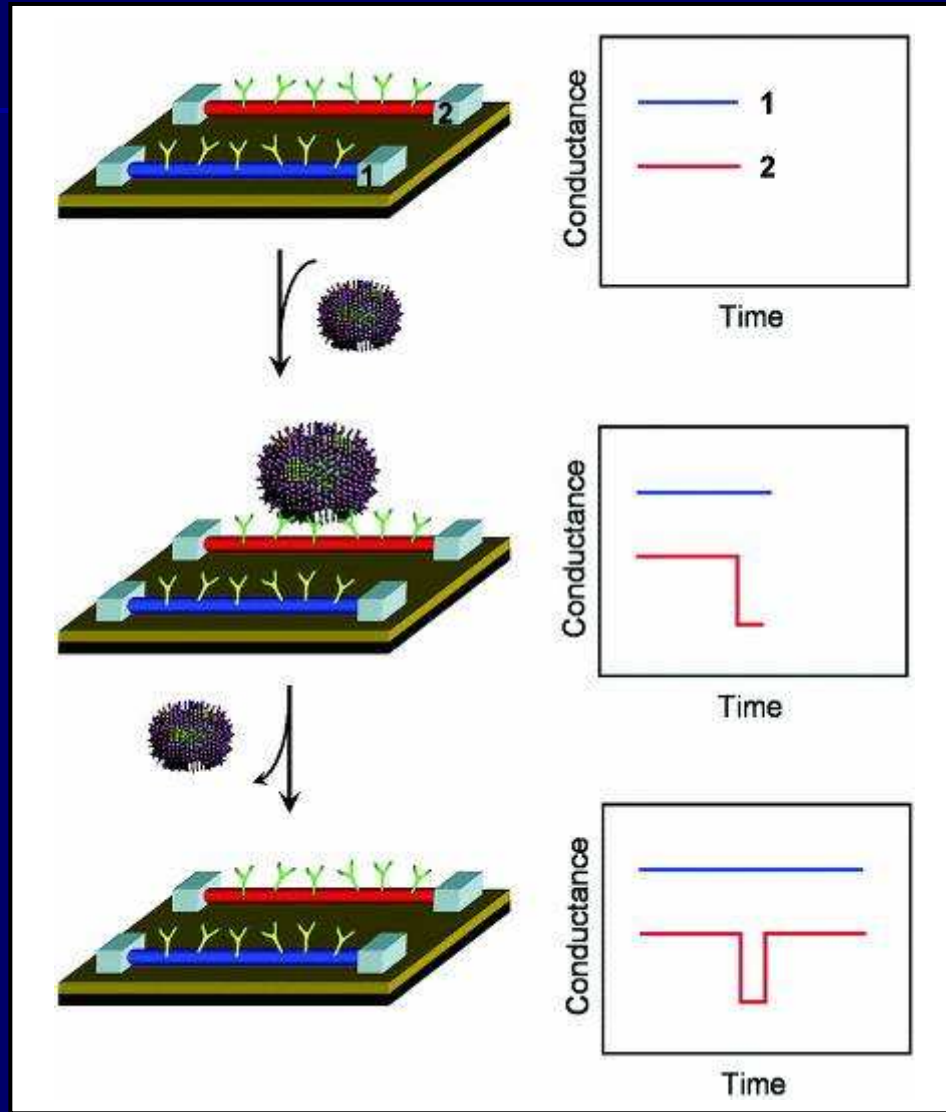


- ДНК

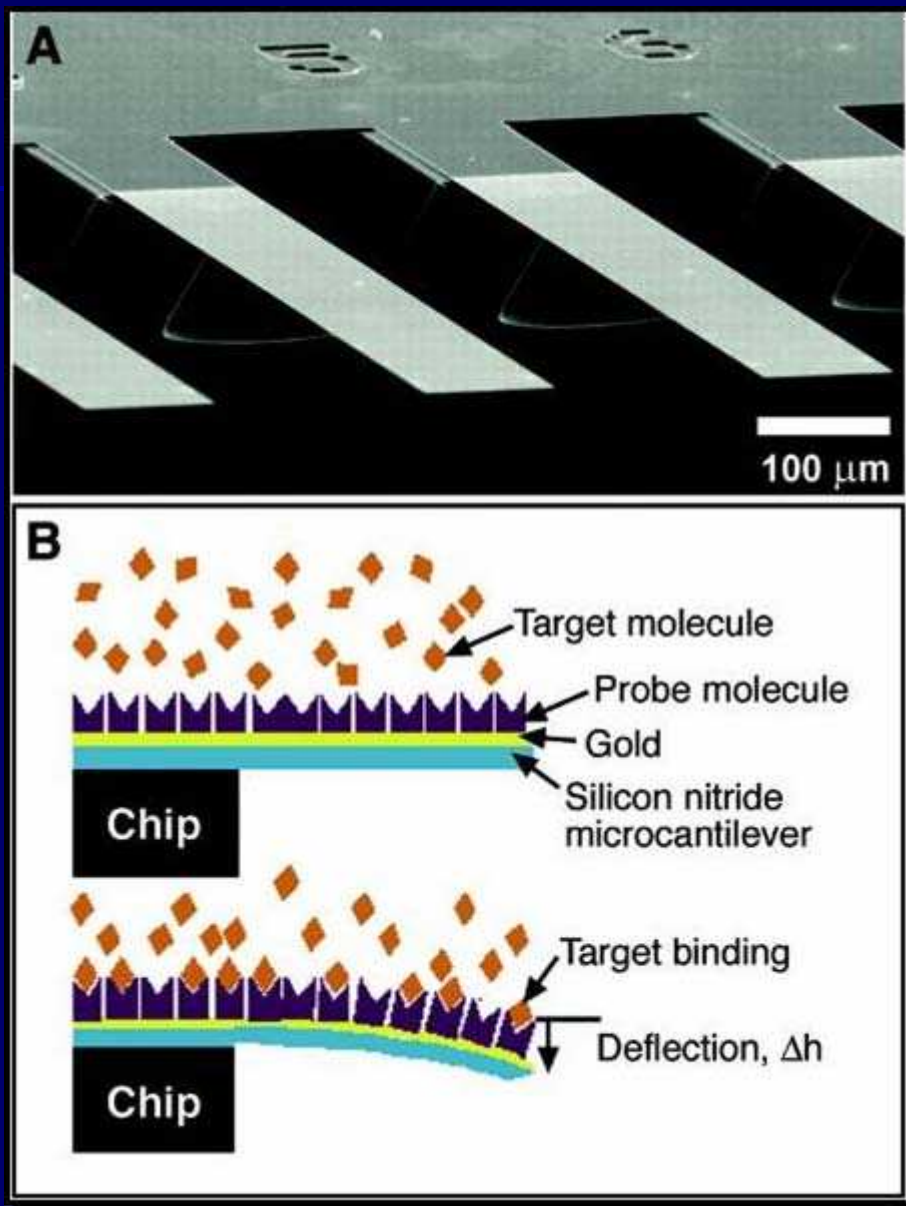
+ ДНК



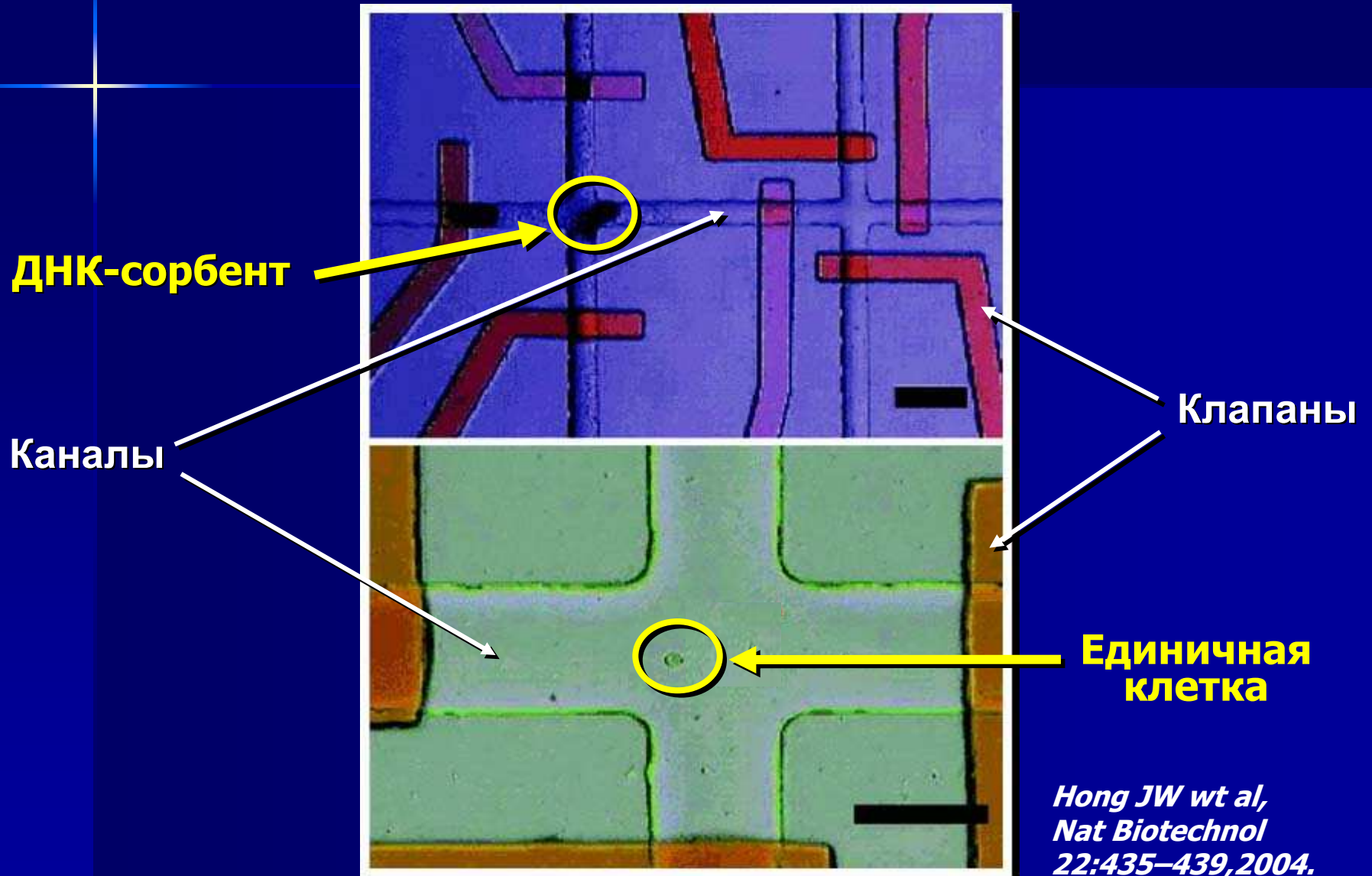
# Детекция единичных вирусов с помощью нанопроводников



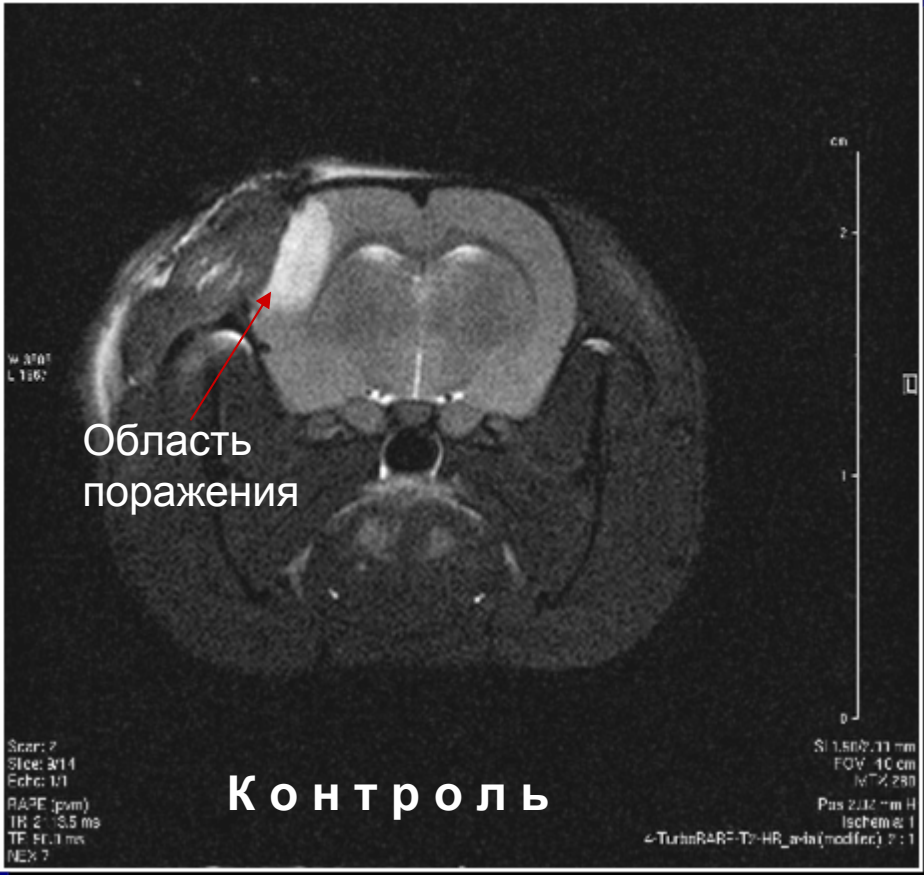
# Детекция биомолекул с помощью нанорычагов



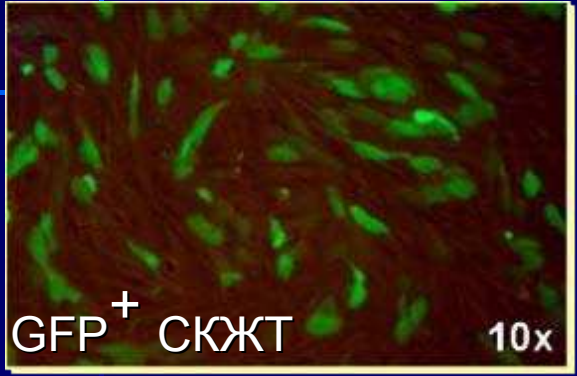
# Создание микролаборатории на чипах для выделения ДНК из единичных клеток, для сортировки клеток и других задач



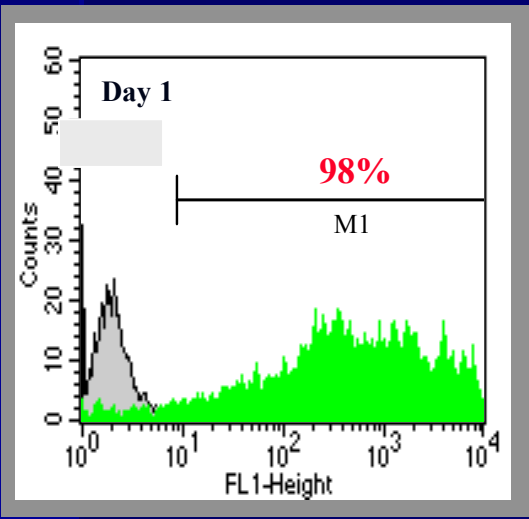
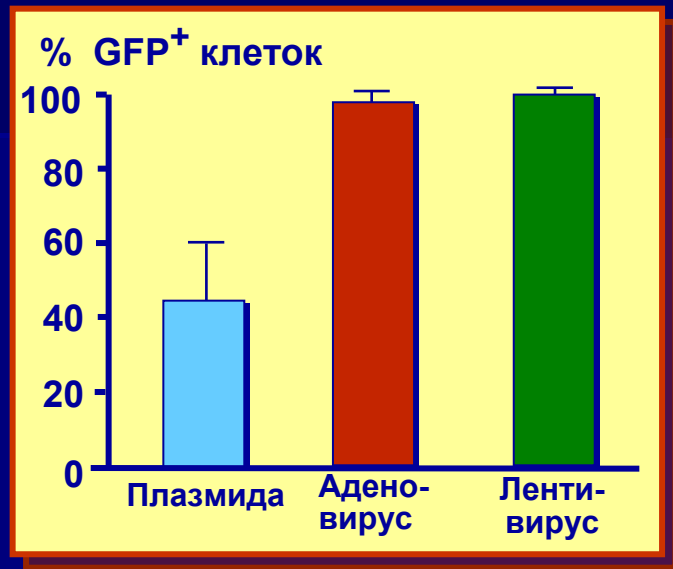
# МРТ-изображение фокального очага поражения головного мозга, вызванного окклюзией средней мозговой артерии



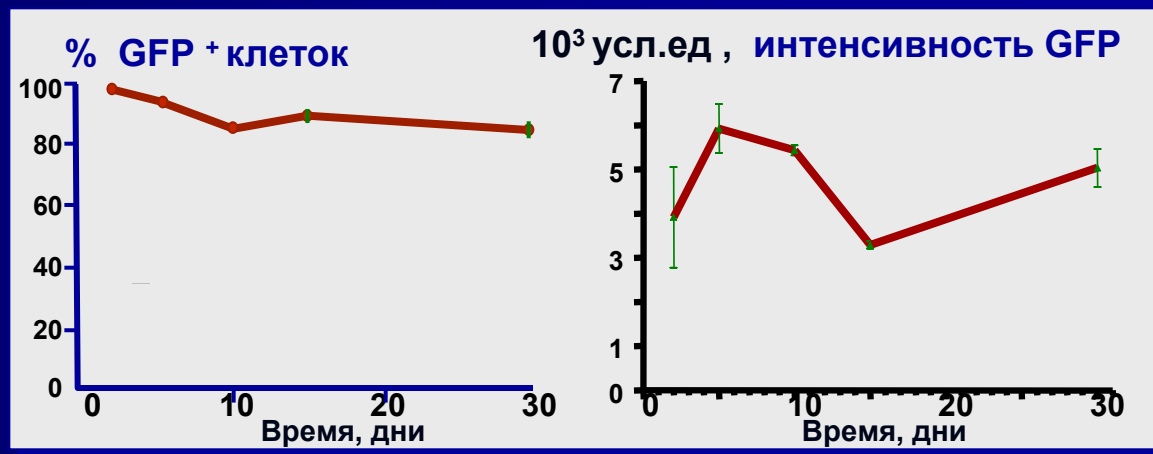
# Эффективность трансфекции чСКЖТ при использовании плазмидного, аденовирусного и лентивирусного методов трансфекции



Трансфекция плазмидой



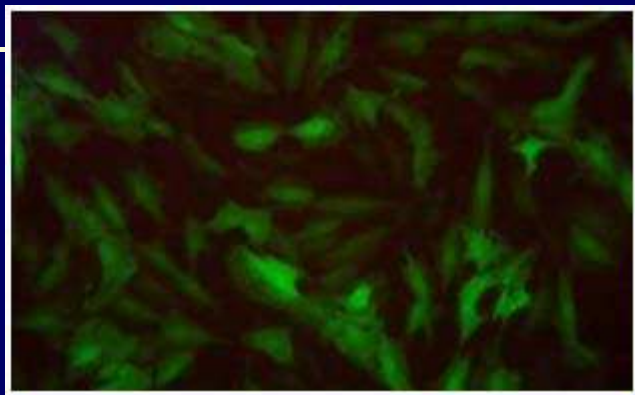
Трансфекция аденовирусом



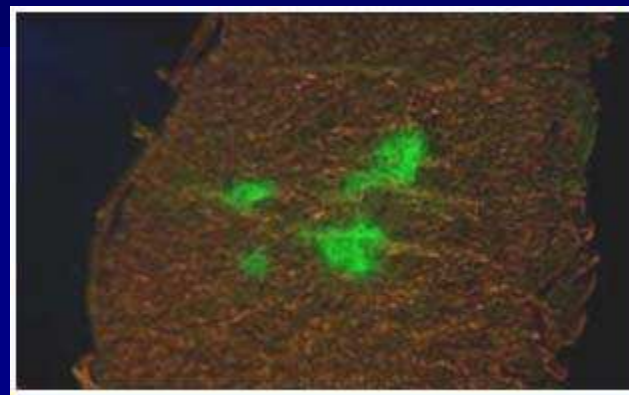
Трансфекция лентивирусом



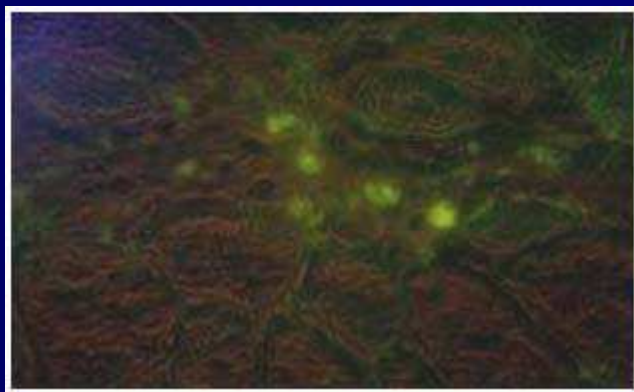
# Детекция меченных СКЖТ после введения в ишемизированные мышцы



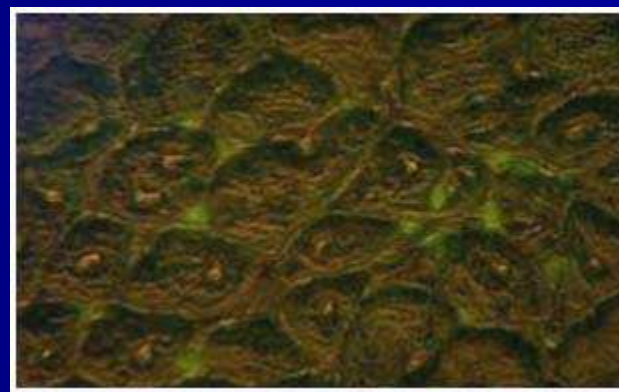
в культуре клеток



через 3 часа  
после введения



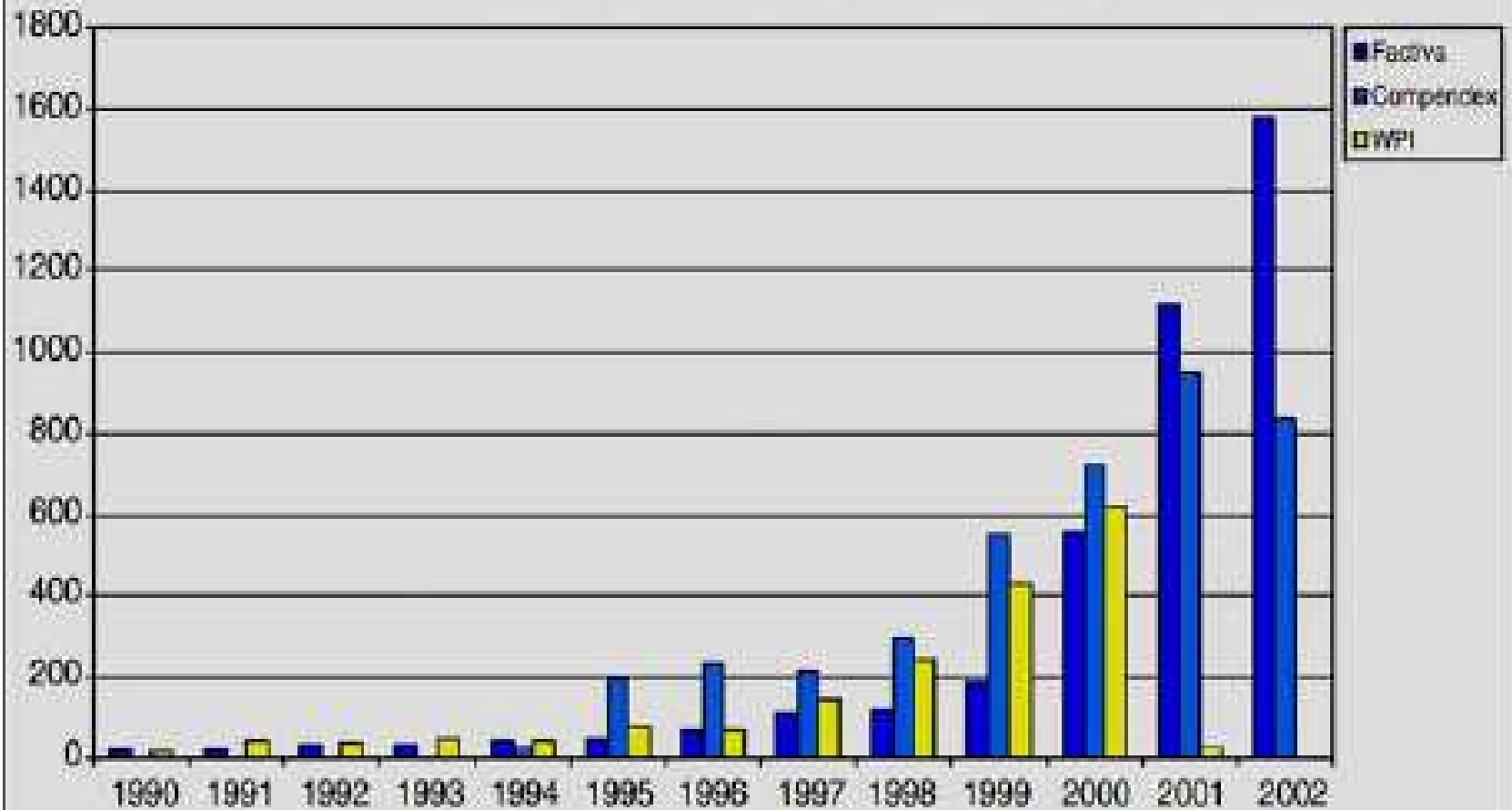
через 3 дня  
после введения



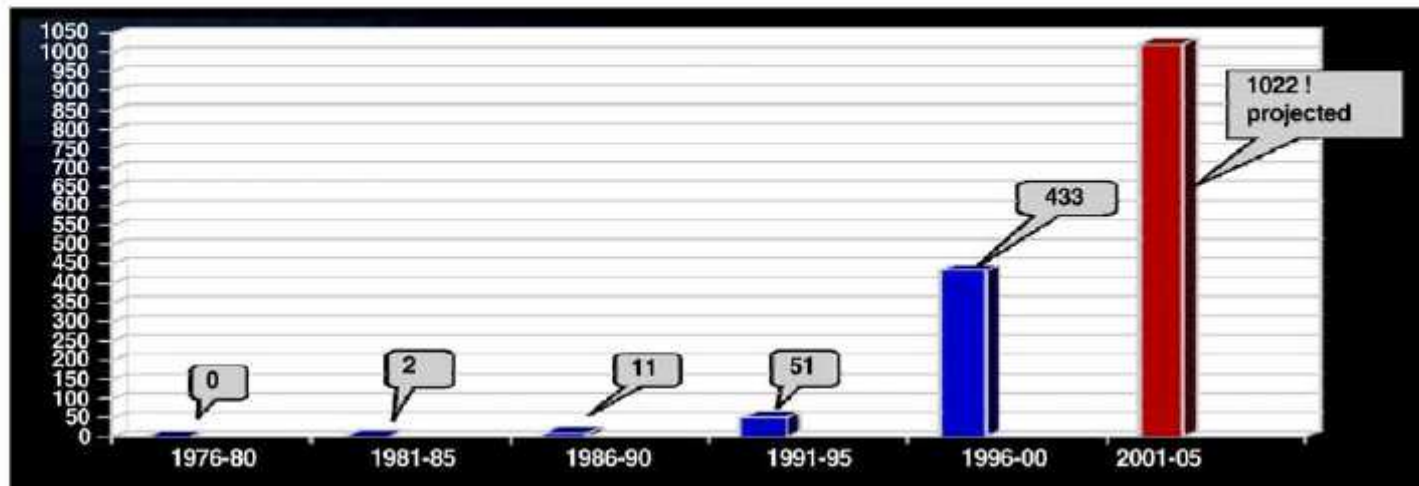
через 7 дней  
после введения



Nanotech Related Articles or Publications - Business / Scientific / Patents

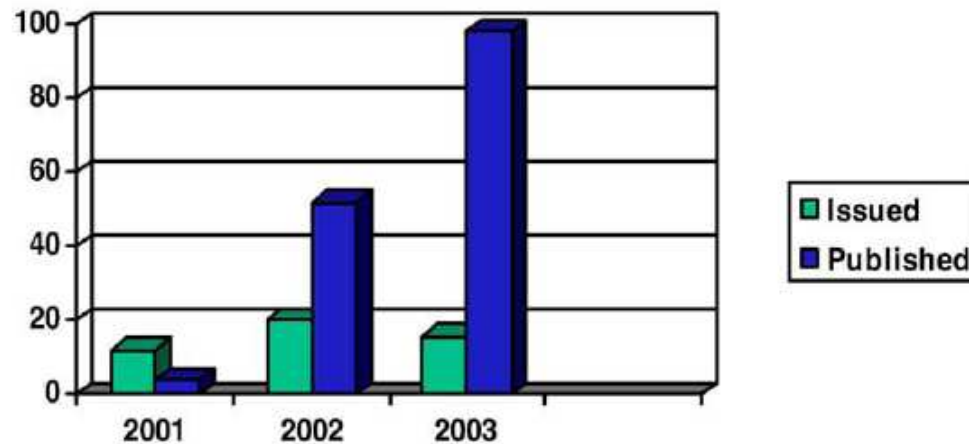


## US Patent Filings on Dendrimers (Courtesy of Dr. Steve Rutt, Foley & Lardner LLP)



Year

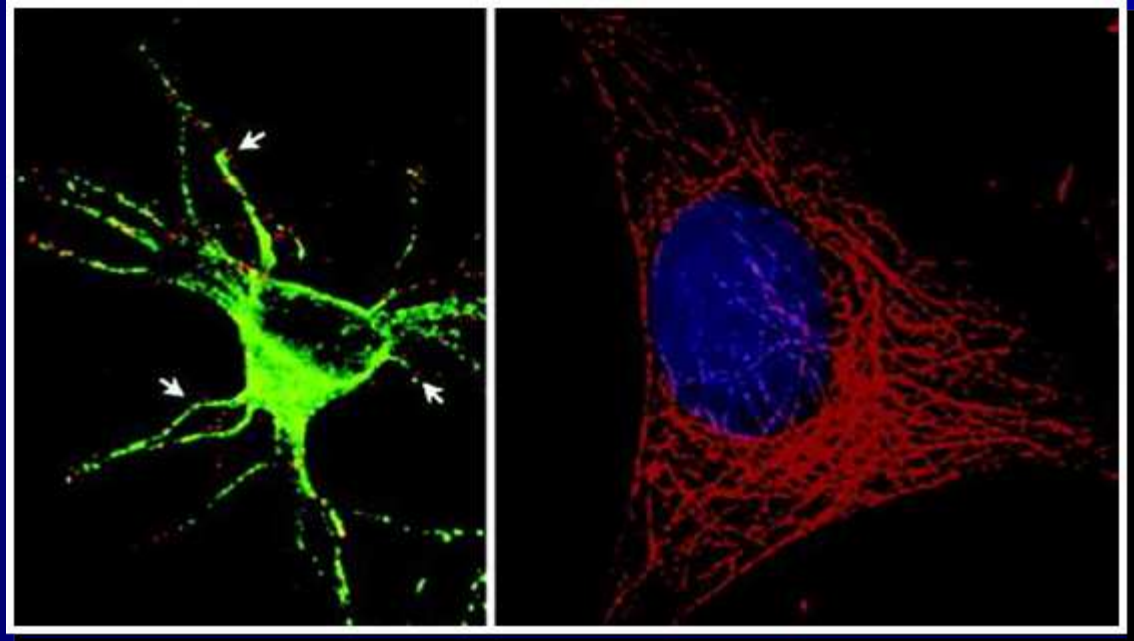
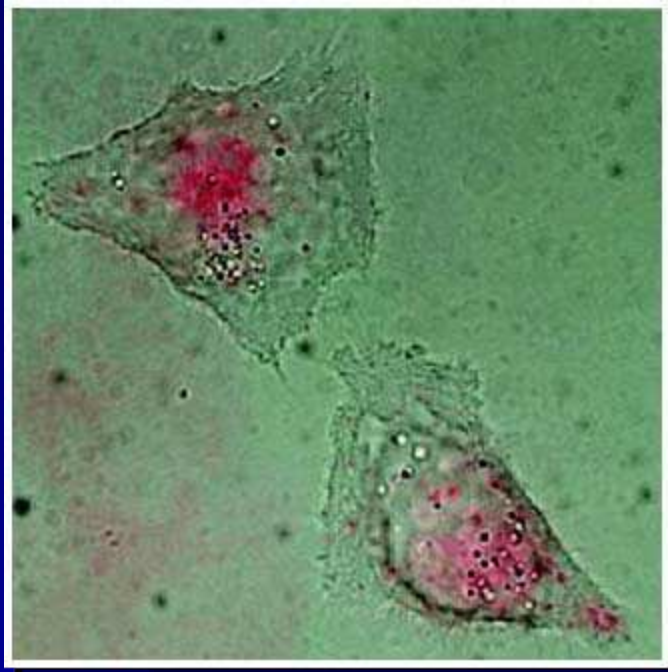
## US Patents and Published Applications Containing the Word "nanowire"



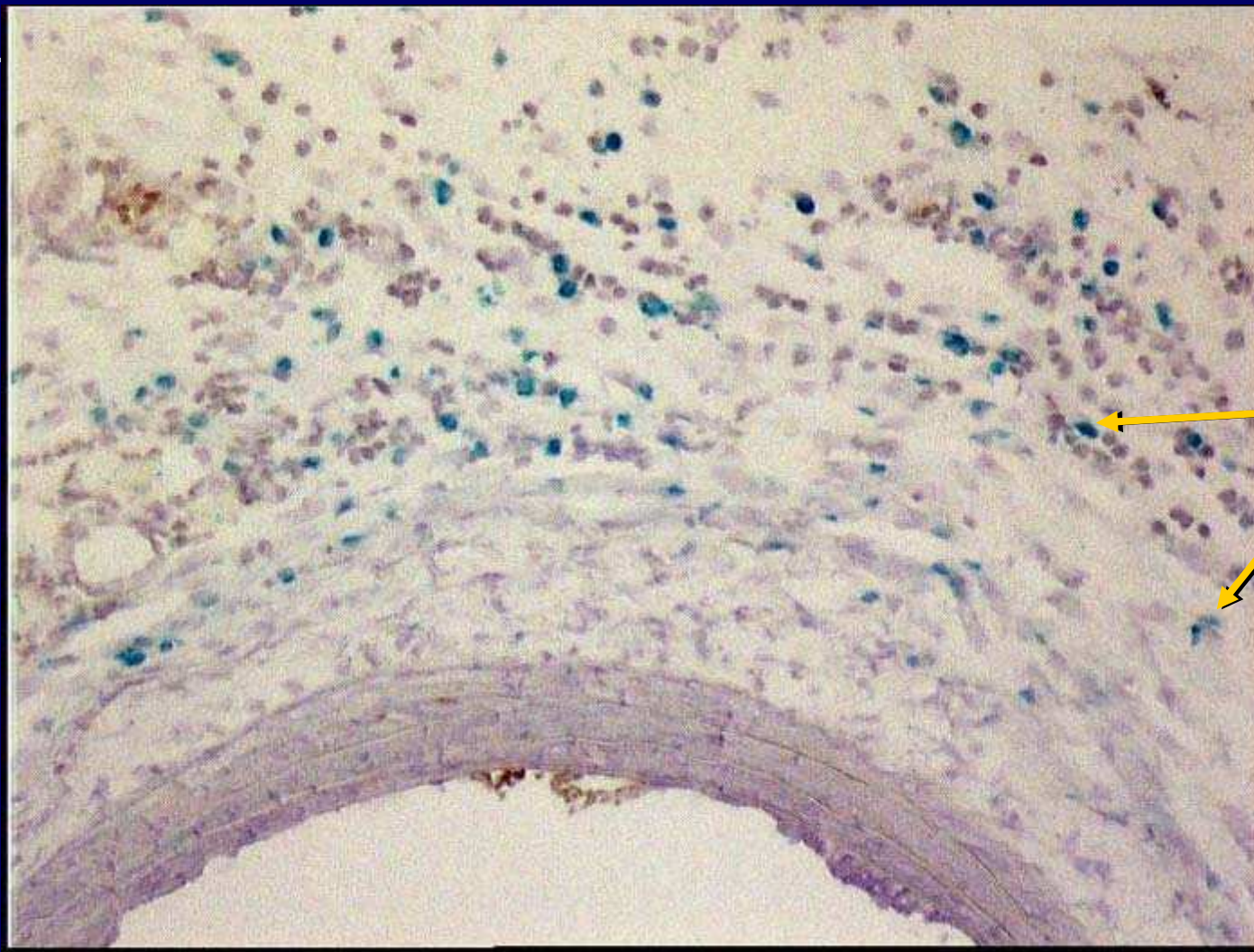
# Преимущества предлагаемых наномолекулярных биосенсоров

- Генетически кодируются и способны к самосборке внутри живой клетки
- Обладают высокой чувствительностью и специфичностью узнающего элемента – сенсорного белка
- Могут быть направлены в различные компартменты живой клетки (митохондрии, ядро, комплекс Гольджи, плазматическая мембрана и др.)
- Универсальны в использовании: могут быть использованы для проведения анализов *in vitro* или *in vivo*, пригодны для создания трансгенных животных и линий клеток со стабильной экспрессией биосенсора для проведения скрининга потенциальных лекарственных препаратов

# Мечение живых клеток и визуализация внутриклеточных структур с помощью квантовых точек



# Трансфекция стенки сосуда с помощью комплексов плазмидной ДНК $\beta$ -Gal в составе наночастиц



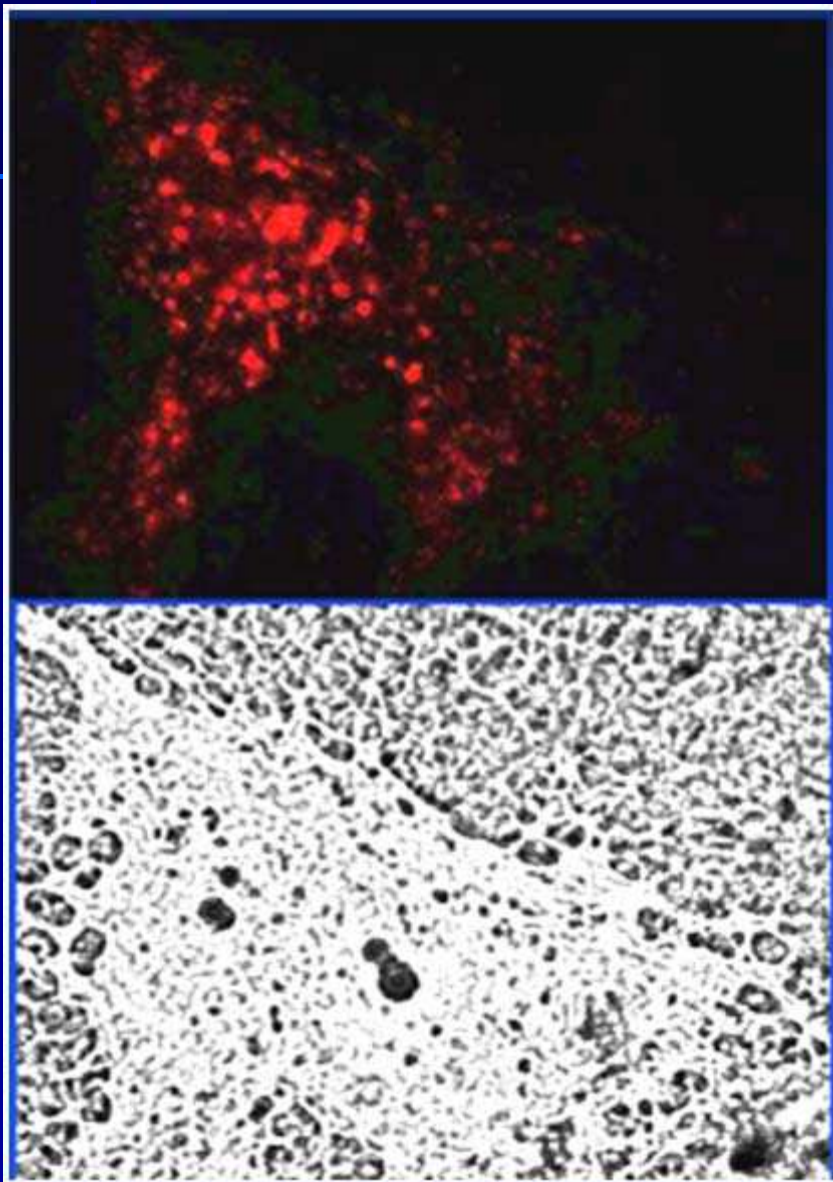


# Регистрация уровня вторичных мессенджеров и активности протеинкиназ

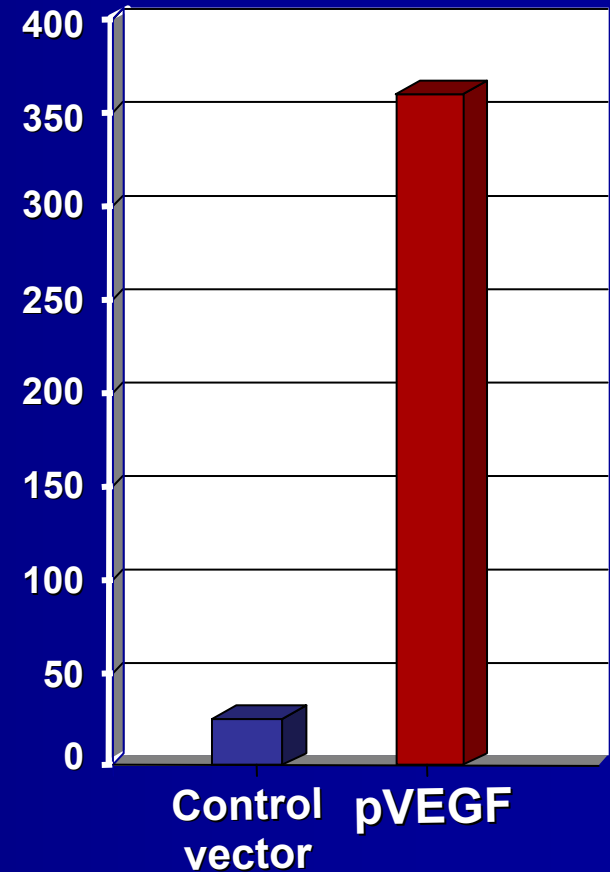
- Для изучения процессов передачи внутриклеточных сигналов и их нарушений
- Для создания систем скрининга лекарственных препаратов
- Для развития новых методов диагностики системных заболеваний человека



# Стволовые клетки концентрируются в перинфарктной зоне миокарда

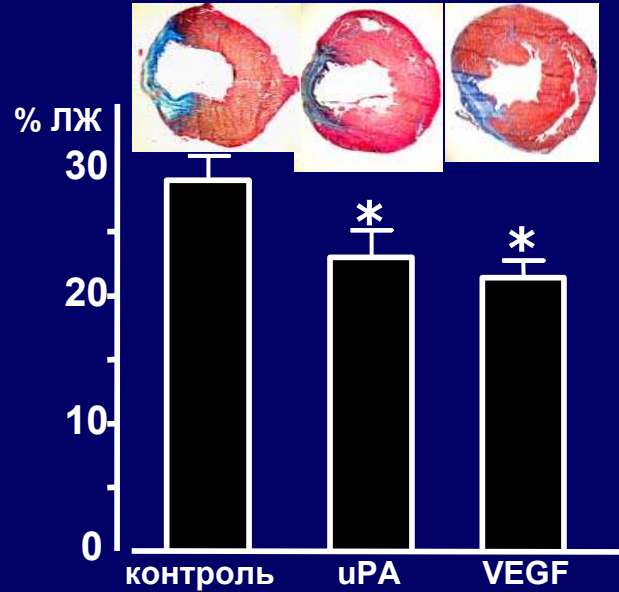


Секреция VEGF  
трансфицированными  
СТВОЛОВЫМИ клетками  
[VEGF], нг/мл

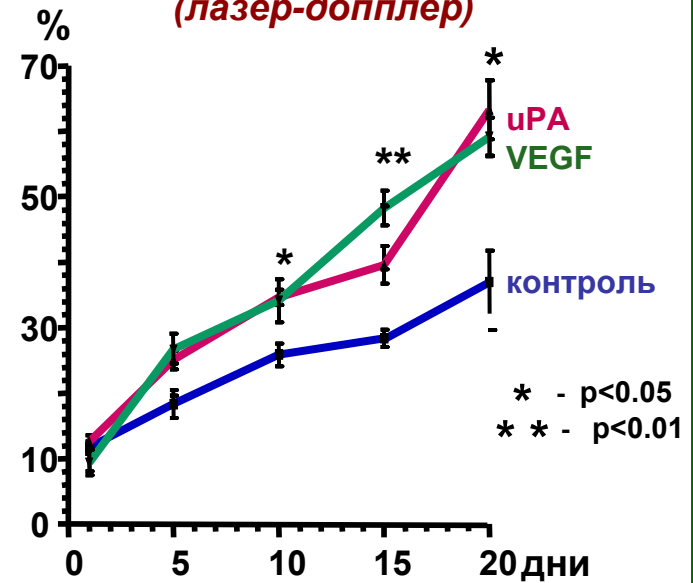


# Введение плазмиды с геном урокиназы стимулирует ангиогенез в ишемизированном сердце и конечности

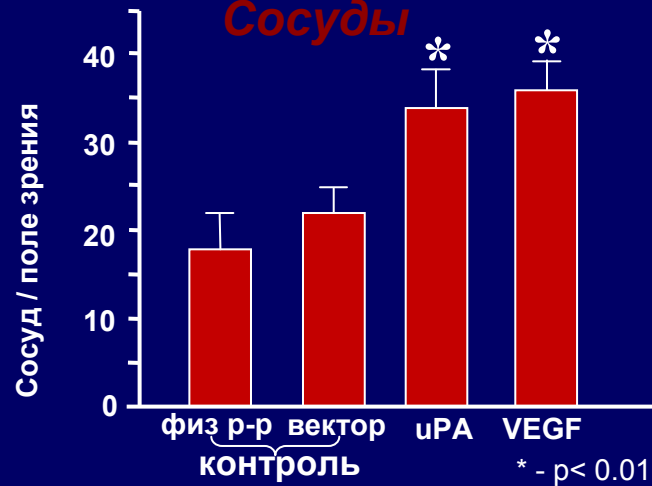
## Размер инфаркта



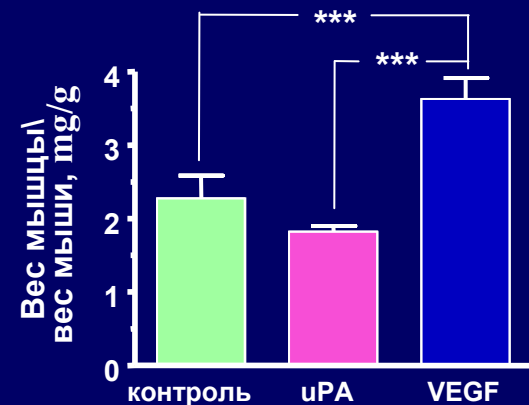
## Перфузия конечности (лазер-доплер)



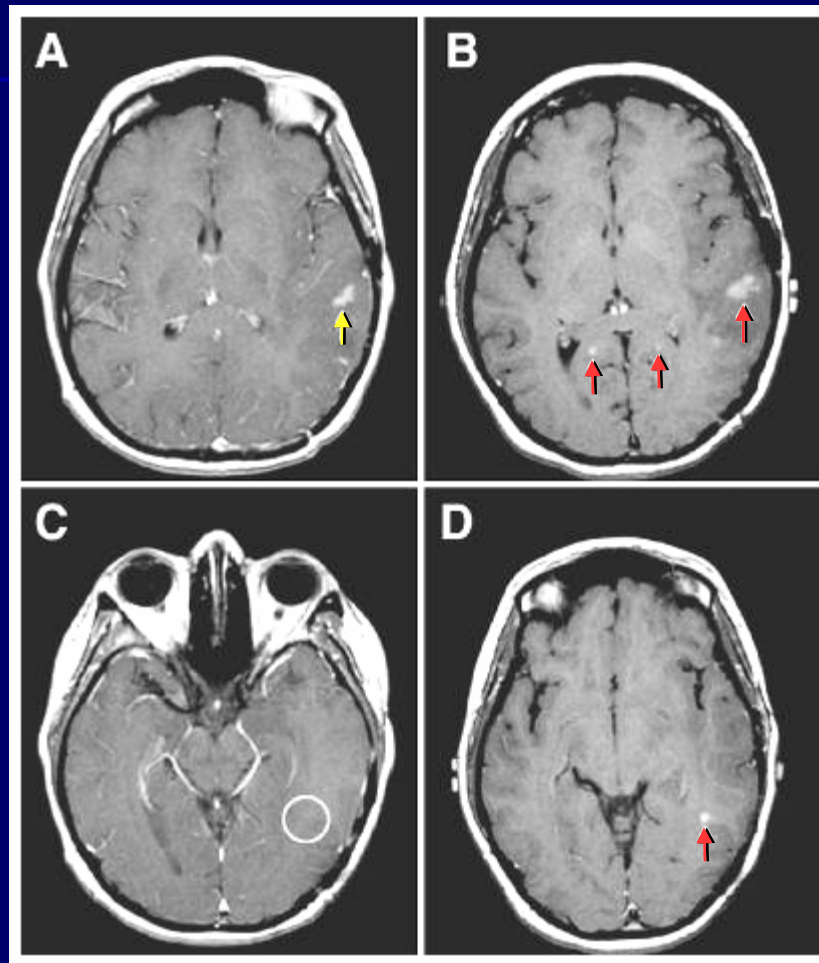
## Сосуды



## Развитие отека



# Повышение чувствительности контрастной магнитно-резонансной томографии с помощью суперпарамагнитных наночастиц оксида железа



Контрастирование  
гадолинием

Контрастирование  
наночастицами

*Neuwelt EA et al,  
Neuropathol Appl Neurobiol  
30:456–471, 2004.*