

Методические рекомендации

Модуль "Наномедицина "

Актуальность

На сегодняшний день существует огромное количество задач в области медицины и фармакологии, которые можно и нужно решать с помощью новейших современных подходов, в списке которых лидируют нанотехнологии. В связи с этим, подрастающему поколению необходимо знать способы тестирования липофильности лекарственных средств, изучить методы доставки лекарственных средств с помощью наночастиц, ознакомиться с современными методами биовизуализации и исследования материалов.

Медицинская химия – является отдельным весьма молодым и бурно развивающимся научным направлением, требующим от разработчиков глубоких знаний в области химии и передовых методов математического моделирования. Знакомство с этим направлением важно не только для будущих фармацевтов, но и для всех, интересующихся инновационными разработками.

Тематика защиты лекарственных препаратов с помощью наноконтейнеров и адресная доставка лекарственных препаратов являются разветвленными задачами, в рамках которых для каждого индивидуального пациента и конкретного препарата требуются оригинальные подходы с применением нанотехнологий. Данное направление соответствует общей тенденции развития персонализированной медицины, которая, уже в ближайшем будущем, потребует новых стандартов для подготовки специалистов в области медицинских и химических наук.

Биовизуализация – это новый виток в развитии клинических медицинских и научных биологических исследований, который возник благодаря достигнутому значительному прогрессу в совершенствовании спектроскопических методик элементного, изотопного, молекулярного видов анализа. Подходы современной биовизуализации весьма разнообразны и потребуют широкого спектра навыков от специалистов Будущего.

Основные образовательные задачи для учащихся

В лекционно-дискуссионной форме педагог знакомит слушателя с разнообразием задач в области медицины и фармакологии, решаемых с использованием новейших современных подходов, в том числе, нанотехнологий.

Элементы исследовательской работы школьников включают элементы «переоткрытия» эффектов, связанных с поверхностным плазмонным резонансом наночастиц металлов и квантовых точек, оценку сорбционной активности пористых матриц, оценку липофильности, расшифровку изображений электронной микроскопии и зондовой микроскопии биологических объектов.

В рамках элементов проектной деятельности учащиеся формулируют задачи по разработке методов доставки лекарственных препаратов и придумывают методологию доклинических тестов.

Работа в малых группах с фотографиями биообъектов познакомит с технологическими аспектами потоковых лабораторных анализов. Каждая подгруппа представляет результаты скрининга в формате проекта.

Часть 1. «Лекарственные средства нового поколения»

Этап 1. Разработка фармацевтических препаратов

Шаг 1 (15 минут).

Преподаватель знакомит с классификацией лекарственных средств в лекционно-дискуссионной форме с использованием презентации. Информация дублируется в **приложении 1** лабораторного журнала учащегося.

П.: Давайте предположим, как происходит разработка новых синтетических препаратов в фармацевтической лаборатории? Как ставится задача? Какие входные данные нужны? Какие этапы мы должны запланировать? Тезисно ответы учащихся фиксируются на флипчарте.

Комментарий

При поддержке педагога учащиеся вносят предложения по вопросам проблематики разработки новых препаратов и методологии разработки и изучают **приложение 2** в лабораторных журналах.

Преподаватель предлагает нарисовать блок-схему, иллюстрирующую последовательность проводимых испытаний лекарственных препаратов. После короткого обсуждения преподаватель просит учащихся зарисовать эту блок-схему в их лабораторных журналах.

Как оценивают растворимость и липофильность препаратов

Шаг 2. (25 минут)

П.: Процедуры испытания лекарственных препаратов, с которыми мы познакомимся, это определение растворимости и липофильности будущих препаратов. Кто знаком с понятием липофильности?

В нашем организме вещества переносятся жидкостями – какими? (тканевой жидкостью, кровью, лимфой, цереброспинальной жидкостью, ...).

Липофильность является важным параметром, характеризующим растворимость и адсорбцию соединения в различных участках организма.

П.: Прочтите в тетрадях текст про гематоэнцефалический барьер.

П.: Гематоэнцефалический барьер – липофильный и механический барьер, образованный клетками эндотелия сосудов головного мозга. Все ли верно? Что еще Вы узнали? Почему важно исследовать липофильность лекарственных препаратов до клинических испытаний? (Изучение **приложения 3**)

Комментарий

Школьники могут в группах сами попробовать представить принципиальные схемы экспериментов, или на основе «универсальной модели» представить схемы эксперимента для конкретного случая.

П.: Познакомьтесь с методикой определения липофильности соединений в рабочей тетради. Чья методика лучше? Подумайте, что потребуется для экспериментального ее воплощения? Что требуется для проведения тестирования?

Комментарий

После чтения методики в журнале преподаватель изображает принципиальные схемы экспериментов.

П.: Не забудьте заглянуть в лабораторный журнал и посмотреть, какие лекарственные препараты вам будут сегодня предложены для тестирования (**приложение 4**). Сделайте предположение о том, гидрофильным или гидрофобным является каждый из препаратов?

Примечание: Для проведения определения липофильности минимальный список необходимых ресурсов включает: пластиковую пробирку на 15 мл и пипетку Пастера, или стеклянную делительную воронку, или бюретку (через пластиковые стенки неудобно наблюдать за перераспределением вещества в столбе жидкости).

Шаг 3. (35 минут)

Комментарий

Обсуждение необходимых ресурсов, распределение объектов анализа.

Консультирование в проведении тестирования. Каждый учащийся или каждая группа по 2-3 человека выбирает набор из 3-х или более препаратов для проведения оценки липофильности.

Проведение испытаний липофильности препаратов. Для эксперимента удобно выбирать окрашенные соединения. Мы подобрали несколько фарм.препаратов, имеющих окраску:

- Цианокобаламин;
- Хлорофилл;
- Хлорофиллин;
- Гексорал (раствор);
- Бета-каротин;
- Бриллиантовый зеленый.

Методика организации работы представлена в лабораторном журнале. Пять препаратов будут распределены по пяти малым группам по 2-3 человека.

П.: Какие выводы можно записать в лабораторный журнал? Давайте выстроим «линейку» препаратов по увеличению липофильности.

А теперь давайте посмотрим на структурные формулы этих фармацевтических препаратов. Соответствует ли наша оценка теоретическим ожиданиям?

Примечание

Самой липофильной является молекула бета-каротина, молекула содержит длинный углеводородный фрагмент без заряженных кислород- или азот-содержащих групп (радикалов).

Самой гидрофильной (водорастворимой) должна быть молекула цианокобаламина.

Микрочип как идеальный биологический сенсор

Шаг 4¹.

Выясните, что такое - микрочиповые системы; как они используются в разработке новых лекарственных препаратов. Как такие системы способны упростить работу химиков, занимающихся разработкой новых лекарственных препаратов? Для этого прочитайте текст **приложения 5**.

В ходе работы уточните возможность использования зондовых люминесцентных меток. Прим.: в роли люминесцентных меток обычно используют люминесцентные маркеры, однако могут быть применены и квантовые точки.

Интересующиеся найдут информацию о том, что такое «квантовые точки» в лабораторном журнале (**приложение 6**).

Прочитайте текст про сферические нуклеиновые кислоты (**приложение 7**). Понятно ли, в чем заключается открытие профессора Миркина?

¹ Данный раздел изучается как домашнее задание

Шаг 5².

Оптическое микроскопирование для анализа поверхности реального коммерческого микрочипа. Обсуждение, вопросы, выводы, связанные с размерами самого чипа, размера печатных областей.

П.: Как Вы думаете, как такой микрочип может быть создан технологически? Можно ли еще уменьшить размер «спотов» и есть ли в этом смысл.

Шаг 6. (10 минут)

Преподаватель представляет слайды (**слайды с 2 по 10**) с фотографиями, иллюстрирующими уже изученные разделы. Предлагает школьникам самостоятельно прокомментировать слайды, отметить, что они понимают из представленного материала.

Шаг 7. Подведение итогов (5 минут)

При подведении итогов после первой и последующих частей модуля могут использоваться разные формы. Ниже предлагается четыре варианта. В лабораторных журналах используется первый вариант. Использование варианта № 2, 3 и 4 - на усмотрение педагога.

Вариант 1.

Напишите, что понравилось на занятии (информация, формы работы, выступления сверстников)	
Напишите, что вызвало затруднения	
Напишите, что было интересным, необычным. Что хотелось бы узнать более подробно. Чему хотелось бы специально научиться.	

Вариант 2.

Выберите одну фразу и завершите её.

сегодня я узнал...

было интересно...

было трудно...

я понял, что...

теперь я могу...

я почувствовал, что...

у меня получилось ...

я попробую...

меня удивило...

мне захотелось...

² Материал является факультативным; он изучается при наличии дополнительного времени

Вариант 3.

1. На занятии я работал	активно / пассивно
2. Своей работой на занятии я	доволен / не доволен
3. Занятие для меня показался	коротким / длинным
4. Мое настроение	стало лучше / стало хуже
5. Материал занятия для меня был	понятен / не понятен интересен / скучен легким / трудным

Вариант 4.

Оценка качества групповой работы

Оцените, как работа в группе повлияла на выполнение задания:

- мы работали скорее индивидуально, чем совместно;

- мы действовали согласованно и эффективно;

- наши разногласия и трудности в нахождении компромисса замедляли выполнение задания.

Часть 2. «Наноконтейнеры и доставка лекарственных средств»

Этап 1. Наночастицы как средство доставки лекарств

Шаг 1. (8 минут)

П.: Давайте обсудим вопросы. Зачем нужна векторная доставка? Что улучшит концентрирование лекарственного препарата в организме?

П.: Предположите, какие наночастицы могут использоваться для векторной доставки?

Комментарий

В лабораторном журнале (**приложение 8**) приведен небольшой текст о направлениях векторной доставки.

П.: Прочтите этот текст и ответьте на вопросы. На сложные вопросы мы найдем ответ с Вами вместе. В научной литературе молекулы и частицы, обеспечивающие адресную доставку, принято также называть «вектором», а адресную доставку - «векторной». Как Вы думаете, что роднит химический вектор с математическим?

Комментарий

В форме диалога обсуждается вопрос о том, в чем преимущества использования наноструктур для целей доставки (речь идет в том числе и о концентрационном и энергетическом эффектах).

Шаг 2³. (7 минуты)

П.: Каковы технологии иммобилизации неорганических наночастиц? И зачем это нужно?

Комментарий

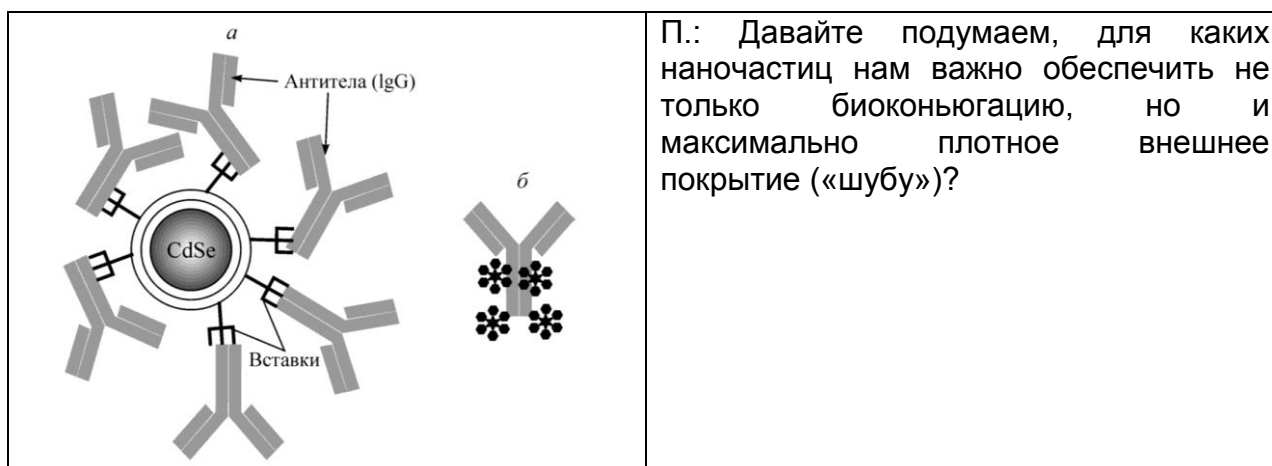
Биоконъюгация – модифицирование поверхности частицы или пленки с целью придания ей способности специфически связываться с нуклеиновыми

³ Материал может быть изучен дома учащимися либо разобран на занятии в случае наличия дополнительного времени.

кислотами или белками. Биоконъюгированные частицы способны избирательно химически связаться с нужной биомолекулой-субстратом, присутствующей в пробе. Для проведения биоконъюгации поверхность наночастицы должна быть первично модифицирована биосовместимым поверхностно-активным веществом (например, полиэтиленгликолем).

Примерно это можно изобразить на флипчарте (рис.ниже).

П.: Какие вопросы есть к данной схеме? Какую природу имеют молекулы-векторы? Этому вопросу мы касались в рамках части 1 модуля.



Варианты ответов:

- ядовитые халькогениды, из которых состоят квантовые точки;
- наночастицы серебра также могут иметь токсическое действие, если принимать их внутрь в больших количествах;
- некоторые магнитные материалы, из которых получаются наночастицы с подходящими магнитными характеристиками.

Шаг 3. Изобретаем липосомальный контейнер (12 минут)

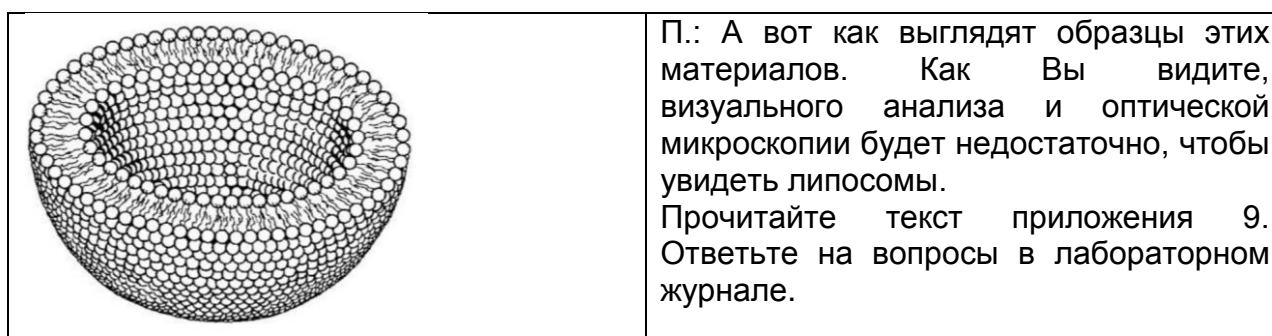
Комментарий

Преподаватель формулирует задачу по осуществлению векторной доставки в залоге биосовместимости наночастиц.

П.: Как можно «обмануть» живой организм и защитить лекарственный препарат от досрочного использования?

Решением проблемы является векторная доставка лекарственных препаратов с использованием коллоидных систем природных соединений. Такими «контейнерами» являются органические полимерные матрицы, белки, липосомы, везикулы. Давайте изучим структуру этих объектов сначала теоретически, а затем познакомимся с результатами микроскопии.

Кто может описать структуру липосом словесно? Кто может нарисовать.



Комментарий

Преподаватель показывает данные электронной микроскопии липосом. Обсуждает важную роль современных методов анализа в биовизуализации.

П.: Смогли ли бы Вы сами догадаться по микрофотографиям электронной микроскопии, что видите липосому? Давайте подумаем, как именно объясняется низкая стабильность векторов при системной доставке в организм?

Изучение текста про липосомальные наноконтейнеры (**приложение 9**). Учащиеся пытаются ответить на следующие вопросы:

- Как были открыты липосомы? Кто придумал липосомальный контейнер?
- Из чего состоит мембрана липосом и везикул?
- Как «открыть» липосомальный контейнер с доставленным лекарственным препаратом? Обсудите Ваши предложения с преподавателем и сверстниками.
- Посмотрите микрофотографии ниже. Смогли бы Вы как доктор Бэнгхем увидеть липосомы на снимках с электронного микроскопа?

Шаг 4. (18 минут)

Учащиеся изучают материал, приведенный в лабораторном журнале по данной теме.

Преподаватель проводит практическую работу, предлагая учащимся прочитать поясняющий текст в лабораторном журнале, а затем попробовать синтезировать липосомы самостоятельно по методике, предложенной в лабораторном журнале.

Рекомендуется приготовить водный раствор лецитина заранее (за 1 час до начала занятия). Концентрация 1,8 г/10 мл воды.

Этап № 3. Магнитные жидкости

Шаг 1. (8 минут)

П.: Магнитные частицы – это неорганические носители. Какие магнитные материалы Вам знакомы? Для какой цели могут потребоваться магнитные жидкости?

Комментарий

Адресная доставка может быть ограничена из-за размера частиц и их токсичности. В связи с этим возникает необходимость модификации поверхности.

Одним из примеров модификации поверхности могут быть адсорбенты – химически пришитые к магнитным частицам соединения. Данные вещества могут быть легко «смыты» с поверхности с использованием магнитной сепарации.

Адресная доставка лекарственных средств с использованием наночастиц все больше входит в нашу жизнь. К примеру, гипертермия – технология безоперационного лечения новообразований.

Примеры неорганических субстратов: оксиды железа и диоксид кремния как примеры носителей, исследуемых в российских медицинских центрах.

Общее обсуждение: какие преимущества могут быть у наночастиц оксидов железа?

Шаг 2. (15 минут)

Предлагается провести практическую работу и получить магнитную жидкость самостоятельно.

П.: Из чего состоит магнитная жидкость кроме магнитных частиц?

Комментарий

Растворитель, или по-другому, дисперсионная среда – среда, в которой наночастицы должны быть диспергированы и стабилизированы.

П.: Приготовление магнитной жидкости с использованием готового препарата порошка Fe_3O_4 мы будем осуществлять по методике, представленной в лабораторном журнале.

П.: Обратите внимание, что полученная нами магнитная жидкость не вполне соответствует «нано». Дело в том, что наночастицы магнетита или железа синтезируют из карбонила железа в условиях инертной атмосферы. Это невозможно реализовать в нашем случае.

П.: Скажите, легко ли диспергируется Ваш порошок магнетита? Может быть, стоит добавить поверхностно-активное вещество, играющее роль стабилизатора? Имеются олеиновая кислота, стеариновая кислота, додециламин, трилон Б.

П.: Каждый из Вас может выбрать собственный ПАВ или подобрать их сочетание для максимального диспергирования частиц магнетита.

П.: Давайте проверим свойства полученной жидкости с помощью магнита. Попробуйте промыть Вашу магнитную жидкость от примесей, используя магнит.

Шаг 3. (15 минут)

Комментарий

На этом шаге предлагается изучение липофильности стабилизированной поверхностно-активным веществом магнитной жидкости с использованием методики, разобранный на втором занятии.

Можно порекомендовать обратиться к описанию методики в лабораторном журнале. Оценку липофильности до и после модифицирования частиц оксида железа ПАВ проводят визуально, поэтому важно, как минимум, предложить сфотографировать суспензию частиц оксида железа до добавления ПАВ. При возможности, отделите аликвоту суспензии до внесения ПАВ для анализа липофильности.

Шаг 4. Подведение итогов (7 минут)

Преподаватель представляет слайды (**слайды с 9 по 11**) с фотографиями, иллюстрирующими уже изученные технологии наномедицины. Предлагает школьникам самостоятельно прокомментировать слайды, отметить, что они понимают из представленного материала.

Часть 3. «Нанотехнологии в биовизуализации и медицинской диагностике»

Этап 1. Современные методы биовизуализации.

Шаг 1. (15 минут)

П.: Развитие микроскопических методов анализа позволило исследователям спуститься на новый уровень исследования – наноуровень. Те же подходы способны помочь спуститься на наноуровень и в решении медицинских задач.

Новое развитие получили задачи биовизуализации в рамках нанотехнологического подхода (зондовые люминесцентные или окрашенные наночастицы, биосенсоры СЗМ, нанокалориметры).

Прочитайте текст в лабораторном журнале (**приложение 10**) о возможностях оптической микроскопии и ее ограничениях (**видео 1**).

Учащиеся подписывают компоненты оптического микроскопа на изображении, приведенном в лабораторном журнале.

Как можно классифицировать оптические микроскопы? Какие приемы используют для улучшения качества оптического изображения? Какие микроскопы имеются в Вашей лаборатории?

Какие медицинские и биологические задачи можно было бы решить при помощи этих микроскопов в рамках учебных занятий?

Шаг 2. (15 минут)

П.: Познакомьтесь с классическим способом оценки числа клеток в объеме жидкости (лабораторный журнал, **приложение 11, видео 2**).

Комментарий

Камера Горяева может выступать также шкалой при оценке размеров биологических объектов.

Преподаватель предлагает учащимся выполнить задания по подсчету объемной концентрации эритроцитов в лабораторном журнале.

Камера Горяева может быть применена при оценке цитотоксичности препаратов. По изменению вид клеток возможно оценить содержание здоровый и пораженных клеток в 1 мл раствора.

Учащиеся отвечают на следующие вопросы:

- Можно ли использовать стандартную камеру Горяева для работы в поле флуоресцентного микроскопа?

- Из какого материала может быть изготовлена такая счетная камера?

Шаг3 ⁴. (15минут)

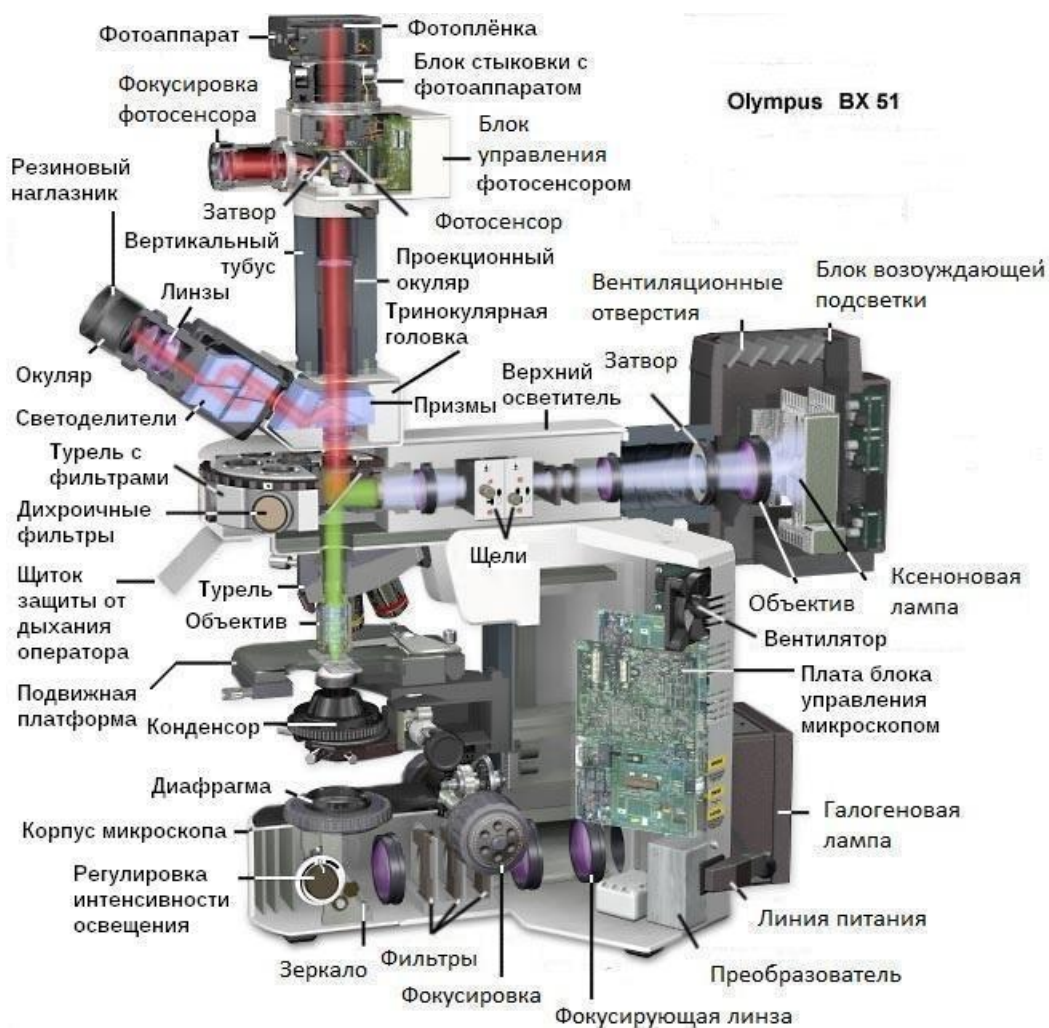
П.: Познакомьтесь с методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Изучите **приложение 12** в лабораторном журнале и послушайте объяснения преподавателя. Что осталось непонятным?

Комментарий

Преподаватель поясняет устройство флуоресцентного микроскопа, отвечая на вопросы школьников.

П.: Практически все органические вещества флуоресцируют при действии УФ-лазерного облучения. Какие флуоресцентные красители используются для повышения качества изображения при биовизуализации в данном случае?

⁴ Материал может быть изучен дома учащимися либо разобран на занятии в случае наличия времени.



Устройство флуоресцентного микроскопа
https://traditio.wiki/files/8/87/Fluorescence_microscopy.JPG

Этап 2. Квантовые точки

Шаг 1. (15 минут)

П.: Если продолжать разговор про биовизуализацию, то перспективным материалом для этого направления являются квантовые точки. Что такое квантовая точка?

П.: В чем преимущества квантовых точек по сравнению с органическими люминесцентными маркерами? Прочтите текст о квантовых точка в приложении 6. Нашли ли ответ на данный вопрос?

Примечание

Квантовая точка имеет свечение в десятки раз более интенсивное, чем молекула органического люминесцентного маркера.

П.: Как цвет квантовой точки зависит от ее размера? Какого размера квантовые точки предпочтительны для задач биоконтрастирования? Проверьте их свечение с помощью УФ-лампы.

П.: Проведите практическую работу для выяснения цвета люминесцентного свечения имеющихся в наличии образцов квантовых точек (Данный шаг может быть проведен на занятии в случае наличия времени в течение урока).

Подготовка пробы для СЗМ:

Нанесите 50 мкл раствора на очищенную поверхность монокристалла кремния. Дайте капле высохнуть на воздухе или в сушильном шкафу. Передайте наиболее равномерный образец оператору сканирующего зондового микроскопа для анализа.

Примечание: Концентрация раствора квантовых точек невелика и не превышает 10-4 моль/л, поэтому в разбавлении раствора необходимости нет.

Шаг 2. (5 мин)

Рассмотрите микрофотографии объектов, для биовизуализации которых были использованы квантовые точки. Можно ли быть довольным качеством изображения?

Высокой ли цитотоксичностью обладают квантовые точки? Каково Ваше мнение?

Этап 3. Сканирующая зондовая микроскопия как метод наномедицины

Шаг 1. (15 минут)

Комментарий

Преподаватель предлагает обратиться к принципам метода зондовой микроскопии (**приложение 13**), чтобы понять, какое изображение будет получено с поверхности пленок квантовых точек.

Преподаватель задает участникам группы вопросы: Какого типа сканирование потребуется для этого исследования? Контактное или бесконтактное?

Примечание

Размер квантовых точек составляет менее 10 нм. Такую пленку легко деформировать. По этой причине оптимальным режимом СЗМ является атомно-силовая микроскопия (АСМ) как более точный и мягкий метод воздействия на образец.

П.: Сравните изображения СЗМ, полученные в разных режимах сканирования. Как видите, с помощью методов СЗМ возможно получить изображение поверхности образца (топология) и его жесткости.

Прочитайте текст **приложения 13** в лабораторном журнале про принципы метода АСМ. В чем особенность АСМ по сравнению с другими типами зондовой микроскопии?

Рассмотрите схему, иллюстрирующую многообразие применений АСМ в решении биомедицинских задач. С какими практическими приложениями методы Вы уже познакомились? Преподаватель отвечает на вопросы по новым пунктам.

Познакомьтесь с разрабатываемым зарубежными учеными методом диагностики заболеваний сердечно-сосудистой системы. На основании каких признаков с помощью АСМ возможно диагностировать заболевания?*

**Ответ на данный вопрос не так сложен, как может показаться изначально. При помощи атомно-силовой микроскопии возможно изучение формы и размера клеток, а также изучение поверхности мембраны. При нарушении метаболизма клетки ее поверхность изменяется, что и может быть использовано для обнаружения заболеваний на ранних стадиях.

*Примечание: ** - задание повышенной сложности.*

Шаг 2⁵.

П.: Познакомьтесь с новыми дополнительными функциями АСМ в тексте лабораторного журнала. Какие достоинства и недостатки у этих подходов (перьевой литографии и наносенсора) можно предположить, понимая принципы метода?

Поясните, в чем принцип действия зондового микроскопа? Что изменяется во времени?

Шаг 3. Подведение итогов (10 минут)

Преподаватель предлагает просмотреть **все слайды** общей презентации по модулю, оценить освоенный объем новых знаний и умений, прокомментировать особо значимые разделы.

⁵ Данный материал может быть изучен дома учащимися либо разобран на занятии в случае наличия времени