

III съезд токсикологов России  
Москва, 1-5 декабря 2008 года

# Нанотоксикология – новое направление для исследований



Главный врач МЦ «Новомедицина»  
доктор медицинских наук, профессор  
**САРВИЛИНА Ирина Владиславовна**



г. Ростов-на-Дону, 2008



# НАНО(ЭКО)ТОКСИКОЛОГИЯ

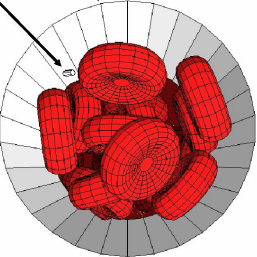
**НАНОТЕХНОЛОГИИ** – совокупность приемов и методов, применяемых при изучении, проектировании, производстве и использовании наноструктур, устройств и систем, включающих целенаправленный контроль и модификацию формы, размера, взаимодействия и интеграции составляющих их наномасштабных элементов (около 1-100 нм), для получения объектов с новыми химическими, физическими, биологическими свойствами.

**НАНО(ЭКО)ТОКСИКОЛОГИЯ** – это наука, исследующая эффекты взаимодействия разработанных нанорешений и наноструктур с живыми организмами.

**Цель нанотоксикологии:** исследование риска, связанного со взаимодействием наноматериалов с организмом человека и окружающей средой.

**Задачи нанотоксикологии:**

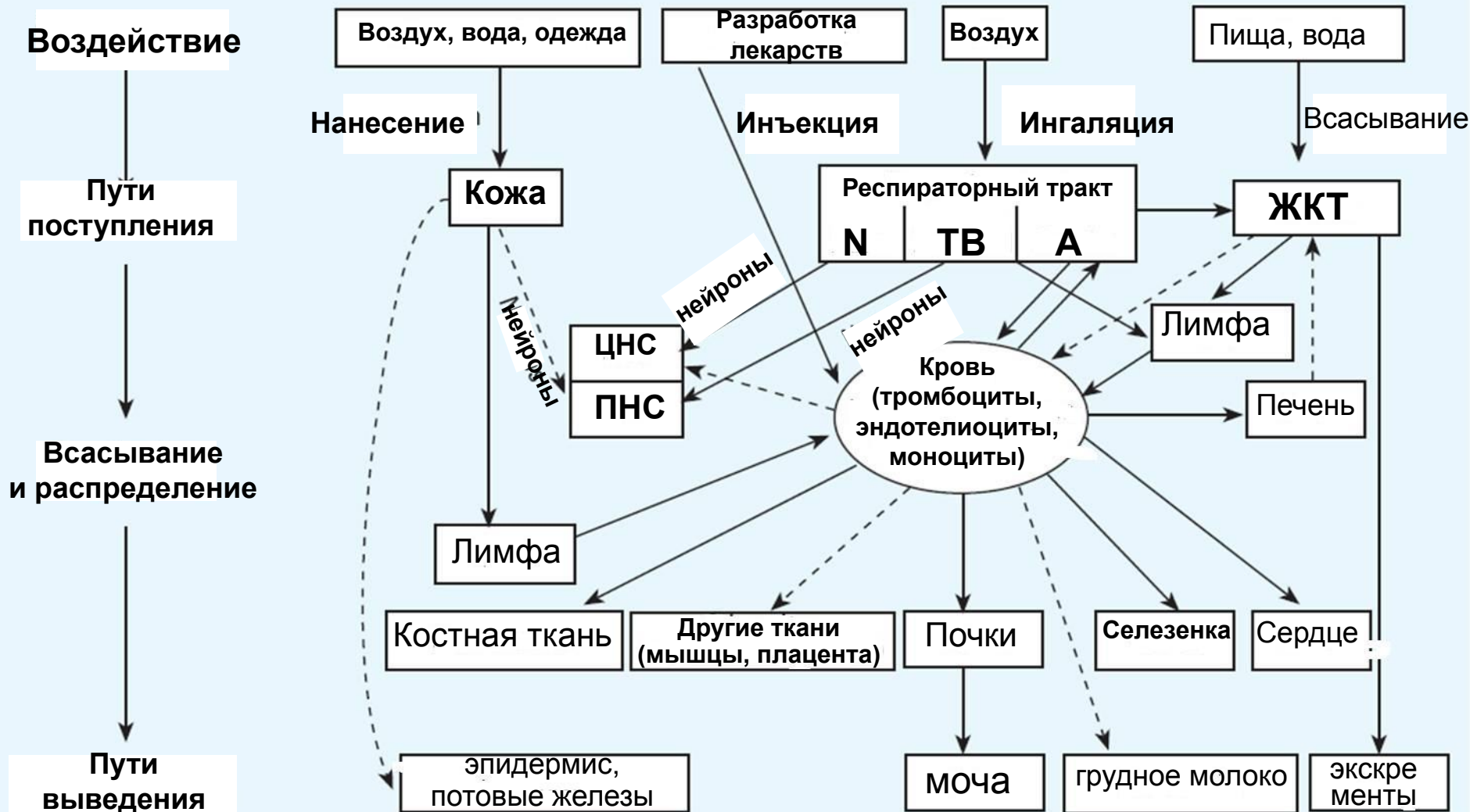
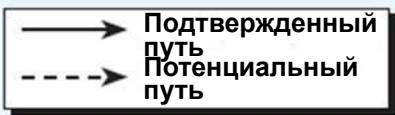
- исследование физических и химических свойств наночастиц;
- исследование движения, превращения и взаимодействия наночастиц в окружающей среде;
- идентификация и анализ наночастиц в окружающей среде;
- исследование влияния наночастиц на организм человека и экосистемы;
- исследование эффектов наночастиц в организме человека и окружающей среде.

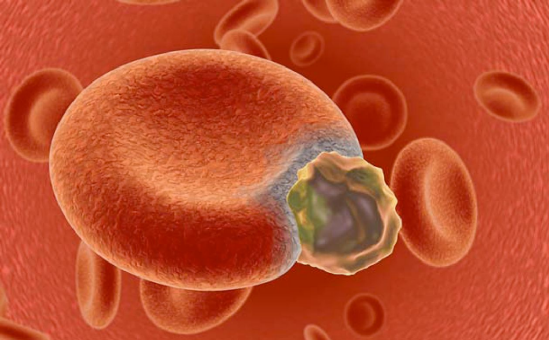


# Нанотехнологии для разработки инновационных лекарственных средств

Продукт нанотехнологий	Вид продукта	Потенциальное значение
<b>Кантилевер</b>		<p>Высокопроизводительный скрининг Идентификация белковых биомаркеров болезни Идентификация SNP Исследование генетической экспрессии</p>
<b>Углеродные нанотрубки</b>		<p>Идентификация мутаций в ДНК Идентификация белковых биомаркеров болезни Применение для целей лечения вирусных заболеваний и опухолевой патологии в комбинации с наночастицами.</p>
<b>Дендримеры</b>		<p>Секвестрирование цели Формы контролируемого высвобождения лекарств Разработка контрастирующих средств</p>
<b>Нанопроводники</b>		<p>Высокопроизводительный скрининг Идентификация биомаркеров заболеваний Идентификация SNP Исследование генетической экспрессии</p>
<b>Наночастицы</b>		<p>Мультифункциональные лекарства Целевая разработка лекарств</p>

# Биокинетика наночастиц в организме человека

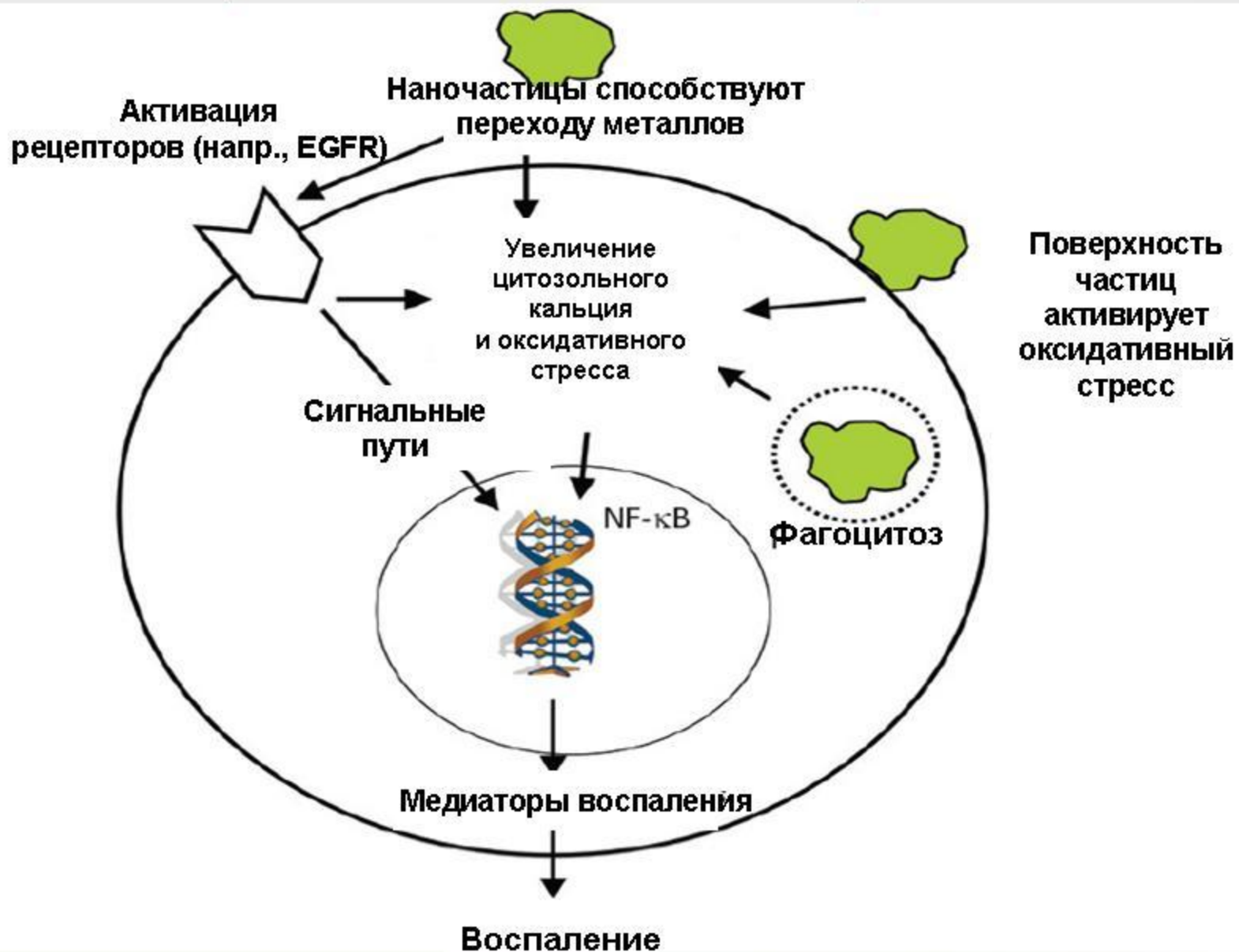




# КИНЕТИКА NSP: КРОВЬ – КОСТНАЯ ТКАНЬ

Размер частиц	Тип	Результаты	Источник
~10 нм	PEG квантовые точки	Быстрое появление квантовых частиц в печени, селезенке, лимфоузлах, костях	Ballou et al. 2004
<220 нм	Металло-фуллерены	Высокая накопление в костях, печени	Cagle et al. 1999
90-250 нм	HSA-покрытые наночастицы	Высокое накопление в костях, печени	Bazile et al. 1992
240 нм	Полистирен (небиodeградируемый) Полилизогексилцвинакрилат (биodeградируемый)	Быстрый пассаж через эндотелий в кости, захват фагоцитами	Gibaud et al. 1994, 1996, 1998

# Механизмы токсичности наночастиц (Donaldson and Tran, 2002)

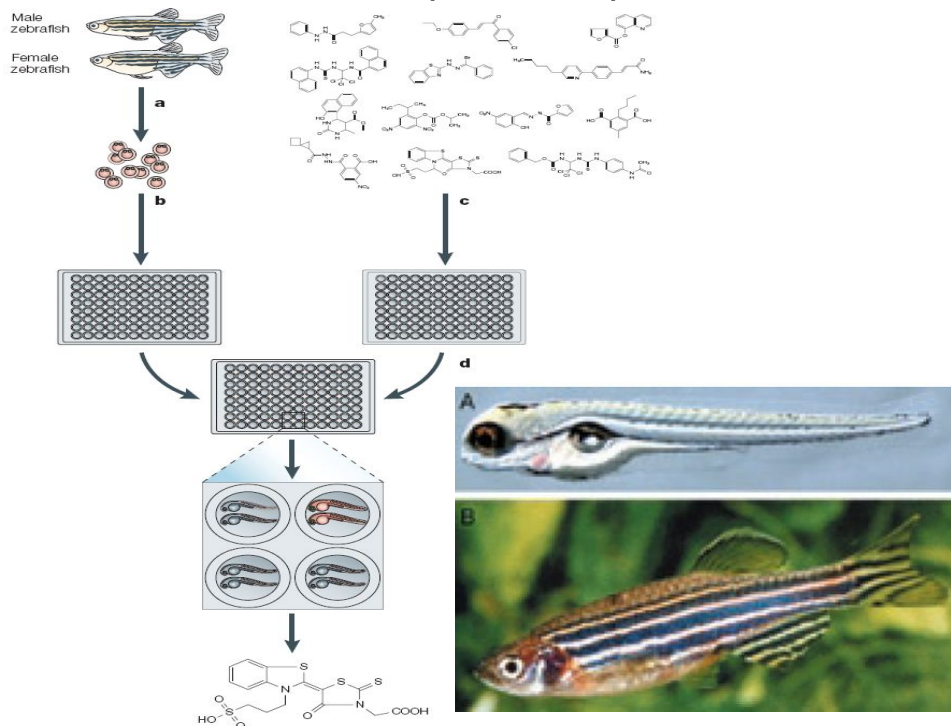


# Биомоделирование в исследовании токсических эффектов наночастиц

## Стандартные модели (крысы, мыши, собаки и т.д.)



## Новые биомодели (zebrafish)



### Преимущества

- Удовлетворительная схожесть с организмом человека

- Низкая стоимость и широкий диапазон биомоделей
- Возможность проведения доклинических испытаний на ранней стадии
- Скрининг молекул, формирующих молекулярный паттерн токсических эффектов наночастиц

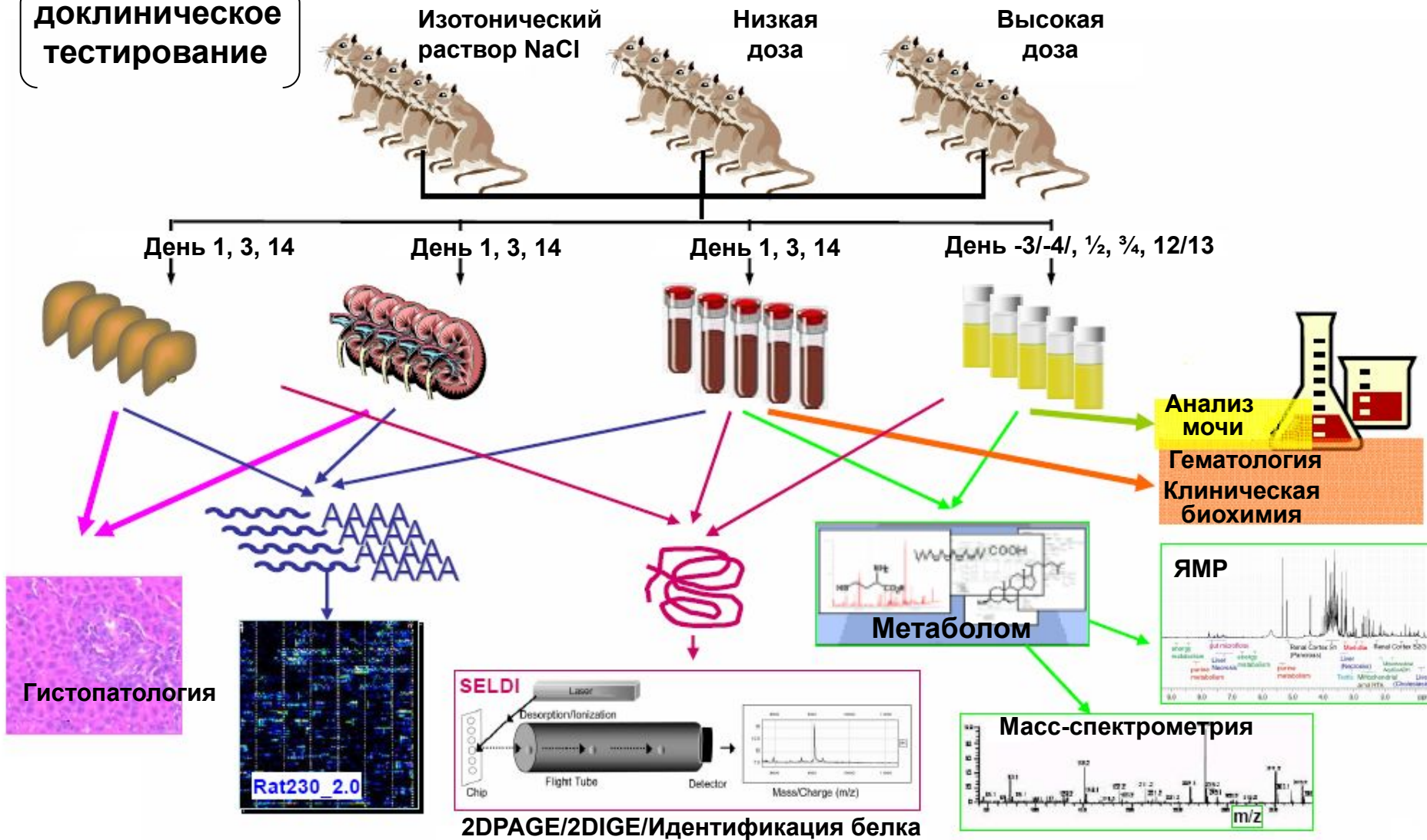
### Недостатки

- Высокая стоимость и узкий диапазон
- Поздняя стадия доклинических испытаний

- Низкая схожесть с организмом человека, но высокие предиктивные возможности

# Методы биотестирования на ранних этапах разработки наночастиц

доклиническое тестирование

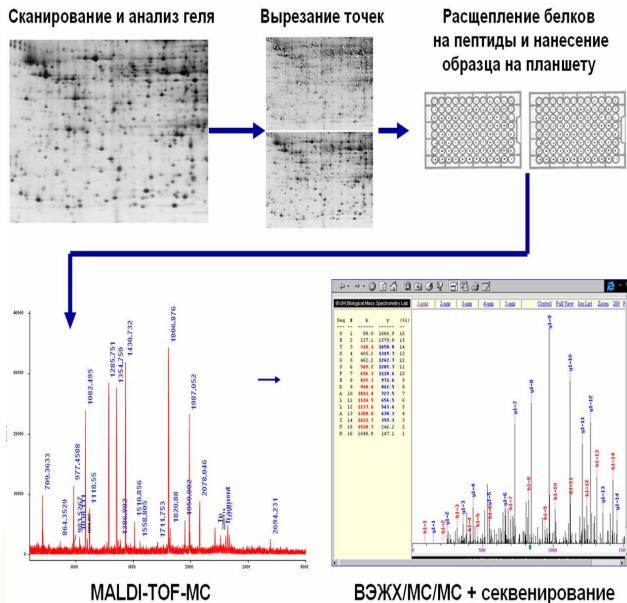




# Технологическая платформа для лаборатории нанотоксикологии

## для токсикогеномных, токсикопротеомных исследований

1. Получение биологического образца.
2. Подготовка биологического образца к исследованию.
3. Аналитический двумерный электрофорез (IEF-SDS-PAGE)
4. Трипсинолиз белка в геле.
5. Получение спектров MALDI-TOF и/или ВЭЖХ/МС/МС



## разработки фармакокинетической/фармакодинамической модели лекарственного средства

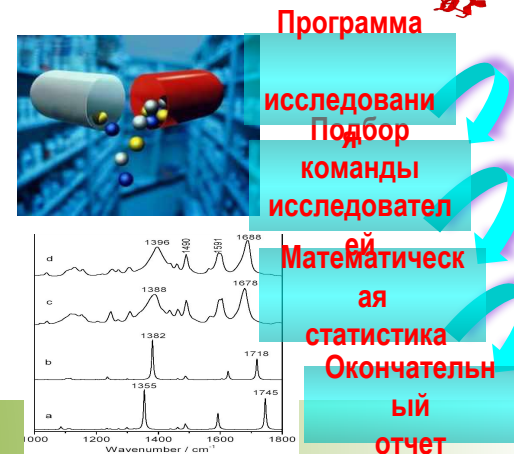
1. Оценка фармакодинамического эффекта лекарственного средства (спецметоды для каждого заболевания) и регистрация побочных эффектов (программа «Регистрация побочных эффектов на лекарственные препараты», разработка лаборатории информации и стандартизации в области лекарственных технологий ЮНЦ РАН, 2005 г.)
2. Терапевтический лекарственный мониторинг на основе D-оптимальной стратегии и стратегии «пик-спад», экстракции лекарства из биоматериала и хромато-масс-спектрометрического исследования концентрации лекарственного средства в крови пациента
3. Идентификация значений параметров ( $K_{abs}$ ,  $K_{el}$ ,  $V_d$ ), построение фармакокинетической/фармакодинамической модели (программа USC\*PACK, США) на основе оценки фармакодинамических эффектов
4. Персонализация терапии



## для биофармацевтических исследований

1. Проведение in-vitro теста на растворимость лекарства
2. Оценка качества лекарства на основе ИК-спектрофотометрии. Оборудование: ИК-Фурье спектрофотометр Spectrum BX FT-IR, Perkin Elmer, США, Масс-спектрометр-МС LCQ Deca XP MAX, Thermo Finnigan, США, детектор Surveyor MSQ, ВЭЖХ SURVEYOR LC, Thermo Finnigan, США

Блок-схема исследований по биоэквивалентности



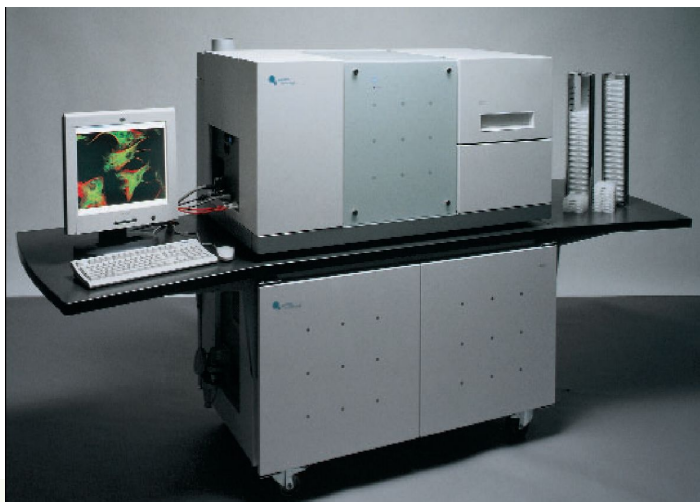
# Высокопроизводительный скрининг биомолекул – участников механизмов токсичности наночастиц



Более 100 000 образцов за 24 часа



Стандартизация пробоподготовки и хранение биообразцов

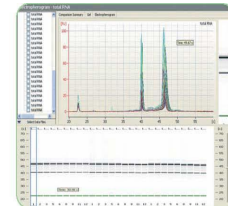
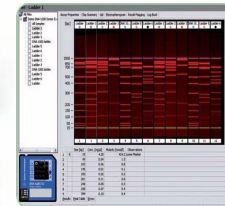


>50,000 данных в цветном формате за 24 часа

## *Направление скрининга биомолекул, отвечающих за развитие побочных реакций:*

- субстраты клетки, участвующие в жизненном цикле клетки, клеточной дифференцировке, клеточной пролиферации, цитотоксичности, апоптозе, транспортных феноменах;
- сигнальные молекулы в клетке – кальций-зависимые сигнальные пути, вторичные мессенджеры, ионные каналы, мембранный потенциал;
- продукты генетической экспрессии, мРНК, иРНК, белки, белок-белковые взаимодействия;
- мембранные рецепторы: лиганды, активация и десенситизация рецепторов, транслокация и эндоцитоз, сигнальные молекулы от рецепторов;
- молекулы, участвующие в транслокации в клетке.

# Быстрые технологии оценки токсичности наночастиц: микрофлюидные технологии



# Методы тестирования токсических эффектов наночастиц

## Методы тестирования активности и SNP ключевых ферментов



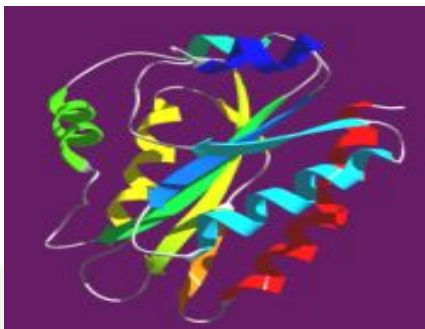
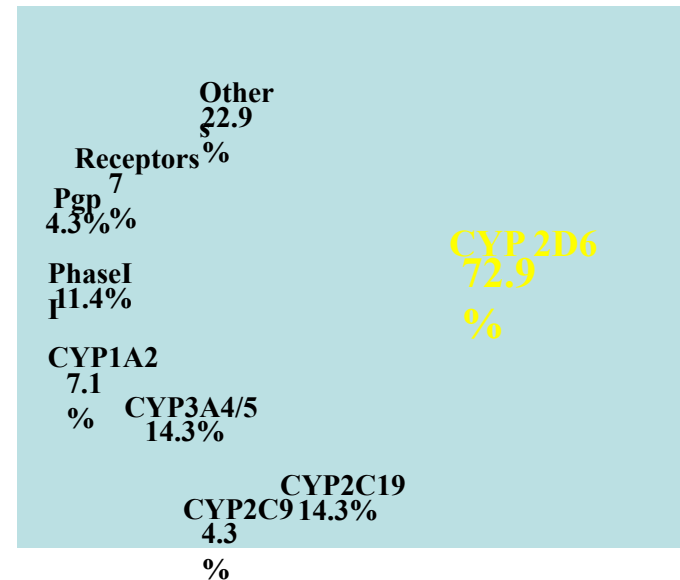
### 1. Исследование активности ферментов методами:

- радиохимического анализа
- методом ВЭЖХ/МС/МС

2. Анализ метаболитов лекарств методом ИФА

3. Молекулярный генетический анализ (выделение ДНК с последующими PCR/MS; RT-PCR).

## Генотипирование и фенотипирование в исследованиях FDA (США)

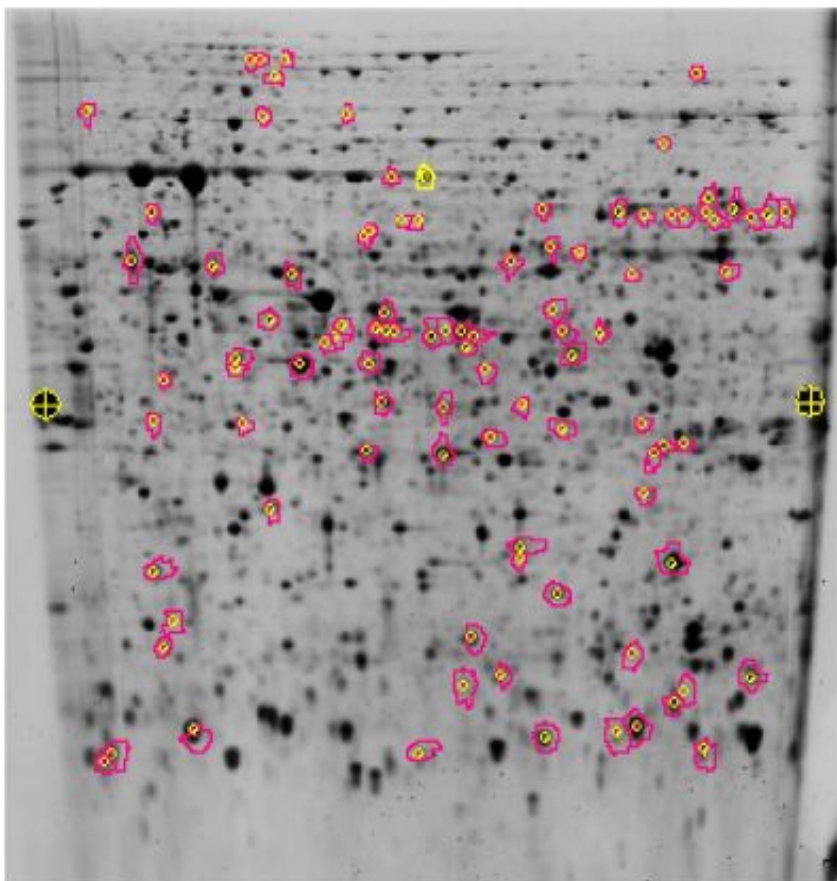


Исследование молекулярных профилей биообразца органа-мишени с помощью технологий токсикопротеомики (2DIGE, 2DPAGE/MS/MS)

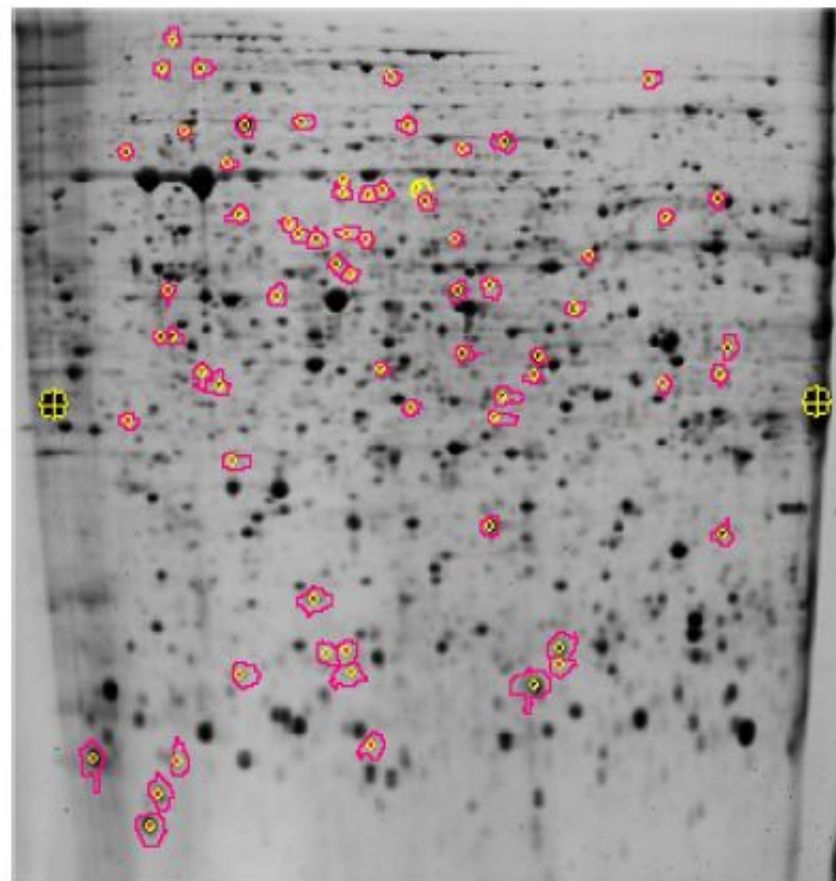
Технология LC/MS/MS

# Токсикопротеомика: результаты исследования динамики молекулярного профиля нефроцитов на фоне введения наночастиц

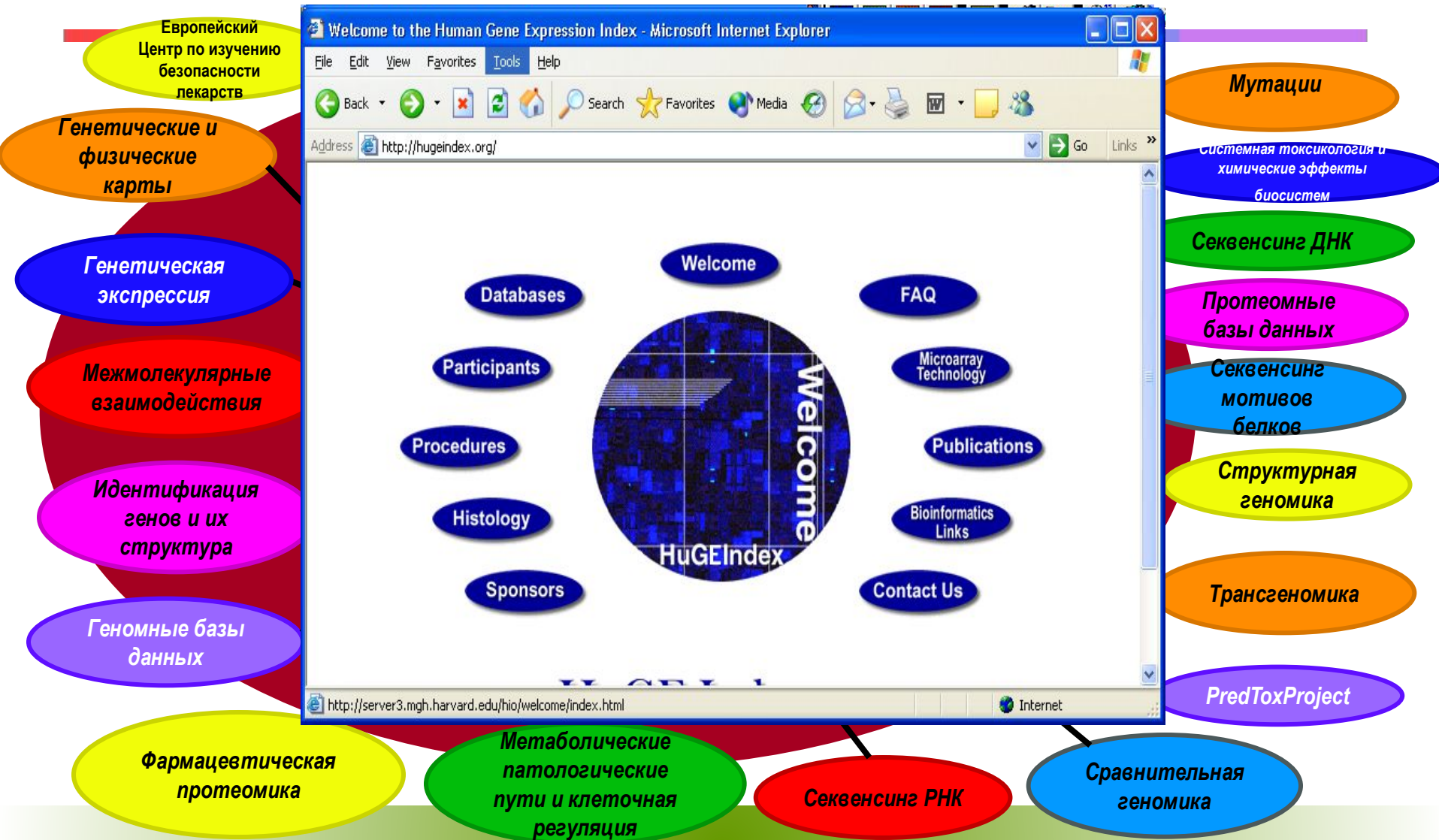
Точки белков с увеличившейся  
экспрессией



Точки белков со  
сниженной экспрессией

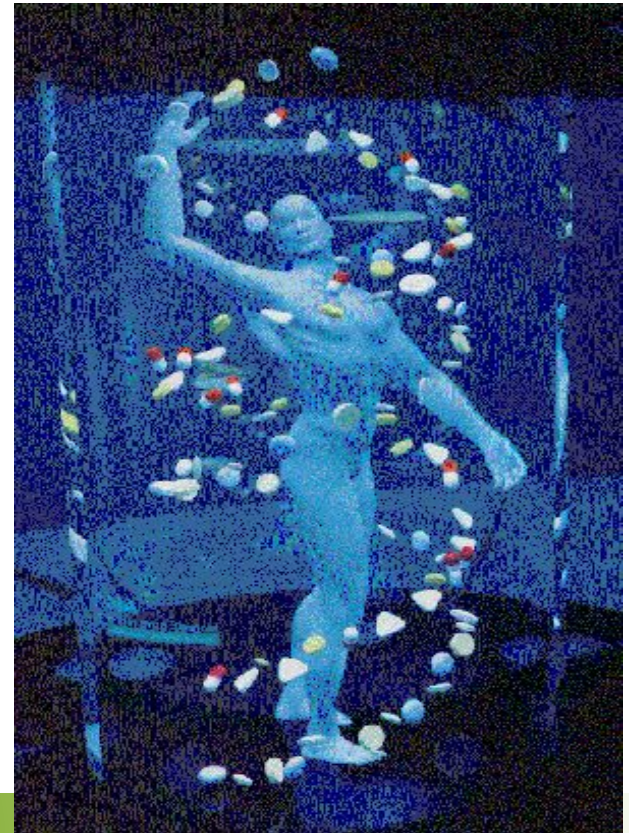


# Компьютерные базы данных сети INTERNET по токсикогеномике, токсикопротеомике, токсикометабономике

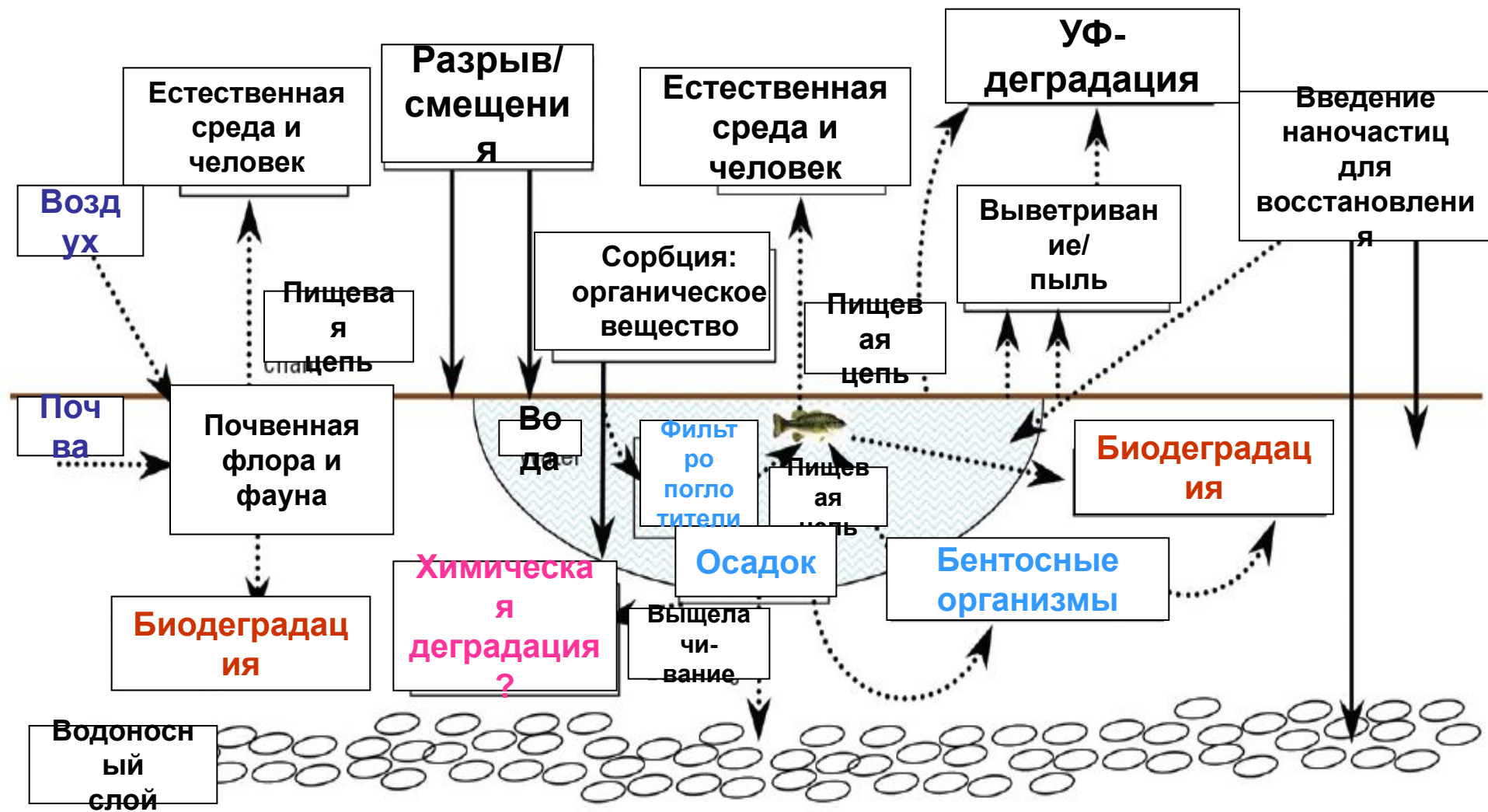


# Информационно-диагностическая база по токсическим и побочным эффектам наночастиц

- создание базы данных **первичной** информации по токсическим и побочным эффектам наночастиц на основе спонтанных сообщений;
- создание базы данных **динамического наблюдения** за повторным проявлением токсических и побочных реакций наночастиц;
- создание **базы данных по результатам лабораторного тестирования** наночастиц с обнаруженными побочными реакциями (токсикологические лаборатории);
- создание **баз данных побочных реакций наночастиц** у пациентов с различной патологией в Федеральных Округах, интегрированных в единую Всероссийскую базу данных.
- интеграция Всероссийской базы данных в международные базы данных по токсическим и побочным эффектам наночастиц.



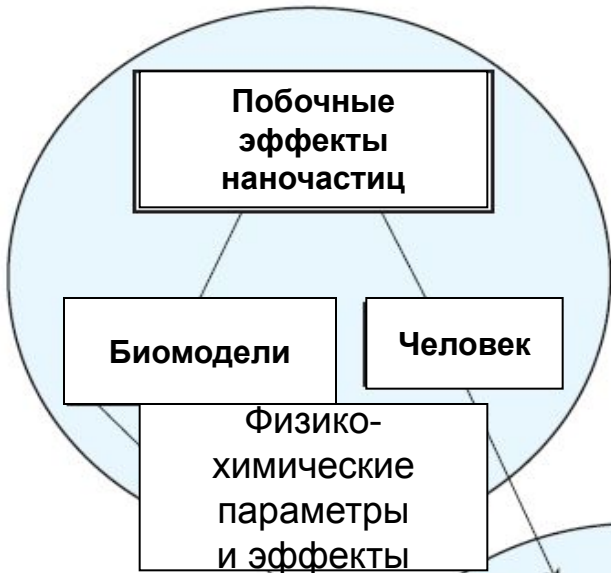
# УЧАСТИЕ НАНОЧАСТИЦ В ОСНОВНЫХ ЭТАПАХ КРУГОВОРОТА ВЕЩЕСТВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ





# Наноматериалы и влияние их на окружающую среду

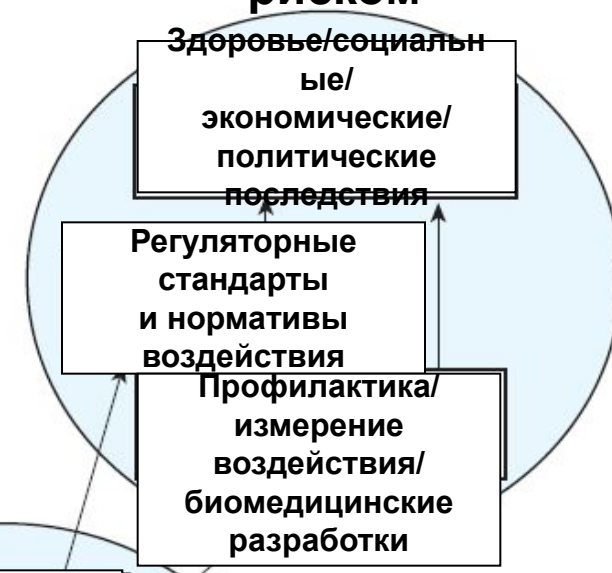
## Идентификация опасности



## Оценка воздействия



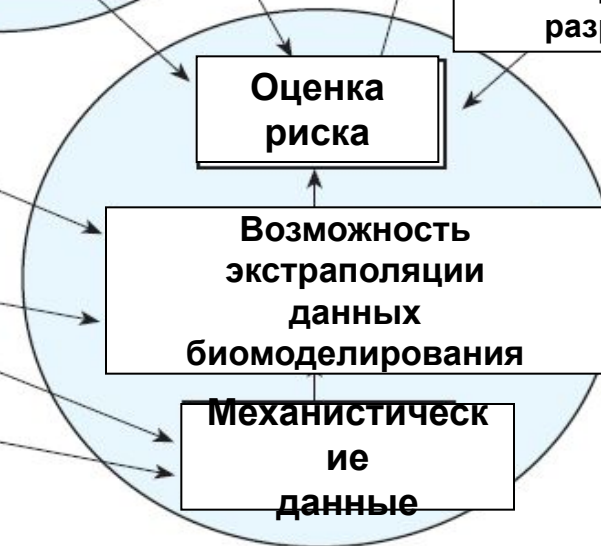
## Управление риском



## Дозозависимые воздействия



## Характеристика риска



# Нормативная база для успешной работы центров по регистрации токсических эффектов и побочных реакций на наночастицы

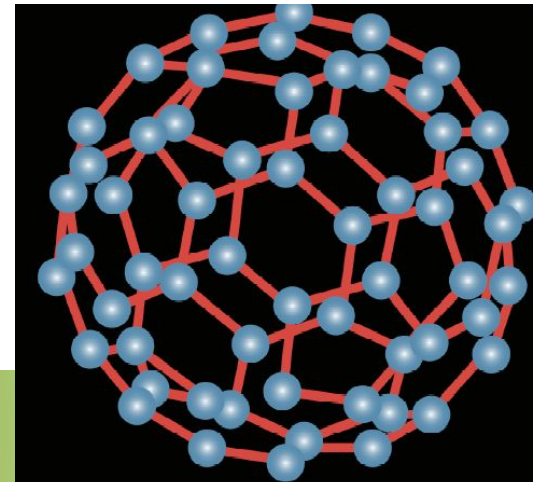


- ❖ Закон РФ «О лекарственных средствах»
- ❖ Нормативная база и предложения в области нанотехнологий в РФ (ГК Роснано).
- ❖ Письмо Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России от 26 июля 2001г. №291-22/91 «О неблагоприятных побочных реакциях лекарственных средств».
- ❖ Правила клинической практики в Российской Федерации Приказ МЗ и СР Российской Федерации от 19.06.2003, № 266.
- ❖ Правила лабораторной практики в Российской Федерации Приказ МЗ и СР Российской Федерации от 19.06.2003 № 267 .
- ❖ Государственный реестр ЛС; Федеральное руководство для врачей по использованию ЛС
- ❖ Приказ № 88 «Государственный информационный стандарт ЛС. Основные положения» (26.03.01г.)
- ❖ Приказ № 181 «Система стандартизации в ЗО. Основные положения» (04.06.01 г.)
- ❖ Хельсинкская Декларация Всемирной Медицинской Ассоциации: рекомендации для врачей по проведению биомедицинских исследований на людях. – Хельсинки. - 1964, дополнения 1975, 1983, 1996, 2000.
- ❖ Этическая экспертиза биомедицинских исследований: практические рекомендации. Под ред. Ю.Б.Белюсова.-М.-Изд.1.-2005г.
- ❖ OECD Principles on Good Laboratory Practice.-Документы Организации за экономическую кооперацию и развитие. -1998 г.
- ❖ Документация и методические разработки по биомоделированию (рекомендации Комитета МЗ РФ, РАМН о содержании и применении лабораторных животных, рекомендации NIH в США ).
- ❖ European chemicals regulation (REACH), декабрь 2006 (EC No. 1907/2006 and Directive 2006/121/EC ).
- ❖ National Toxicology Program (NTP)

# Безопасность нанотехнологий: дорога в будущее

## Необходимые меры:

- внедрение международных и национальных шкал оценки токсических эффектов и побочных реакций на нанотехнологическую продукцию;
- разработка клинически релевантных биомоделей, позволяющих оценить токсические и побочные эффекты наночастиц, и в совокупности с *in-vitro*-исследованиями, *in silico* технологиями экстраполировать полученные результаты в клинику;
- внедрение и разработка нового оборудования, методов и технологий для оценки токсичности наночастиц в отношении органов-мишеней (токсикогеномики, токсикопротеомики, токсикометабономики);
- развитие компьютерных методов предиктивной токсикологии (позволяют снизить до 50% затрат на побочные реакции наночастиц) и создания информационно-диагностической системы по регистрации токсических и побочных реакций на наночастицы.
- формирование новой государственной и образовательной стратегии в области нано(эко)токсикологии.



# Этапы организации лаборатории токсикологии

## I. НАУЧНЫЙ ЭТАП

- Нарботка лабораторных образцов
- Разработка методов пробоподготовки
- Разработка условий анализа проб на оборудовании
- Уточнение и оптимизация схемы лабораторных работ
- Предварительная оценка показателей качества исследований

## II. ТЕХНОЛОГИЧЕСКИЙ ЭТАП

- Создание лабораторного регламента проведения исследований по молекулярной токсикологии
- Разработка документации для лаборатории, протоколов КХА
- Разработка математических методов анализа ФК/ФД данных



## III. ЛИЦЕНЗИРОВАНИЕ

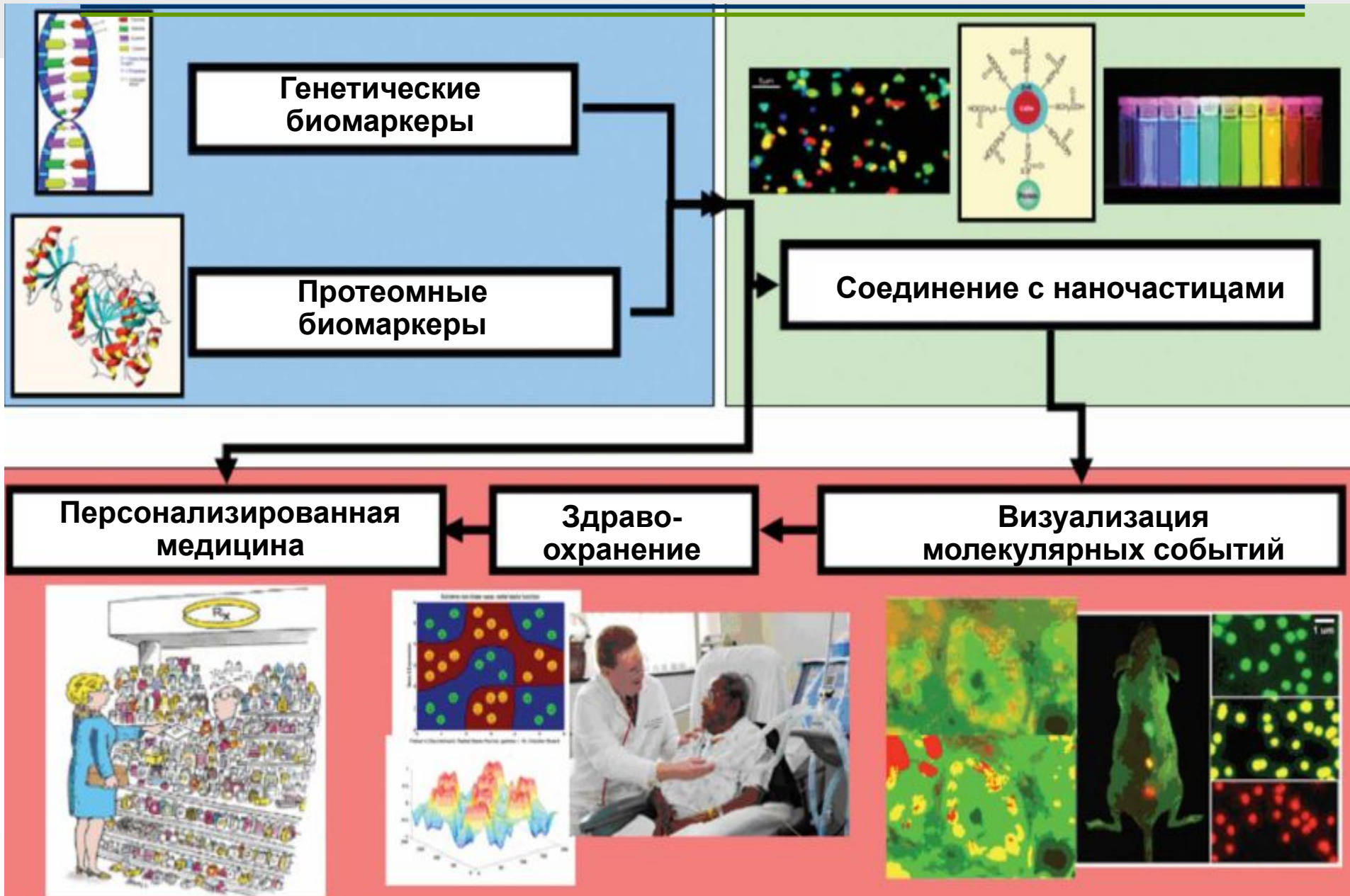
- Код работ и услуг
- 01.003 лабораторная диагностика (Приказ Минздрава России от 26.07.2002 № 238 «Об организации лицензирования медицинской деятельности»).
- 05.007 лабораторная генетика
- 03.019 клиническая фармакология
- 06.002 общественное здоровье и организация здравоохранения

## IV. АККРЕДИТАЦИЯ

- в системе аккредитации аналитических лабораторий
- ГОСТ Р, ИСО/МЭК 17025-99 «Общие требования к компетентности испытательных и калибровочных лабораторий»;
  - «Положение об аккредитованной лаборатории»
  - Руководство по качеству
  - Паспорт аккредитованной лаборатории
  - Протокол КХА



# С безопасными нанотехнологиями – к персонализированной медицине





**СПАСИБО  
ЗА ВНИМАНИЕ!**

