

Ю. Н. Морозов¹, Д. В. Чистяков³, А. Ю. Утехина¹, А. А. Астахова³,
Н. П. Гончаров², М. Г. Сергеева³, Г. Б. Сергеев¹

КРИОСИНТЕЗ И СВОЙСТВА НАНОЧАСТИЦ ГОРМОНА ДЕГИДРОЭПИАНДРОСТЕРОНА

¹ Химический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

² ФГБУ Эндокринологический научный центр Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, Россия

³ НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского, МГУ им. М. В. Ломоносова, Москва, Россия

Для получения наночастиц стероидного гормона дегидроэпиандростерона (ДГЭА) использована криохимическая технология, которая позволила преобразовать исходные частицы размером ДГЭА (100 ± 50) мкм в частицы с размером (100 ± 20) нм. Для определения размеров частиц использованы методы оптической, электронной просвечивающей и сканирующей атомно-силовой микроскопии. Применение метода ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием к образцам исходного и модифицированного ДГЭА показало, что при криосинтезе наночастиц не произошло изменение молекулярной структуры гормона. Сравнение цитотоксичности исследуемых образцов на культуре глиальных клеток линии С6 показало, что модифицированный образец ДГЭА имеет меньшую токсичность. Данные указывают на эффективность использования криохимической технологии для получения наночастиц стероидных гормонов.

Ключевые слова: дегидроэпиандростерон; нанотехнология; криосинтез; линия клеток; стероидные гормоны; цитотоксичность.

Дегидроэпиандростерон (ДГЭА, 3-гидрокси-10,13-диметил-1,2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16-додекагидроциклопента[а]фенантрен-17-он) является одним из наиболее распространенных эндогенных стероидов организма человека [1]. Он производится в надпочечниках, половых железах и мозге, где функционирует как метаболический промежуточный продукт в биосинтезе андрогена и эстрогена [2]. Эти свойства позволили предложить ДГЭА в качестве составного элемента пищевых биодобавок [3]. Исследования последнего десятилетия показали наличие собственных эффектов влияния ДГЭА на клетки как лиганда рецепторов плазматической мембраны, так и его участие в регуляции системы врожденного иммунитета и воспалительных процессов [4, 5]. Действие ДГЭА как нейростероида также, видимо, реализуется через собственные биохимические пути этого соединения [5]. Показана корреляция изменений ДГЭА в крови с такими заболеваниями как диабет 2 типа, атеросклероз, а также нейродегенеративные заболевания [4]. Установлено, что уровень ДГЭА снижается с возрастом и связан с различными заболеваниями, возникающими во второй половине жизни человека [6, 7]. Эти данные указывают, что ДГЭА является потенциальным медицинским препаратом многопрофильного действия.

Широкий спектр возможного применения ДГЭА поставил задачу создания его разнообразных лекарственных форм. Важным аспектом применения лекарств, связанных с возрастными и хроническими заболеваниями, является уменьшение используемой концентрации действующего вещества. Одним из подходов является создание лекарственных форм с использованием нанотехнологий. Действительно, полу-

чаемые различными методами наночастицы применяются для проведения диагностики заболеваний [8], пассивной и активной доставки лекарственных средств к больному органу [9]. Показано, что наночастицы лекарственных соединений обладают, по сравнению с исходной субстанцией, новыми физико-химическими свойствами и повышенной терапевтической активностью [10]. Всё это указывает на перспективность применения подходов нанотехнологий к созданию новых форм ДГЭА.

Известно, что применение наночастиц лекарственных веществ в медицине ограничивает недостаточная развитость методов получения стабильных органических наночастиц заданного размера [11]. Нами ранее была разработана специальная технология получения стабильных органических наночастиц методом криосинтеза и показана её эффективность для получения новой наноформы феназепам (7-бром-5-(2-хлорфенил)-2,3-дигидро-1H-1,4-бензодиазепин-2-он) [12]. В данной работе мы использовали эту технологию для синтеза наночастиц ДГЭА, а также провели анализ их размера и цитотоксичности.

Экспериментальная часть

Размерно-структурную модификацию ДГЭА проводили по криохимической технологии, разработанной ранее [13, 14]. Суть технологии заключается в переводе исходной субстанции в газовую фазу в потоке нагретого газа-носителя и резком последующем охлаждении потока, содержащего пары субстанции вблизи охлаждаемой жидким азотом поверхности (рис. 1). В охлажденном потоке происходит пересыщение газовой фазы молекулами ДГЭА, быстрое зародышеобра-

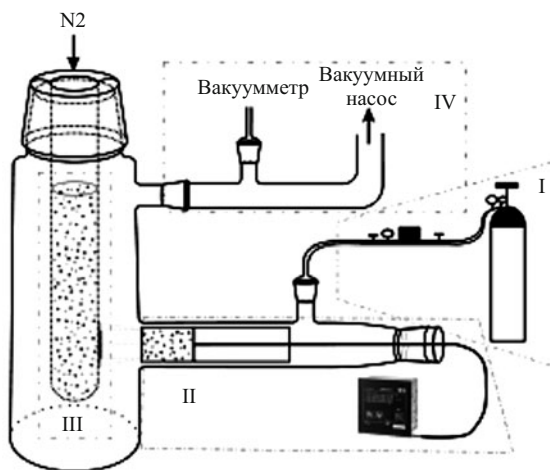


Рис. 1. Схема установки для криохимической модификации органических соединений методом сублимации в потоке газа-носителя, сочетаемого с низкотемпературной конденсацией: I — блок задания потока газа-носителя, II — блок генератора пара с программатором температурного режима, III — блок низкотемпературного конденсора, IV — вакуумный блок.

зование и формирование наночастиц, которые стабилизируются на поверхности, охлаждаемой жидким азотом. Температура сублиматора при криомодификации составляла 120 °С, загрузка исходного препарата 500 мг, время опыта ~180 мин. Выход продукта 70 %. В качестве исходной субстанции использовали препарат фирмы “Schering” Германия.

Измерение размера частиц ДГЭА проводили при помощи оптического микроскопа Olympus BX-41 (Olympus, США). Размер криомодифицированных частиц определяли с использованием электронного просвечивающего микроскопа LEO912AB (Carl Zeiss, Германия) и атомно-силового микроскопа Innova (Bruker, Германия).

Подтверждение молекулярной структуры наночастиц проводили методом ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектором (LC/MS). Режим разделения: колонка Kromasil 100-5 C18; 100 × 2,1 мм. Подвижная фаза метанол — вода, 60:40. Скорость подвижной

фазы 0,4 мл/мин. Объем вводимой пробы 2 мкл. Навеску растворяли в метаноле. Использовали времяпролетный масс-спектрометр Jeol “JMS-T100LP”. Источник ионизации — электрораспыление. Детектирование при 577 m/z (2M+H).

Экспериментальная биологическая часть

В экспериментах исследовали цитотоксические свойства полученного гормона на эукариотических клетках линии С6 с помощью МТТ-теста с использованием микроплащечного фотометра по стандартной методике [15, 16]. Клетки линии С6 крысы культивировали на среде ДМЕМ с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (фирма ПанЭко, Россия) в пластиковых одноразовых флаконах и в 96-луночных планшетах (фирма Nunk, Дания) при 37 °С, в условиях насыщающей влажности в атмосфере с 5 % CO₂. В эксперименте клетки в концентрации 250 тыс/мл сажали в лунку порциями по 200 мкл, через 24 ч исходную ростовую среду заменяли на среду, содержащую исследуемые формы ДГЭА (в концентрации 200, 100, 50, 25 и 10 мкМ), и инкубировали 48 ч. В качестве контроля использовали стауроспорин (10 и 50 нМ), среду без добавления гормонов, среду с добавлением растворителей в объемах, соответствующих объемам растворителей в образцах гормона (по 2 мкл на 100 мкл среды в лунке). За 3 ч до окончания инкубации добавляли по 20 мкл в лунку краситель МТС (CellTiter 96 AQueous ONE, Promega). Оценку результатов теста МТТ проводили путем сопоставления оптической плотности в опытных и контрольных лунках и рассчитывали процент лизиса клеток. Измерение оптической плотности проводили при длине волны 490 нм. Каждый вариант обработки проверяли в 3 биологических повторах.

Результаты и их обсуждение

Для получения наночастиц ДГЭА использовали криосинтез. В предварительных экспериментах были выбраны параметры оптимальных условий криомоди-

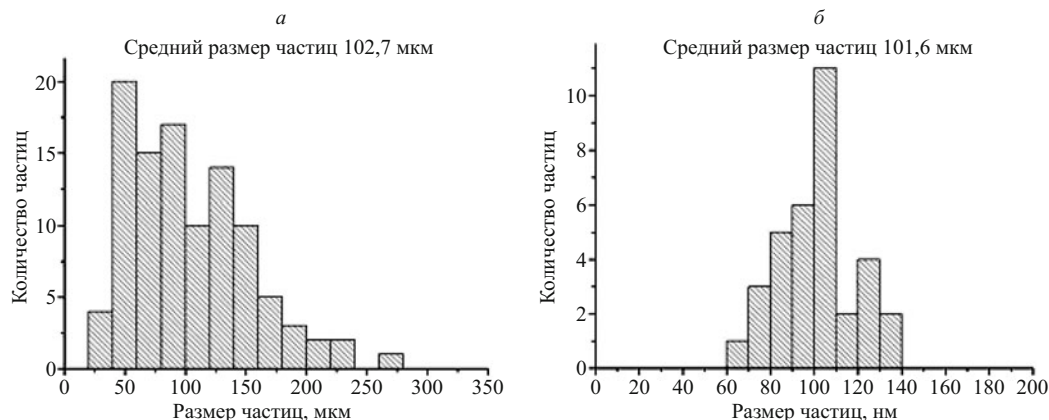


Рис. 2. Гистограммы распределения частиц ДГЭА по размерам: а) исходный препарат, размеры определяли с использованием оптического микроскопа Olympus BX-41; б) криохимически модифицированный препарат; размеры определяли с использованием атомно-силового микроскопа Innova.

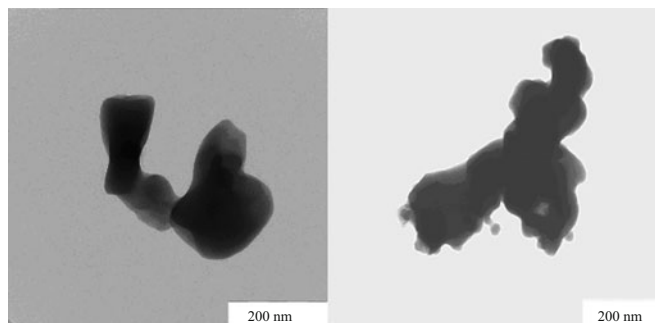


Рис. 3. Микрофотографии образца криохимически модифицированного ДГЭА. Фотографии сделаны на просвечивающем электронном микроскопе при разном увеличении (масштаб изображения указан в нижнем углу фотографии).

фикации. Для определения размеров частиц исходной и криохимически модифицированной субстанций использовали методы микроскопии. Частицы исходного образца хорошо видны в оптическом микроскопе (рис. 2, *a*), что позволяет определять их размер. Криохимически модифицированную субстанцию анализировали с помощью просвечивающего электронного микроскопа (рис. 3). Видно, что размер частиц лежит в наноразмерном диапазоне и не превышает 100 – 200 нм. Более точное определение размера частиц и построение гистограммы их распределения по размерам затруднительно из-за взаимодействия электронного луча с материалом образца. Также разделение образца на индивидуальные частицы затруднено из-за сильного взаимодействия между ними, которое может происходить за счет поверхностной нескомпенсированности водородных связей. Для более точного определения размеров наночастиц использовали сканирующий атомно-силовой микроскоп. Гистограммы распределения частиц ДГЭА по размерам после криосинтеза представлены на рис. 2, *б*. Показано, что средний размер частиц исходного субстрата составляет 102,7 мкм (рис. 2, *a*). Средний размер частиц криохимически модифицированного образца составляет 101,6 нм (рис. 2, *б*). Таким образом в результате криосинтеза получен наноразмерный кристаллический порошок ДГЭА.

Для возможного практического использования наночастиц ДГЭА в медицине необходимо показать, что при криосинтезе наночастиц не изменилась молекулярная структура гормона. Поэтому было проведено сравнительное исследование исходного и криомодифицированного ДГЭА методами ВЭЖХ с масс-спектрометрическим детектированием (рис. 4). Установлено, что по хроматографической подвижности и масс-спектрам субстанции ДГЭА идентичны друг другу.

Для определения цитотоксичности получаемых наночастиц исследовано их влияние на выживаемость клеток линии С6, которые являются моделью глиальных клеток животных. Сравнение исходного и модифицированного образцов в диапазоне концентраций от 0 до 200 мкМ показало, что при действии контрольного образца в концентрации 200 мкМ происходит сни-

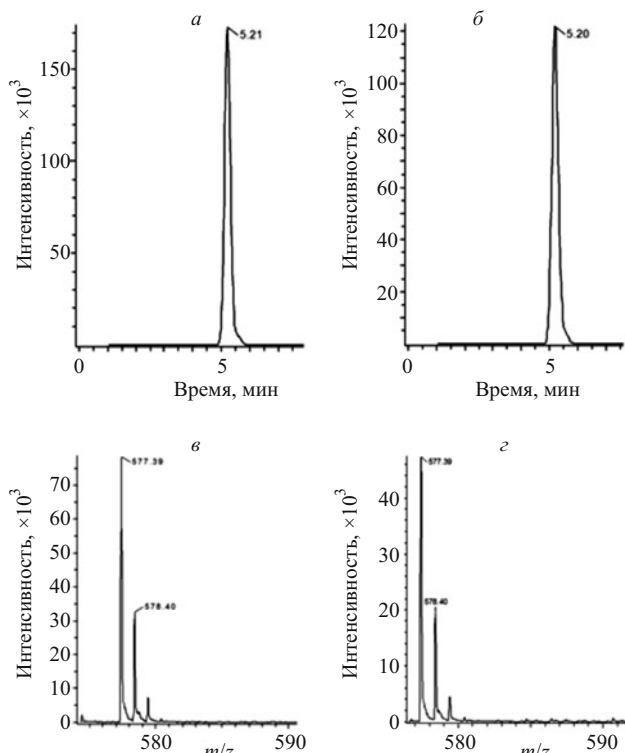


Рис. 4. Хроматограмма и спектрограмма исходного (*a, в*) и модифицированного (*б, г*) ДГЭА.

жение выживаемости клеток на 50 %. При аналогичных концентрациях криомодифицированного образца снижение происходит на 25 % (рис. 5). При концентрации 10, 25, 50 мкМ эффекта снижения выживаемости клеток не наблюдали. Полученные данные указывают, что получаемая наночастица ДГЭА обладает меньшей токсичностью, что делает её перспективной при длительном использовании лекарственных средств на её основе.

Таким образом, методом криосинтеза получены наночастицы ДГЭА, определены их размеры, установлено, что они по молекулярным характеристикам не от-

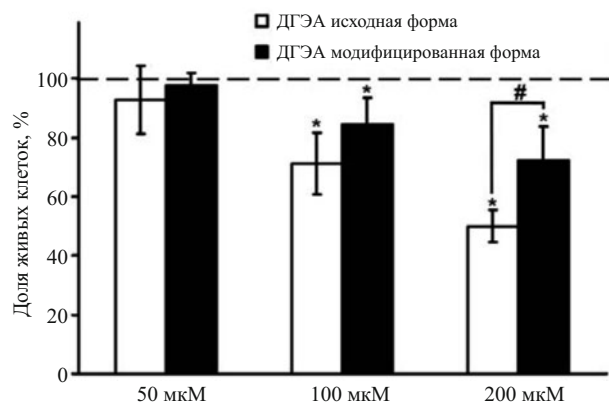


Рис. 5. Влияние 2 форм ДГЭА в концентрациях 50, 100 и 200 мкМ на выживаемость клеток линии С6. За 100 % выбрано количество живых клеток без добавления стимулов. Данные приведены для 3 независимых экспериментов. * $p < 0,05$ по сравнению с выживаемостью необработанных клеток; # $p < 0,05$ по сравнению с выделенными столбцами.

личаются от исходной субстанции, но обладают меньшей цитотоксичностью по отношению к эукариотическим клеткам. Это делает перспективным практическое использование данного препарата в условиях длительного применения.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 15-03-05178.

ЛИТЕРАТУРА

1. F. William, M. D. Ganong, *Review of Medical Physiology*, 22nd ed., McGraw Hill, (2005), p. 362.
2. Н. П. Гончаров, Г. В. Каця, *Гормон здоровья и долголетия*, Адамант, Москва (2012), с. 160.
3. Q. Mo, S. F. Lu, N. G. Simon, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **99**(1), 50 – 58 (2006).
4. G. Zhai, A. Teumer, L. Stolk, et al., *PLoS Genet.*, **7**(4), 1 – 10 (2011).
5. S. J. Webb, T. E. Geoghegan, R. A. Prough, K. K. Miller, *Drug Metabol. Rev.*, **38**(2), 89 – 116 (2006).
6. W. E. Rainey, B. R. Carr, H. Sasano, et al., *Trends Endocrinol. Metab.*, **13**, 234 – 239 (2002).
7. P. Celec and L. Starka, *Physiol. Res.*, **52**, 397 – 407 (2003).
8. В. Е. Боченков, Г. Б. Сергеев, *Успехи химии*, **76**(11), 1084 – 1093 (2007).
9. E. Ruoslahti, S. N. Bhatia, M.J. Sailor, *J. Cell Biol.*, **188**(6), 759 – 768 (2010).
10. Ю. Н. Морозов, А. Ю. Утехина, В. П. Шабатин и др., *Рос. хим. ж.*, **56**(5), 43 – 51 (2012).
11. G. B. Sergeev and K. J. Klabunde, *Nanochemistry*, Elsevir, Amsterdam (2013), p. 360.
12. G. B. Sergeev, B. M. Sergeev, Y. N. Morozov, V. V. Chernyshev, *Acta Crystallography*, **66**, o2623 (2010).
13. Патент РФ 2430094 (2010); *РЖ Химия*, 12.04-190.521П (2011).
14. Патент РФ № 2440120 (2010); *РЖ Химия*, 12.06-190.373П (2012).
15. M. V. Berridge, P. M. Herst, A. S. Tan, *Biotechnol. Annu Rev.*, **11**, 127 – 52 (2005).
16. А. С. Макаренков, С. М. Терехов, Е. А. Калашникова и др., *Цитология*, **9**, 899 – 902 (2003).

Поступила 17.10.14

CRYOSYNTHESIS AND PROPERTIES OF DEHYDROEPIANDROSTERONE HORMONE NANOPARTICLES

Yu. N. Morozov¹, D. V. Chistyakov³, A. Yu. Utekhina¹, A. A. Astakhova³, N. P. Goncharov², M. G. Sergeeva³, and G. B. Sergeev¹

¹ Department of Chemistry, Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

² Endocrinology Research Center, Moscow, 117036 Russia

³ A. N. Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University, Moscow, 119234 Russia

Nanoparticles of dehydroepiandrosterone (DHEA, (3S,8R,9S,10R,13S,14S)-3-hydroxy-10,13-dimethyl-1,2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16-dodecahydrocyclopenta[a]phenanthren-17-one)) were prepared by cryosynthesis technology, which allowed the initial substance with a particle size of $100 \pm 50 \mu\text{m}$ to be converted to nanoform with a particle size of $100 \pm 20 \text{nm}$. The particles sizes were determined by methods of optical, electron transmission and scanning atomic force microscopy. Comparison of the samples by separation in high-performance liquid chromatography (HPLC) instrument with mass-spectrometric detection showed that the cryosynthesis of nanoparticles did not change the molecular structure of the hormone. Comparison of the cytotoxicity of samples by tests on C6 glial cell line culture showed that the modified DHEA has a lower toxicity. The obtained data indicate that cryosynthesis offers an effective technology for producing nanoparticles of steroidal hormones.

Keywords: dehydroepiandrosterone; nanotechnology; cryosynthesis; C6 cell line; cytotoxicity; steroidal hormones.