



Наноинженерные лекарства: новые биомедицинские инициативы в фармакологии

Н.Н.Каркищенко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Установлено, что наноинженерные вещества, созданные на основе фуллерен- C_{60} -полифторидов (фуллеренилы), с общей формулой $C_{60}F_nR_n$ влияют на регуляторные процессы, снижая спектры мощности электрической активности мозга в Δ -, θ -диапазонах, и достоверно повышая их в σ -, β - и γ -диапазонах, соответственно изменяя паттерн когерентности между различными зонами мозга. Изменение поведенческих реакций крыс WAG/GY под влиянием $C_{60}F_nR_n$ было характерно для анксиолитического и ноотропного действия. Показано, что фуллеренилы взаимодействуют с трансмембранными GPCR-рецепторами, преодолевают гематоэнцефалический барьер путем эндоцитоза, а их транслокация в нейронах и клетках астроглии мозга осуществляется через CURL-систему. Поиск наногеномных и нанопротеомных путей альтернативного моделирования должен оптимизироваться выбором гетерогенных и генномодифицированных животных. Дается новый взгляд на оценку кинетических параметров нановеществ и построение моделей на основе функций Байеса, аксиоматики Колмогорова и метода Монте-Карло. Разработана технологическая платформа поиска наноинженерных прототипов новых высокоэффективных лекарств.

Ключевые слова: наноинженерия, транслокация наночастиц, фуллерены, GPCR-рецепторы, наноэндоцитоз, CURL-системы, нанокинетика, аксиоматика и метод Монте-Карло, технологическая платформа для оценки нановеществ.

Развитие нанотехнологий и создание наноматериалов основывается на прогрессе фундаментальной науки, направленном на повышение качества жизни населения, состояния среды обитания, обеспечение экономического роста, обороны и безопасности страны. В утвержденных в 2002 году Президентом Российской Федерации «Основах политики Российской Федерации в области развития науки и технологий на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу» [8] нанотехнологические проекты относятся к стратегическим национальным приоритетам страны.

Нанобиология и наномедицина являются наиболее активно развиваемыми направлениями наноиндустрии. В настоящее время в ряду зарегистрированных и выпускаемых в мире около 2000 наименований наноинженерных материалов, лишь несколько десятков субстанций с размерностью менее 100 нм находят возможное применение в медицине для лечения онкологических, сосудистых, инфекционных, психических заболеваний и диагностики. Такой разрыв связан с отсутствием единой технологической платформы оценки нановеществ как перспективных лекарств. Необходима выра-

ботка критериальных подходов к оценке наноинженерных веществ в стандартах GLP, GCP, GMP.

Это ставит перед фармакологией как новые задачи, так и новые ориентиры методологического, методического и организационного характера при оценке будущих лекарств, созданных с помощью наноинженерных технологий. Проводимые нами исследования и данные отечественных и зарубежных источников дают основание поставить вопрос о необходимости разработки единой технологической платформы междисциплинарных биомедицинских исследований с целью конструирования и валидации новых наноинженерных соединений как инновационных лекарственных средств.

К основным понятиям, используемым в этой статье, относятся:

Наночастицы – высокодисперсные частицы, геометрические размеры которых хотя бы в одном измерении не превышают 100 нм, с заданной структурой и свойствами, пригодными для контроля и манипуляций на атомном уровне.

Наноэффективность – количественные показатели наличия биологической активности нановеществ, имеющие терапевтическое, профилактическое или диагностическое значение.

Нанорегуляторные системы – структурно-функциональные биомиметики для наночастиц, обеспечивающие управляющие и регулирующие воздействия на процессы физиологических и нарушенных функций организма.

Нановещества, нанопрепараты – биологически активные или фармакологические средства, созданные на основе наноинженерных технологий.

Точки приложения наночастиц и нанорегуляторные системы

Несмотря на бурное развитие работ по созданию наноматериалов, корректные данные об их эффективности и безопасности крайне скудные. Это связано с тем, что подходы к изучению и оценке наноструктур зиждутся на классических методах исследования более высокоразмерных соединений. Кардинальным отличием наноразмерных структур является их огромная удельная поверхность, увеличение химического потенциала на межфазной границе, несопоставимо большая адсорбционная активность и способность к кумуляции. Это приводит к неожиданным изменениям термодинамических характеристик в живых системах, реакционной и каталитической способности, увеличению продукции АФК (активных форм кислорода) и свободных радикалов. В свою очередь, это влияет на течение основных фундаментальных процессов жизнедеятельности, включая перекисное окисление липидов, структурные изменения белков, ДНК, РНК, функционирование генетического аппарата человека и животных [10].

Представляет интерес механизм действия фуллеренов. Считается, что при внутривенном введении в организм фуллерены могут проходить ГЭБ [5, 24, 28] и локализоваться в мозге. Другие авторы исключают проникновение фуллеренов через ГЭБ [27]. Указывается возможность локализации фуллеренов в печени и селезенке, откуда они удаляются в течение долгого времени [24].

Несмотря на большое количество атомов, молекулы фуллеренов компактны. Диаметр молекулы фуллерена C_{60} , представляющей собой сферу, равен

0,714 нм (и это при молекулярной массе 720 дальтон). Молекула фуллерена C_{70} представляет собой эллипсоид длиной 0,780 и толщиной 0,694 нм. Фуллерены C_{60} имеют низкую общую токсичность, от 1200 до 2500 мг/кг [9].

Проведенные нами исследования модифицированных полифторидных фуллеренилов с общей формулой $C_{60}F_nR_n$ (синтез осуществлен, по нашему предложению, А.А.Филипповым, В.Б.Соколовым в РНЦ Курчатовский институт) выявили их широкую биологическую активность [5, 6]. $C_{60}F_{24}$ и другие фторсодержащие фуллеренилы обнаружили необычную и характерную картину достаточно выраженного анксиолитического и ноотропного эффектов. Исследованные нами вещества обнаружили более высокую токсичность (до 500 мг/кг) и достаточно широкий фармакотерапевтический диапазон. Несмотря на различия в фармакологических эффектах отдельных фуллеренилов, в дальнейшем изложении мы будем выделять наиболее общие, характерные для всей группы фторсодержащих фуллеренилов, проявления. В этом случае мы будем обобщенно говорить о всей исследованной нами группе фуллеренилов на основе $C_{60}F_nR_n$, содержащий группы NH_2 , $[FNC_5H_5]^+F^-$, $[FN_2C_4H_4]$ и др. В необходимых случаях будут указываться конкретные соединения на основе C_{60} .

Уже исходя из современных представлений [3, 4] и немногочисленных данных [7, 12, 26], можно полагать, что наночастицы влияют на регуляторные процессы в живых системах и их эффекты, в свою очередь, можно представить и описать в терминологии теории автоматического регулирования на наносистемном уровне (рис. 1).

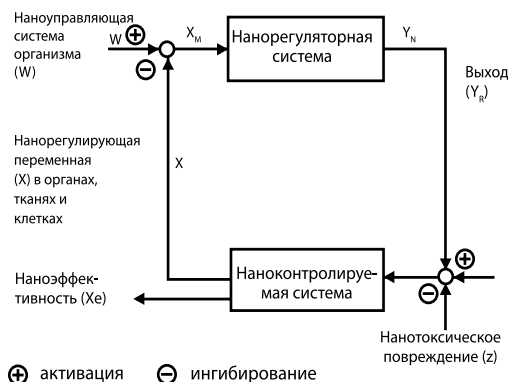


Рис. 1. Контур регулирования и управления в наносистемах организма при моделировании наноэффектов.

Если принять как постулат, что нановещества и наночастицы участвуют в поддержании некоторых физических или химических величин в предварительно определенных границах на наноуровнях живых систем, то регулируемый наномеханизм можно представить в качестве управляемой системы, а механизм, выполняющий регулирование, – соответственно, в виде блока управления или нанорегулятора. Эти две части образуют контур регулирования. Регулируемая величина, т.е. такая величина, которая изменяется при отклонении системы от заданного состояния (например, стационарного), обозначается x . Из схемы видно, что в данном случае представлен контур нанорегулирования с отрицательной обратной связью, в котором выходной сигнал x вычитается из входного сигнала w , при котором искомый эффект равен x_e .

Сигнал ошибки x_w , как разница между действительной x и требуемой w величиной, должен быть как можно меньшим, либо равным нулю. Требуемое значение регулируемой величины задается системе наноправления посредством управ-

ляющей величины w . Отсюда следует, что $x_w = w \cdot x$. Возможны случайные и непреднамеренные изменения регулируемой величины под воздействием различных *нановозмущений* z . Сигнал управления Y_R – это величина, которая так воздействует на управляемую систему, что обеспечивает минимальное отклонение системы от заданного состояния. Иными словами, мы принимаем априори, что наночастицы и нановещества подобно другим химическим, физическим, биологическим факторам и фармакологическим средствам, включаются в регуляторные процессы, но уже на уровне атомов или иных наноразмерных субстратов живых систем.

Поскольку мы пока не располагаем надежным инструментом для прямой оценки влияния наночастиц на системы управления наноразмерного уровня, возможно изучение этих процессов косвенными методами. В своих исследованиях мы воспользовались электрофизиологическими методами изучения электрической активности мозга (ЭАМ) с помощью системы «Энцефалан-131-03» и последующей компьютерной обработкой после введения модифицированных фуллеренов – фторсодержащих фуллеренилов $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, $C_{60}F(NO_2)$ и др.

Электроды располагали в восьми симметричных точках обоих полушарий мозга крыс WAG/GY (подробнее см. статью [6]). Спектральную мощность электрической активности мозга (СМ ЭАМ) анализировали с помощью пакета программ MatLab-5 в диапазонах частот: дельта (Δ) – 1-4 Гц, тета (θ) – 4.25-8 Гц, сигма (σ) – 8.25-13 Гц, бета (β) – 13.25-30 Гц, гамма (γ) – 30.25-45 Гц. Эпоха анализа составляла 4 с. Изменения СМ ЭАМ при действии фуллерена для каждого опыта

нормировались к фоновым значениям, достоверность отличий между выборками для одного опыта по каждому отведению, в каждом диапазоне оценивали по критерию Вилкоксона-Манна-Уитни (как для двух независимых выборок), для группы опытов – по критерию Стьюдента. Принимали во внимание только достоверные изменения СМ ЭАМ ($p < 0,05$). Характерные изменения СМ ЭАМ при введении фуллеренов $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$ заключались в снижении мощности в Δ - и θ -диапазонах, в σ -, β - и γ -диапазонах отмечалось достоверное повышение мощности, а при действии фуллеренила $C_{60}F(NO_2)$ повышение затрагивало и θ -диапазон. Изменения в большинстве случаев были однонаправлены в каждом диапазоне [6].

Паттерн когерентных связей при действии фуллеренилов $C_{60}F_nR_n$ у разных крыс разный, однако общим является снижение когерентности в Δ -диапазоне между различными областями мозга после введения $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, часто это изменение представлено генерализованно по всей коре (рис. 2).

Как известно, СМ ЭАМ и параметры когерентности отображают достаточно тонкие механизмы интрацентральных регуляторных процессов головного мозга [4]. Другим подтверждением влияния нановеществ на регуляторные системы мозга является изменение или модификация поведения. Исследование системных поведенческих реакций фуллеренилов $C_{60}F_nR_n$, как правило, хорошо дополняет результаты электрофизиологических экспериментов. Поведенческие реакции крыс WAG/GY исследовались нами с помощью автоматизированных компьютерных систем Laboras и Sonotrack (Нидерланды), позволяющим на основе

леренов C_{60} средств ноотропного и анксиолитического действия, а при соответствующей модификации их молекул ожидать создания психотропных средств с антидепрессивными и психостимулирующими эффектами. Однако расшифровка принципов деятельности нанорегуляторных систем может открыть самые неожиданные горизонты фармакопсихологии, например, воздействие на волевые функции, мгновенного внесения в память человека больших объемов информации.

Влияние нановеществ на поведение клеток через GPCR-рецепторы

Большое и широкое семейство генов в царстве грибов, растений и животных, обеспечившее появление GPCR (*G-protein coupled receptors*), привело к делению общей структуры на 7 трансмембранных сегментов, с минимальной последовательностью подобию наиболее удаленным GPCR. Семейство белков GPCR в геноме человека более чем представительно (около 900 членов), а рецепторы и лиганды играют роль во многих аспектах физиологии, фармакологии и имеют отношение к большому числу заболеваний (в ряду примерно 200 GPCR) через изучение его роли в геноме, лиганде, рецепторе. Около 2000 GPCR и несвязанных мембранных протеинов в качестве контроля разделены на 36 кластеров.

Роль рецепторов системы GPCR изучалась на биомоделях генетически модифицированных *нокаутных мышах* [2]. Первым геном, подвергнутому нокауту, был ген рецептора A_{2A} . Изучение таких мышей показало, что рецептор A_{2A} играет роль в проведении болевого сигнала

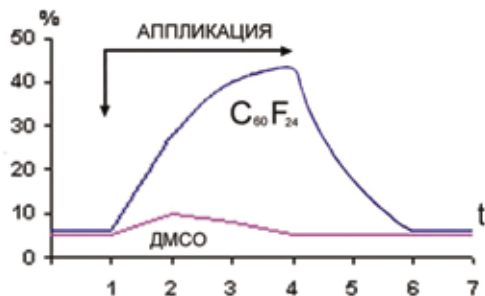


Рис.3. Взаимодействие фуллеренила $C_{60}F_{24}$ с аденозиновым рецептором A_3 системы GPCR. Аппликация $C_{60}F_{24}$ (верхняя кривая) производилась в ДМСО (нижняя кривая, контроль)

через периферические участки, ингибировании агрегации тромбоцитов и регуляции кровяного давления. Рецептор A_{2A} также важен для моторной стимуляции эффектов кофеина. Также было показано, что рецептор A_{2A} вносит свой вклад в ишемические повреждения мозга у взрослых мышей.

Совместно с лабораторией ЦКП «Биовест» ФЦМО нами исследовано влияние фуллеренилов на их способность связываться с аденозиновыми рецепторами A_1 и A_2 , взаимодействующими с различными G-белками. Было также проверено взаимодействие фуллеренила $C_{60}F_{24}$ с рецептором A_3 , взаимодействующим с $G_{i/o}$ -белком (рис.3). Полученные результаты демонстрируют способность GPCR-рецепторов распознавать лиганд фуллеренила и активировать G-белки. Эти предварительные данные иллюстрируют способность нановеществ взаимодействовать с универсальными рецепторными системами мембранных белков. Воспользовавшись удобной схемой взаимодействия лигандов с GPCR-рецепторами [15], мы можем представить механизм влияния фуллеренилов на



Рис. 4. GPCR осуществляют блокировку сообщения в клетку, пока нановещества (фуллерены) или сигнальные молекулы (гормон, нейромедиатор и т.д.) не обволакиваются активной зоной и образуют сайт.

трансмембранные процессы следующим образом (рис.4 и 5).

Многосторонность системы GPCR значительно превосходит любой другой класс поверхностно-клеточных рецепторов. Природные молекулы, на которые есть отклик GPCR имеют размер от нейротрансмиттеров, которые только в несколько раз больше атома углерода, до протеинов, которые в 75 раз больше него. GPCR участвует во всех функциях организма, которые поддерживают жизнь, от биения сердца и пищеварения до дыхания и активности мозга. Можем предположить, что фуллерены и иные нановещества, как и другие лиганды, способны запускать внутренний каскад регуляторных механизмов поведения клетки (рис.5)

Новые взгляды на функционирование GPCR предполагает появление новых подходов к лечению болезней. Трансмембранные белки представляют собой одну из самых больших групп белков, выполняющих сигнальную, транспортную, защитную, рецепторную, метаболическую и структурную функции (рис. 3, 4) [15]. Несмотря на универсальность структуры GPCR унитарностью к ним обладает великое множество существующих



Рис. 5. Лиганд-рецепторное обволакивание нановеществ (фуллеренов) может обеспечивать активацию молекулы G-протеина, которая переключает серию внутримолекулярных взаимодействий и изменяет поведение клетки.

и, надо думать, будущих лекарств. Полученные нами данные позволяют считать, что модифицированные фуллерены имеют все основания стать прототипом будущих инновационных лекарств, действующих на клеточные структуры через GPCR-рецепторы и аналогичные трансмембранные системы.

Внутриклеточная транслокация наночастиц в мозге

Вне всякого сомнения мозг является органом-мишенью для наночастиц и нановеществ [5, 6]. Попадать они туда могут путем пассивной и активной диффузии, а наноагломераты – путем эндоцитоза. Нами проведены электронно-микроскопические исследования фуллеренилов $C_{60}F_{24}$ и получены данные, подтверждающие общие механизмы транслокации ксенобиотиков в мозг. Фуллеренилы $C_{60}F_{24}$ вводились крысам WAG/GY интраперитонеально в дозе 20-30 мг/кг или интракостерно в дозе 6-7 нмоль.

Процесс транслокации наночастиц-лигандов в нервную клетку начинался с того, что они взаимодействовали с

рецепторами на нейролемме. Этот вид эндоцитозного поглощения, или опосредованный рецепторами эндоцитоз, отличается по количественным и качественным показателям от эндоцитоза молекул, лишенных сродства к плазматической мембране, и поглощение происходит в соответствии с принципом градиента концентрации (объемный или жидкофазный эндоцитоз) [4, 13] и модуляции транспортных белков (Р-гликопротеид) [16]. Вслед за *первым этапом* взаимодействия, когда происходит связывание наночастиц со специфическими рецепторами на клеточной поверхности, комплексы лигандов образуют на плазмолемме скопления (или кластеры), располагающиеся в местах окаймленных углублений (coated pits).

Окаймление на внутренней поверхности мембраны обеспечивает фибриллярный белок – *клатрин*. Проникновение фуллеренилов $C_{60}F_{24}$ в места окаймленных углублений сопровождалось инвагинацией в нейрон во время эндоцитоза (рис. 6). В результате образовывались окаймленные пузырьки – своеобразные *везикулярные контейнеры* – носители нановеществ (рис. 6). По мере продвижения в цитоплазму нейрона они теряли клатриновую оболочку и сливались друг с другом или везикулами иного типа, образуя более крупные пузырьки с гладкой поверхностью в виде *эндосом* или *рецепторосом*. В этом процессе мы не наблюдали никаких особых отличий от действия других, более высокоразмерных молекул [4].

Данные о судьбе рецепторов и лигандов ранее удалось установить методом электронно-микроскопического анализа. В опытах с двойной меткой гепатоцитов наночастицами золота неодинакового

размера при инкубации срезов сначала с антителами против лиганда (гликопротеид с терминальной галактозой), а затем с антителами против соответствующего рецептора оказалось возможным идентифицировать везикулярно-тубулярную систему CURL (Compartment of uncoupling of receptor and ligand) [4, 17, 29]. По-видимому, именно там происходят диссоциация рецептора и лиганда, а также их перераспределение, в результате чего *лиганды* сосредотачиваются в *везикулярной* части CURL, а *рецепторы* – в *тубулярном* отделе. Везикулярный фрагмент CURL с лигандом оказывается объектом агрессии лизосом и встроенных в них ферментов, а тубулярный участок, нагруженный рецепторами, ампутируется от системы CURL, и, таким образом, рецепторы, избежав протеолиза, *возвращаются* на поверхность клетки. Сходная по направленности реакция описана нами в отношении ряда психотропных средств и ксенобиотиков [4].

Как и для других веществ, кинетика связывания фуллеренила $C_{60}F_{24}$ с рецептором и механизмы передачи сигнала жестко не детерминированы и в соответствии с общими закономерностями биологических процессов могут проходить по альтернативному (запасному) пути.

С помощью электронномикроскопических исследований нами визуализирована способность наночастиц к прямому взаимодействию с нейронами (рис. 7). Внутривенное введение их в обход ГЭБ позволяет обеспечить возможность прямого контакта наночастиц с соответствующими рецепторами на нейрональной плазмолемме, о чем можно судить по наличию многочисленных окаймленных везикул. Транснейронный перенос наночастиц (судя по реакции усиления

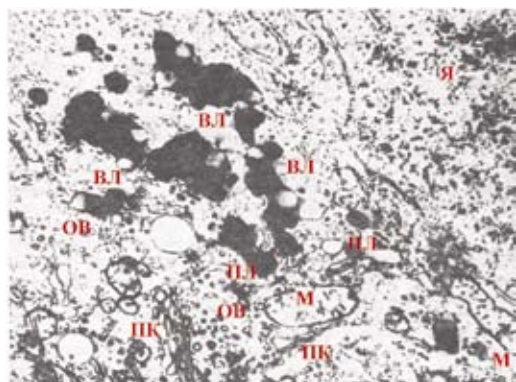


Рис. 6. Увеличение количества окаймленных везикул, сочетающееся с активацией аппарата протеолиза под влиянием фуллеренила $C_{60}F_{24}$ в дозе 25 мг/кг, введенного интраперитонеально. Обозначения: ОВ – окаймленные везикулы, ПЛ – первичные лизосомы, ВЛ – вторичные лизосомы, ПК – пластинчатый комплекс, М – митохондрии, Я – ядро. Ув. 32 000.

специфического эндоцитоза) отчетливо заметен в большинстве изученных образований, включая кору головного мозга.

Процесс эндоцитоза фуллеренов складывается из ряда последовательных этапов: *кластеризации* комплекса нановещество-рецептор, *интернализации* комплексов с образованием окаймленных везикул, *диссоциации* лигандов и разрушения их в лизосомах или мультивезикулярных тельцах, *рециклирования* рецепторов. Внутринейрональная сортировка лигандов-рецепторов осуществляется в особых везикулярно-тубулярных компартментах, являющихся производными пластинчатого комплекса (рис.6, 7). Все эти процессы более наглядно представлены на рис. 8.

Нами обнаружено, что наночастицы $C_{60}F_{24}$ взаимодействуют не только с нейронами, но и с астроцитами, что может быть связано с наличием неких, пока неизвестных рецепторов на клетках астроглии. Дальнейшая судьба везикул-

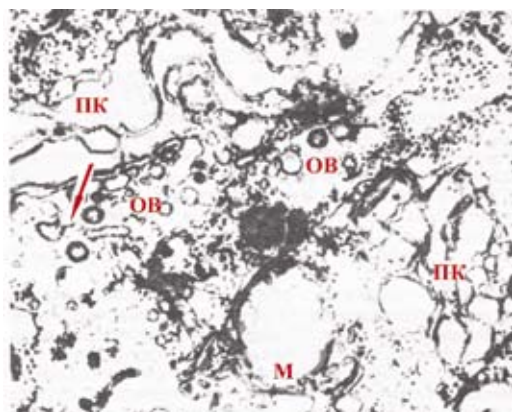


Рис. 7. Влияние интрацистерального введения 6,8 нмоль фуллеренила $C_{60}F_{24}$ на пластинчатый комплекс клеток головного мозга, в котором наблюдается разобщение (стрелка) окаймленной части CURL, носителя лиганда и тубулярного фрагмента – рециклирующего рецептора. Обозначения те же, что и на рис. 5. Ув. 40 000.

контейнеров, нагруженных наночастицами и для нейронов, и для астроглии одинакова: деградация содержимого осуществляется в лизосомах (*основной путь*) или мультивезикулярных тельцах (*хелперный*, или вспомогательный путь). Не вдаваясь глубоко в анализ механизмов взаимодействия наночастиц с субклеточными структурами, следует заключить, что транслокация фуллеренилов $C_{60}F_nR_n$ в головном мозге обеспечивается не только при интрацистеральным, но и при системном их введении.

Геномика, протеомика и иные «наномики»

Молекулярная белковая машина взаимосвязана с информационной структурой гена. Белковые «карты» биосистем организма, анализ экспрессии генома на уровне мРНК, геномный анализ клеточных популяций и продолжающаяся «инвентаризация» тканевых белков создали

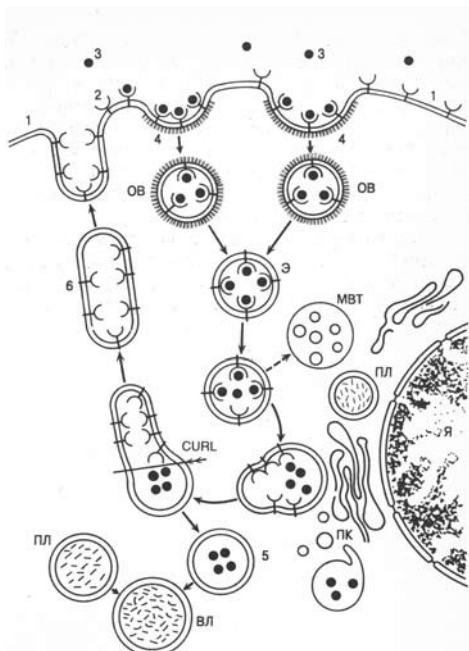


Рис. 8. Гипотетическая схема взаимодействия нановещества-лиганда и рецептора. 1 – плазмолемма нейрона; 2 – рецептор; 3 – наночастица-лиганд (фуллерен); 4 – окаймленное углубление; 5 – везикулярная часть системы CURL; 6 – тубулярная часть системы CURL. Сплошная стрелка – альтернативный путь взаимодействия лиганда с участием мультивезикулярного тельца (MBT); двойная стрелка – место разделения на везикулярную и тубулярную части в системе CURL. Обозначения: ОВ – окаймленные везикулы; Я – ядро; ПЛ – первичная лизосома; ВЛ – вторичная лизосома; ПК – пластинчатый комплекс; CURL – место разделения рецептора и лиганда; Э – эндосома.

предпосылки нового научного направления – *нанопротеомики*. Это следующий за геномикой и протеомикой этап развития биомедицинских технологий для изучения и оценки нанобезопасности и нанозффективности.

Используемые в настоящее время для оценки наноматериалов на животных-моделях биомаркеры были получены несколько десятилетий назад. Необходи-

димо срочно искать более оптимальные варианты. Существует множество новых техник, обещающих лучшие результаты. Они включают разного рода «омики» (геномика, протеомика, экспрессиономика, метаболомика, гистомика, целломика), также как поведенческие профили, телеметрия и улучшенные методы представлений. Эти техники часто дорогие и затратны по времени. Их можно применять в небольших экспериментах, в которых используют генетически однородных животных. Они также нуждаются в валидации в различных лабораториях. Их нельзя применять на аутбредных животных, тем более для оценки нановеществ. Необходимо использование гетерогенных и генномодифицированных животных.

Многообразные химические, белковые, пептидные и иммунные комплексы участвуют в регуляции активности клетки и имеют способность откликаться на сигнал, который в других ситуациях они игнорировали. Индивидуальные протеины имеют свои программы в специфических генах, но эти комбинации рецепторов не всегда соответствуют простым программам поведения, на основе которых оно могло бы быть предсказано. Поэтому они должны быть рассмотрены как продукт «фантома» генов.

Метаболические, физиологические и патофизиологические взаимодействия весьма гибкие, а значит, действие наноматериалов зависит от столь тонких и сложных условий на уровне белка, что только прямой и всесторонний анализ переноса природных протеинов обеспечит перспективы достоверного и соответствующего скрининга и контроля.

Огромные и динамически сложные протеиновые изоформы могут быть ре-

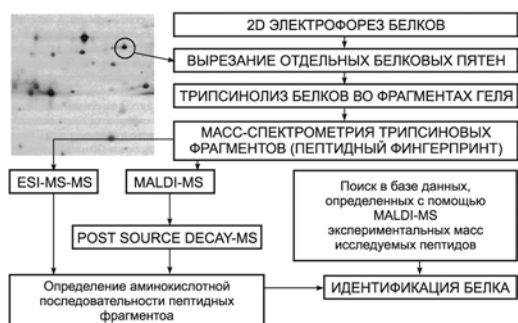


Рис 9. Возможности и последовательность проведения протеомного анализа, в том числе в целях поиска мишеней для оценки безопасности и эффективности нановеществ и нанопрепаратов [по 1].

ально уменьшены до нескольких ключевых *суррогатных биомаркеров* с адекватным количественным и дифференциальным анализом протеиновых объектов [25]. 2D-PAGE обеспечивает лишь качественную технику анализа объектов, а точную информацию о молекулах можно получить с помощью автоматической масс-спектрометрии.

Аналитическая база биомоделирования на основе клеточно-картируемой протеомики включает в себя самые современные методы и подходы [1], представленные на рис 9.

Это открывает перспективы для всестороннего понимания молекулярного уровня действия наночастиц или нанолекарств, или их составляющих в действии. Это повысит качество и скорость данных, полученных из моделей *in vitro*, например, моделей стволовых клеточных культур человека. Эти модели могут быть использованы для создания оптимально соответствующих и быстрых «рецепторов протеиновых изоформ» для условий цитотоксичности, относительной клеточной полиферации и скрининга нановеществ.

Доминанты нанокинетики и нанодинамики

Правомерность терминов, вынесенных в подзаголовок, можно легко оспорить. Действительно, пока нет достаточных данных, чтобы говорить об общих принципах фармакокинетики или токсикокинетики наноинженерных веществ, равно, как и об их фармако- и токсикодинамике. Но стоит вспомнить, что термины «фармакокинетика» и «фармакодинамика», известные теперь каждому покупателю аптечных лекарств, полстолетия назад употреблялись лишь самыми «продвинутыми» специалистами-фармакологами.

Наноразмерные вещества не являются чем-то абсолютно неожиданным для живых систем. Наночастицы в виде космической и вулканической пыли существовали всегда. Просто поток инженерно-созданных наночастиц будет оказывать большее давление на биосубстраты, менять баланс метаболических систем, что потребует изучения новых механизмов жизнедеятельности, а, возможно, и кардинальных изменений наших представлений об интимных процессах квантово-механического уровня.

Уникальная адсорбционная, реакционная, каталитическая активность наночастиц, их большая удельная поверхность и, соответственно, огромный химический потенциал на межфазной границе, заставляют по-новому взглянуть на структурные параметры функционирования нанокинетических мишеней. Важнейшей доминантой для нанокинетики и нанодинамики является познание интегративных процессов, таких как нахождение функции *дозы* и *времени* и установление связи между *концентра-*

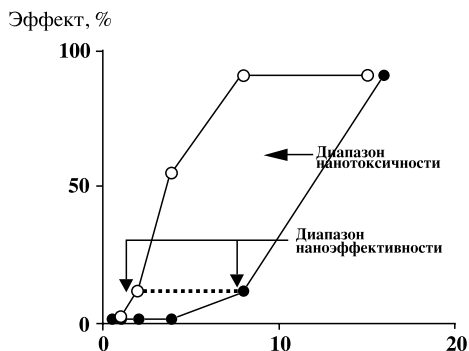


Рис. 10. Теоретическое представление связи концентрация – эффект, определяющая динамический диапазон эффективности для нановеществ от начального действия до токсического проявления. По оси абсцисс: концентрация наносубстанции в плазме крови (выраженная в безразмерных единицах); по оси ординат: процент наблюдаемых эффектов у испытуемых людей или животных. Левая кривая отображает нанодинамические, а правая – нанотоксические эффекты.

цией и эффектом, оптимизации отбора проб. На рис. 10 представлена теоретическая схема соотношения наноэффективности и нанотоксичности для веществ от начального действия до развертывания токсических проявлений.

Обратимся вновь к примеру фуллеренов. Липофильная природа фуллерена C_{60} предопределяет его локализацию и участие в функционировании неполярных мембранных структур, в переносе различных веществ через мембрану [18, 20]. Фуллерены взаимодействуют с противоionsами, образуя прочные комплексы, что может объяснить некоторые «загадочные» функции аргинин-богатых пептидов и белков (cell penetrating peptides, CPP) в мембранах [22]. Подобные механизмы вносят существенное отличие в сорбционные и метаболические процессы наночастиц, в сравнении с классическими лекарствами и ксенобио-

тиками.

Интересно, что для самого фуллерена найден новый, ранее неизвестный путь метаболизма, не связанный с обычными окислительно-восстановительными реакциями. Было показано, что сам фуллерен C_{60} подвергается биотрансформации не только в печени, но и в других тканях организма. Более того, метаболизм фуллерена *in vivo* может протекать не по обычным механизмам окисления ксенобиотиков, но и по реакции Дильса–Альдера [9]. Поэтому построение функциональных кинетических моделей для наночастиц требует учета целого ряда новых факторов (рис. 11).

Для тех наночастиц, которые с легкостью проникают через различные мембранные барьеры, быстрое нарастание концентраций может происходить в разных органах, а элиминация осуществляться не одним каким-то предпочтительным путем, например, ренальным, а неравномерно, но сразу по разным путям экскреции: кожа, легкие, печень, почки (рис. 11).

Ткани, в которых будет наблюдаться быстрое и преимущественное нарастание концентрации наночастиц, называют хорошо перфузируемыми или центральными. Ткани, не входящие в центральную камеру, обычно объединяются в одну, две и т.д. дополнительные камеры, которые называются *периферическими*. При построении кинетических моделей для классических лекарств и ксенобиотиков эти камеры называют *медленно перфузируемыми*, так как максимальные концентрации препаратов в них наступают гораздо позже, чем в центральной камере. Когда график зависимости концентрации препарата от времени имеет двухфазный характер, организм рассма-

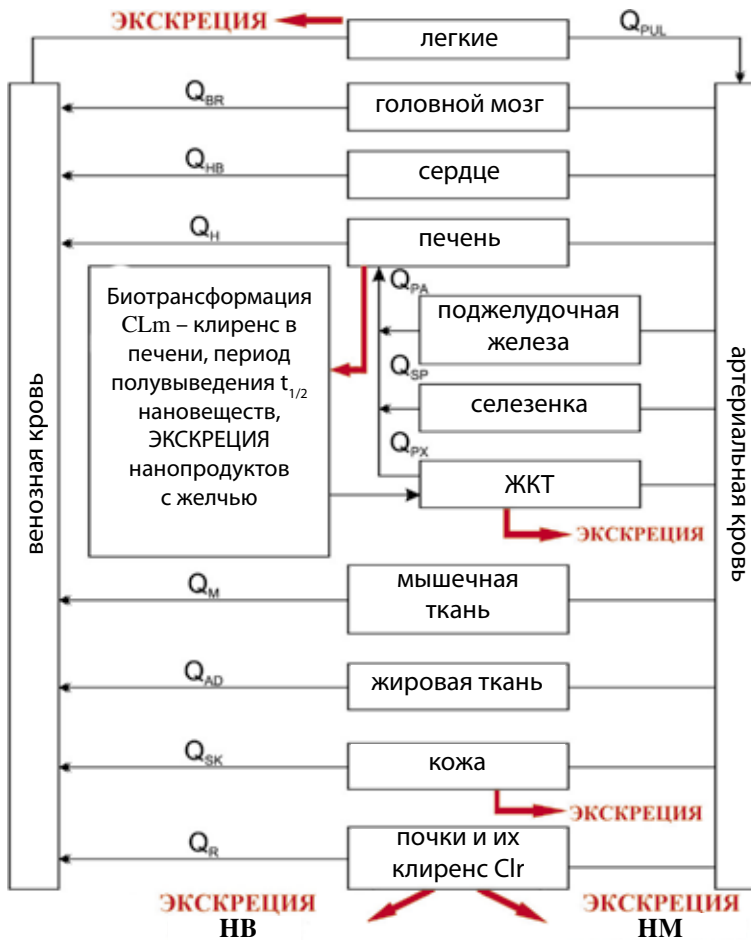


Рис. 11. Теоретическая блок-схема структурно-параметрической функциональной модели для оценки кинетики нановеществ (НВ) и нанометаболитов (НМ).

тривается как *двухкамерная система*, состоящая из центральной и периферической камер. Для наночастиц роль центральных камер теоретически может принадлежать трем, четырем, пяти и т.д. органам. В этом случае математическое моделирование кинетических процессов может быть чрезвычайно громоздким и малопродуктивным.

Биологический эффект (E) воздействия наносубстанций на организм в простейшем случае можно описать

функцией одного параметра – введенной в организм дозы (D):

$$E = f(D) \quad (1)$$

Многочисленность органов-мишеней для наночастиц, их биодоступности (F), разнообразий в рецепторике, константах скоростей поглощения, распределения, метаболизма и выведения (k_i), от объема распределения препарата (V_d), позволяет представить уравнение (1) в виде:

$$E = f(D, t, F, V_d, k_i) \quad (2)$$

Символы в правой части выражения говорят о существовании сложных взаимоотношений между фармакодинамическими и фармакокинетическими параметрами при создании моделей

действия нановеществ. Установить связь между ними – значит получить возможность анализировать или даже регулировать выраженность эффекта, изменяя тот или иной параметр.

Мультикомпарментное моделирование для одновременного описания нанокинетики и нанодинамики новых веществ позволяет соотнести наноэффективность с нанокинетикой:



Рис. 12. Теоретическое представление связи концентрации и фармакодинамических эффектов нановеществ, получившее название «гистерезиса».

$$E = \frac{E_{\max} \cdot C}{EC_{50\%} + C} \quad (3)$$

где $E_{\max}$ — максимальное значение эффекта при полном насыщении рецепторов, $EC_{50\%}$ — концентрация вещества в эффекторном компартменте модели, вызывающая 50% эффекта от $E_{\max}$.

Такие зависимости широко используются в других областях биомоделирования в биомедицине, но в нашем случае они предсказывают максимальный эффект, который может вызвать нановещество, т.к. при его отсутствии величина эффекта равна нулю.

Вследствие этого эффект нановеществ будет измеряться в условиях *нестационарного состояния* (неустановившегося равновесия между содержанием препарата в плазме крови и тканях, в которых вещество оказывает свое действие). Отставание между достижением максимальной концентрации в плазме крови и тканях (C_p) от момента наступления максимального эффекта созда-

ет зависимость, имеющую вид петли гистерезиса (рис. 12).

Подобная форма графика (рис.12) говорит о том, что многочисленные рецепторы, которые обуславливают развитие эффекта, расположены не в плазме крови, а в самых различных областях организма, которые окажутся целевыми органами или целевыми тканями для нанопрепаратов. Формализация концепции гистерезиса позволяет наполнить новым смыслом понятия *эффекторной камеры* и *компартамента* и перейти к непараметрическому фармако моделированию или использовать непараметрические методы моделирования для наночастиц и нанопрепаратов [3].

Фармакокинетику двухкамерной фармакокинетической системы удобно проиллюстрировать на примере модели, состоящей из двух частей. Если внутривенное введение представляет собой быстрое заполнение первой камеры (k_{12}), то начинает заполняться и вторая камера (k_{21}), до тех пор, пока концентрации в обеих камерах не сравняются. Кинетика распределения в двухкамерной фармакокинетической системе характеризуется тремя константами скоростей: константой скорости элиминации из центральной камеры (k_e) и константами скоростей распределения (k_{12} и k_{21}). Изменения концентраций в центральной (C_1) и периферической (C_2) камерах модели описываются следующим уравнением:

$$C_1^1 = A_1 \cdot e^{-a} + A_2 \cdot e^{-b} \quad (4)$$

В многокамерной же фармакокинетической модели элиминация исходного вещества и каждого из его метаболитов также может иметь моноэкспоненциальный характер, но только если их рас-

смагивать каждый в отдельности. Как представлено на рис. 11 экскреция нановеществ может осуществляться одновременно разными путями (легкие, печень, кожа, почки, ЖКТ), каждый из которых можно рассмотреть как однокомпарментную модель, хотя это и весьма условное допущение. Однако при объединении этих однокамерных звеньев система приобретает новые свойства, анализ которых позволяет выяснить ряд закономерностей, связанных с использованием линейных многокамерных фармакокинетических моделей для изучения метаболизма нановеществ. Математически это достаточно громоздкий и трудоемкий процесс, Поэтому необходим поиск новых подходов компьютерного моделирования, формализованной аксиоматики, критериев Колмогорова, метода Монте-Карло и иных нестандартных принципов математического моделирования.

Проблемы развития нанотехнологии ставят вопросы, на которые потребуются незамедлительные ответы. В их числе: пути поступления наночастиц в организм, их транспорт, биотрансформация, деградация и депонирование, элиминация, инактивация, рецепторные и иные механизмы действия, динамические характеристики в различных органах-мишенях. Наконец, связь динамических и кинетических процессов.

Исследования кинетики и динамики нановеществ только начинаются. Методы прямого измерения концентрации для большинства наночастиц отсутствуют. О нанокинетике фуллеренов C_{60} можно судить лишь по косвенным данным, согласно которым, например, после однократной ингаляции, эффекты повышенного ПОЛ наблюдались в течение по крайней мере трех месяцев [23]. Связано

ли это с введением собственно наночастиц еще предстоит выяснить. Поэтому методы, приведенные выше, имеют на сегодняшний день ряд методологических ограничений.

С практической точки зрения протоколы исследования нанокинетики имеют малую гибкость, поскольку требуют измерения концентраций в строго определенные моменты времени. Метод, использующий теорему Байеса и оценку максимального правдоподобия (см. формулу 5 полной вероятности Байеса) позволит определить наиболее вероятный набор нанокинетических параметров.

$$P(X_i / H_i) = \frac{F_i(H_L)}{\sum_{l=1}^N F_i(H_L)} \quad (5)$$

где N – число диапазонов разбиения;
 $F_i(H_L)$ – частота встречаемости отклонения X_i в первом диапазоне;
 H_L – принадлежность к определенному классу нановеществ вычисляется по формуле:

$$P(A_L) = \sum_{i=1}^N P(H_i) \times P(A_L / H_L) \quad (6)$$

где $P(H_i)$ – вероятность гипотезы H_i ,
 $P(A_L / H_i)$ – условная вероятность события A_L по этой гипотезе.

Вероятность события A_L (принадлежность к определенной группе нановеществ) определяется формулой:

$$P(A_L / H_i) = \frac{P(X_i / H_L)}{\sum_{i=1}^N P(X_i / H_L)} \quad (7)$$

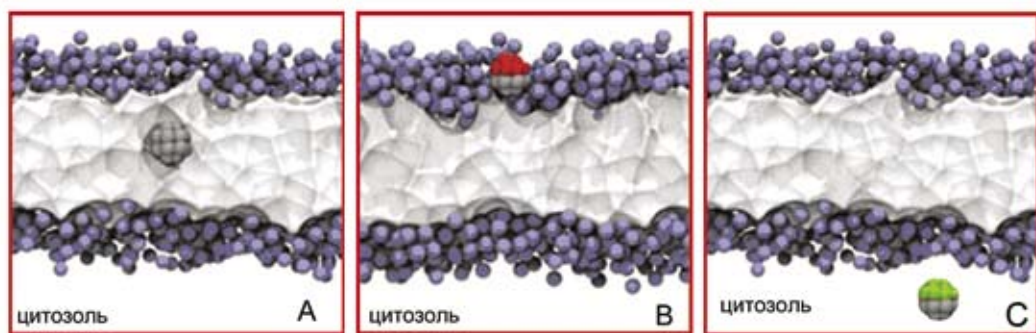


Рис.13. Фуллерен C_{60} «застревает» в гидрофобном участке (А), $C_{60}(OH)_{20}$ остается в гидрослое мембраны (В), а $C_{60}(OH)_{10}$ проникает в цитозоль (С). Схема представлена на основе Оксфордской компьютерной модели (см. текст).

При разработке различных версий Байесовского подхода, нами ранее было показано [3, 4], что вероятностные фармакодинамические и фармакокинетические оценки в значительной степени независимы от вариаций исходных данных. Байесовские оценки параметров C_0 , C_L , V_d , k_e , k_a и т.д. вычисляются с помощью таких процедур, как Simplex или иных математических и компьютерных приемов и программ.

Компьютерные модели, аксиоматика и метод Монте-Карло

Широко применяемые для оценки результативности и токсичности лекарств методы компьютерного моделирования оптимизируются не только в направлении нанобезопасности [5], но приложимы и к изучению эффективности нановеществ. Примером компьютерного моделирования на основе сравнения термодинамических возможностей преодоления мембранных структур модифицированными молекулами фуллерена C_{60} , может служить работа биохимиков Оксфордского университета [NanoWeek 16-22. 03. 2009, №. 59]. Эта виртуальная

модель дает красивую иллюстрацию полученным нами и другими авторами экспериментальным данным (рис.13).

На рис. 13 показаны различия транслокации фуллеренов. Так, если простой фуллерен C_{60} хорошо проникает через наружный слой, но задерживается в середине мембраны (рис.13А), а $C_{60}(OH)_{20}$ ввиду своей гидрофильности остается в наружном водном слое (рис.13В), то $C_{60}(OH)_{10}$ преодолевает мембранный «сэндвич» и достигает цитозольного пространства (рис.13С). Подобные компьютерные модели расширяют возможности моделирования эффектов и тропности нановеществ к рецепторам и органеллам клеток, позволяют прогнозировать пути направленного транспорта и транслокации лекарств, созданных на базе нанотехнологий и прогнозировать их фармакодинамические и фармакокинетические профили.

Тем не менее нанотехнологические инициативы требуют поиска и использования новых математических подходов и методов математического моделирования. Методологические основы современной математической науки, начало которой положили Н.Бурбаки, определя-

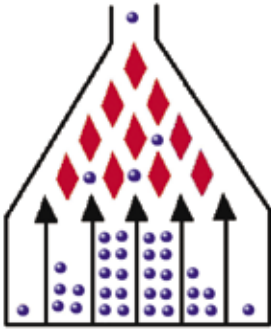


Рис. 14. Доска Гамильтона как пример вероятностного распределения значений в биологическом эксперименте по исследованию эффектов нановеществ.

ют не столько саму математику, сколько *объекты*, которые она исследует. Это направление, получившее название *формализованной аксиоматики*, возникло на основе аксиоматики Евклида, но отличается точным знанием *правил вывода*, использованием *языка символов и формул*, заменой содержательных рассуждений преобразованиями *формул и числений*.

Представлениям о формально-логических системах, как абстрактных аксиоматических теориях и разрешениям задач *непротиворечивости, полноты и независимости* системы аксиом, мы обязаны Д.Гильберту и А.Н.Колмогорову. Работы А.Н.Колмогорова обосновали и разрешили вопросы сопоставления статистических данных с вероятностной теорией явлений. Согласно критерию А.Н.Колмогорова сходимость ряда

$$\sum \sigma_k^2 k^2$$

является достаточным условием для того, чтобы усиленный закон больших чисел был применим к последовательности взаимно независимых случайных величин X_k .

На основе теории вероятностей и посылок о вероятностной природе на-

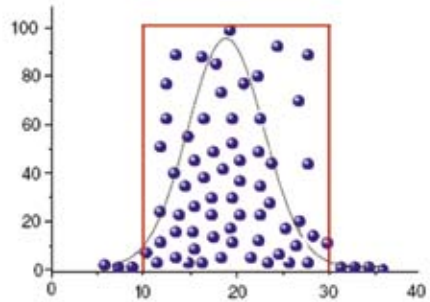


Рис. 15. Пример численного интегрирования функции Гаусса методом Монте-Карло. Точками обозначены мгновенные значения биомедицинских параметров при оценке эффектов нановеществ. На осях абсцисс и ординат условные единицы.

нотехнологических явлений, являющихся аксиоматичными по самой сути своей природы, возможно продвижение на основе аксиоматики Колмогорова по пути имитационного моделирования методом Монте-Карло. Сложная форма поведения биологических систем пока не позволяет описать их строгими математическими формулами, тогда как суть моделирования методом Монте-Карло заключается в проведении определенного числа случайных испытаний и экспериментов для оценки поведения каждого компонента биосистемы на уровне нанопроцессов с участием или под влиянием наночастиц, нановеществ или нанопрепаратов.

Механистическим примером биологических испытаний нановеществ может являться «доска Гамильтона» (рис.14). Вбрасываемые шарики распределяются случайным образом и при достаточной выборке подчиняются гауссову, или нормальному, распределению. В сущности то же происходит при любом солидном биомедицинском исследовании в силу стохастичности большинства биологи-

ческих процессов и вероятности распределения откликов биосистем на воздействие наночастиц и нановеществ. В литературе можно найти сотни примеров, подтверждающих аксиоматичность и вероятность реагирования живых систем [3, 4].

Не вдаваясь в детали использования метода Монте-Карло для анализа и оценок нанобиотехнологических экспериментов и их результатов, отметим, что стохастический алгоритм интегрирования методом Монте-Карло заключается в случае многих (N) биомедицинских измерений в ограничении n -мерным параллелепипедом (рис. 15), площадь которого S_n включает в себя все многообразие экспериментальных данных. В этом случае построение искомой модели методом Монте-Карло осуществляется по формуле $S = S_n(K/N)$, где K – число экспериментальных точек под графиком функции. Метод Монте-Карло приложим к анализу сложных биологических систем или явлений, когда иные математические приемы слишком громоздки и трудоемки. Для метода Монте-Карло имеется хорошо разработанный математический аппарат и качественный продукт для компьютерной обработки.

Заключение

Стремительное развитие наноинженерных технологий сопровождается явным отставанием нанобиотехнологических исследований. Необходима разработка единой технологической платформы междисциплинарных экспериментов с наноинженерными веществами в биологических, доклинических и клинических исследованиях (рис. 16).

Учитывая мировые биоэтические

тенденции по сокращению использования лабораторных животных, необходимо искать адекватные альтернативы при исследовании наноинженерных веществ и материалов. С одной стороны это определяется тем, что в марте 2009 г. тестирование определенных химических средств на животных было запрещено Европейским Союзом. Запрещение касается проверки острой токсичности, повреждений кожи, повреждений глаз и мутагенности [11]. Тесты на токсичность с повторяющимися дозами, включая чувствительность кожи, будут запрещены с марта 2013 г. [11]. С другой стороны, тенденции к ограничению широкомасштабного использования животных-моделей, а также уникальные свойства нановеществ заставляют проявлять новые биомедицинские инициативы на путях альтернативного моделирования. Наряду с *in vitro*-моделями изучение новых фармакологических свойств нановеществ и наночастиц диктует необходимость разработки специальных методов оценки их эффективности на основе наногеномных, нанотранскриптомных и нанопротеомных технологий.

Иррациональность полного отказа от исследования на животных очевидно даже для начинающих профессионалов. Ряд высококомпетентных авторов [14, 19] выдвинули гипотезу, что нет ни одного подхода, не использующего животных для получения всеобъемлющей информации об эффективности и безопасности веществ. Существует множество форм для достижения этих целей. Для оценки потенциальной чувствительности и адекватной оценки барьерных функций (бронхо-легочных, кожных, желудочно-кишечных, гематоэнцефалических и др.) человека, необходимо и возможно



Рис. 16. Технологическая платформа междисциплинарных биомедицинских исследований наночастиц, нановеществ и лекарственных средств, созданных на основе наноинженерных технологий. **Обозначения:** МБМ – мутантные белки-мишени; ADMET – Absorption, Distribution, Metabolism, Extraction and Toxicity; QSAR – Quantitative Structure Activity Relationship; SBDD – Structure-Based Drug Design; МАБП – мембранно-активные белки и пептиды; ГГЖ – гетерогенные животные, КрЖ – крупные животные (мини-свиньи, собаки, обезьяны); ГМЖ – генномодифицированные животные;

изучение химического взаимодействия, пептидного взаимодействия, предрасположения тканевой биоактивности, воспаления тканей, пролиферации Т-клеток и др., но только в сочетании с корректными оценками на животных.

Генетические вариации в отклике на лекарства, ксенобиотики, токсиканты и нановещества у человека идентифицировать трудно, поскольку определение вариаций может опоздать. Целесообразнее анализировать эти вариации на гетерогенных животных, их инбредных, трансгенных и нокаутных линиях, позволяющих определять гены, ответственные за генетический полиморфизм,

а затем смотреть, являются ли эти же гены ответственными за соответствующие отклики у человека на ранних стадиях испытаний. Генетический профиль животных проще чем у человека, а большее количество генов, ответственных за отклик нановеществ может быть легче найден и использован для создания персонализированных лекарств.

Предлагаемая нами технологическая платформа представляет собой замкнутый цикл поиска и оценки эффективности и безопасности нановеществ, как потенциальных инновационных лекарств на путях от их скрининга до мониторинга возможных сайдэффектов в IV фазе

клинических наблюдений (рис.16). Важным элементом техноплатформы является привнесение в традиционную схему изыскания и контроля действия новых лекарств изучения специфических для нановеществ и только им присущих особенностей влияния на термодинамику и жизнедеятельность биосистем, таких как наноэффективность, нанобезопасность, фармакодинамики и фармакокинетики структур наноразмерного уровня.

Другим важным элементом предлагаемой техноплатформы является обязательное мониторингирование эффектов нанолечеств (внеклинические испытания) во всех фазах клинических оценок и применения. Поскольку создается принципиально новый для медицинской практики класс лекарственных средств, резко возрастает роль фармаконадзора не только на этапах разрешения и внедрения таких препаратов, но и на всем протяжении их широкого медицинского применения.

Нановещества не могут быть определены как простой гомогенный класс. Наши исследования фуллерена C_{60} и созданных на его основе фуллеренилов $C_{60}F_nR_n$ показали, что наряду с их общими чертами биологического действия, каждое из наносоединений имеет свой облик фармакологического действия. Общими являются принципы транслокации в клетках на основе единого механизма образования окаймленных везикул и взаимодействия с CURL-системой. Мы обнаружили, что такие нановещества, как фуллеренилы, не только способны преодолевать гематоэнцефалический барьер, но и взаимодействовать с органеллами нейронов и глиальных клеток. Способность фуллеренов взаимодействовать с GPCR-рецепторами позволяет раскрыть

механизм их влияния на мембранные белки и системы транспорта наночастиц в живых системах (рис.16).

Нановещества являются удобными кандидатами для создания фармакологических средств, осуществляющих регуляторные и управляющие воздействия в ЦНС и в исполнительных органах. Способность фуллеренилов $C_{60}F_nR_n$ направленно влиять на интрацентральные процессы головного мозга, изменять спектральные мощности электрической активности мозга и когерентные функции, хорошо подтверждается изменением ими системных поведенческих реакций. Это дает основание думать о фуллеренах не только как об участниках в нанотранспортных процессах лекарственных средств, но и как веществах прямого действия на структуры и процессы головного мозга. На основании собственных данных мы прогнозируем модифицированные фуллерены как возможные средства анксиолитического, ноотропного и других видов психотропного действия.

Важным моментом является изучение и оценка нанокинетических параметров, которые могут быть получены из структуры нановеществ и их квантово-механического взаимодействия с биологическим окружением. Мы не можем вычленить изучение нанокинетики из потенциального порядка действий, включая оценку нанофармакодинамических компонентов и безопасности нановеществ (рис.16). Удобным и оптимальным на данном этапе является использование байесовских функций, поскольку стохастичность конечных эффектов нанотехногенных веществ, связанных с их сорбционными свойствами, распределением, биотрансформацией и элиминацией кар-

динально отличаются от проявлений их большеразмерных аналогов. Математическое и компьютерное моделирование нанобиотехнологических процессов в живых системах на начальных этапах изучения может основываться на аксиоматике Колмогорова и методе Монте-Карло. Хотя поиск адекватных математических моделей должен быть продолжен.

Характеристика влияния созданных через наноинженерные технологии продуктов на здоровье – вопрос, который активно дебатруется и дискутируется. Определение порядка действий для выявления эффектов от нановеществ будет ключевым в понимании данных, полученных в эксперименте для их экстраполяции в отношении человека.

Литература

1. Арчаков А.И. Геномика, протеомика и биоинформатика – науки XXI столетия // *Медицинская кафедра*, № 3, с. 6-13, 2002.
2. Геномика в медицине. – М.: ИКЦ «Академкнига», 2005.
3. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т.1. Основы биомедицины и фармакомоделирования. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
4. Каркищенко Н.Н. Альтернативы биомедицины. Т.2. Классика и альтернативы фармакотоксикологии. – М.: Изд-во ВПК, 2007.
5. Каркищенко Н.Н. Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов // *Биомедицина*, № 1, с. 5-18, 2009.
6. Каркищенко Н.Н., Сахаров Д.С., Филиппов А.А., Соколов В.Б. Спектральная мощность ЭЭГ крыс при интраперитонеальном введении фторсодержащих фуллеренов // *Биомедицина*, № 1, с. 25-30, 2009.
7. Методологические проблемы изучения и оценки био- и нанотехнологий (нановолны, частицы, структуры, процессы, биообъекты) в экологии человека и гигиене окружающей среды / Под ред. Ю.А. Рахманина – М., 2007.
8. Основы политики Российской Федерации в области развития науки и технологий на период до 2010 г. и дальнейшую перспективу // *Поиск*, № 16, 2002.
9. Пиотровский Л.Б., Киселев О.И. Фуллерены в биологии. – СПб: Изд-во Росток, 2006.
10. Сарвилина И.В., Каркищенко В.Н., Горшкова Ю.В. Междисциплинарные исследования в медицине. – М.: Техносфера, 2007.
11. Directive 2003/15/EC of the European Parliament and the Council of 27 February 2003 amending Council Directive 76/768/EEC on the approximation of the laws of the Member States relating to cosmetics products // *Official Journal of the European Union*, L66, 26-35, 2003. 1.
12. FDA's critical path initiative. – Rockville, MD, USA: US food and drug administration // <http://www.fda.gov/oc/initiatives/criticalpath/>.
13. Fujimoto M., Okabayashi T. Functional properties and "Tright turn" connections of clathrin-cjfted endocytic vesicles // *Life Sci*, vol.30, No 1, pp.51-57, 2002.
14. Jowsey I.R. Proactive surveillance of contact allergies: an important component of the risk management strategy for skin sensitizers // *Contact Dermatitis*, 56, 305-310, 2007.
15. Kenakin T.A Pharmacology Primer. – Academic Press [Elsevier], 2006.

16. Kreuter J. Nanoparticulate systems for brain delivery of drugs // *Adv Drug Deliv Rev.*, Mar 23; 47(1):65-81, 2001.
17. Lamaze C., Schmid S.L. The emergence of clathrin-independent pinocytic pathways // *Curr. Opin. Cell Biol.*, vol. 7, pp. 573- 580, 2005.
18. Nishihara M., Perret F., Takeuchi T. et al. Arginine magic with new counterions up the sleeve // *Org. Biomol. Chem.*, vol. 3, pp.1659-1669, 2005.
19. Ormandy E.H., Schuppli C.A., Weary D.M. Worldwide trends in the use of animals in research: the contribution of genetically-modified animal models // *ATLA*, 37, pp. 63-68, 2009.
20. Perret F., Nishihara M., Takeuchi T. et al. Anionic fullerenes, calixarenes, coronenes and pyrenes as activators of oligo/polyarginines in model membranes and live cells // *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 127, pp.1114-1115, 2005.
21. Podolski I.Y., Podlubnaya Z.A., Kosenko E.A. et al. Effects of hydrated forms of C₆₀ fullerene on amyloid 1-peptide fibrillization in vitro and performance of the cognitive task // *J Nanosci Nanotechnol.*, 7(4-5):1479-85, 2007.
22. Sakai N., Matile S. Anion-mediated transfer of polyarginine across liquid and bilayer membranes // *J. Am. Chem. Soc.*, vol. 125, pp.14348-14356, 2003.
23. Sayes C.M., Marchione A.A., Reed K.L., Warheit D.B. Comparative pulmonary toxicity assessments of C₆₀ water suspensions in rats: few differences in fullerene toxicity in vivo in contrast to in vitro profiles // *Nano Lett.*, Aug;7(8):2399-406, 2007.
24. Selvi B.R., Jagadeesan D., Suma B.S. et al. Intrinsically fluorescent carbon nanospheres as a nuclear targeting vector: delivery of membrane-impermeable molecule to modulate gene expression in vivo // *Nano Lett.*, Oct;8(10):3182-8, 2008.
25. Schrattenholz A. Proteomics: how to control highly dynamic patterns of millions of molecules and interpret changes correctly? Drug Discovery Today – Technologies 1, 2004.
26. The innovative medicines initiative research agenda // http://imi.europa.eu/docs/imi-gb-006v2-15022008-research-agenda_en.pdf, 2008.
27. Yamada T., Jung D.Y., Sawada R. et al. Effects intracerebral microinjection and intraperitoneal injection of [60]fullerene on brain functions differ in rats // *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Aug;8(8):3973-80, 2008.
28. Yamago S., Tokuyama H., Nakamura E. et al. In vivo biological behavior of a water-miscible fullerene: 14C labeling, absorption, distribution, excretion and acute toxicity // *Chem. Biol.*, Jun;2(6):385-9, 1995.
29. Yu G.F., Aldrich P.T. Inhibition of coated and non-coated membrane invaginations with translocation to complex Golgi // *New J. Brain Res.*, vol. 8, No. 1-2, pp. 109-112, 2006.

NANOENGINEERING DRUGS: NEW BIOMEDICAL INITIATIVES IN PHARMACOLOGY

N.N.Karkischenko

Scientific center of biomedical technologies RAMS, Moscow

It has been established that nanomatters, which were done on the base on $C_{60}F_nR_n$ polyfluorides influence on regulatory process by reducing of spectral brain capacity in Δ -, θ -diapasons and reliable incrise them in σ -, β - and γ -diapasons, change coherent pattern between different brain zones. Changes in behavior reactions WAG/GY rats under $C_{60}F_nR_n$ was character for anxiolytic and nootropic actions. It was shown that nanomatters interact with transmembrane GPCR-receptor, get over gematoencephalitic barier by endocytosis, and theirs translocation in neurons and astroglia brain cells carry out throw CURL-system. In this article necessity of search of the new nanogenomic, nanoproteomic ways of alternative modeling and optimization of genetically-modified laboratory animals choice is based on facts. There is a new look on estimation of kinetic parameters of nanomatters and nanopharmacokinetic model construction on the base of Bayesian functions, Colmogorov axiomatic and Monte-Carlo method. A combined technological platform destined to identification nanoengineering prototypes of new highly effective drugs.

Key words: nanoparticles translocation, fullerenes, GPCR-receptors, nanoendocytosis, CURL-system, nanokinetic, axiomatic and Monte-Carlo method, technological platform.