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

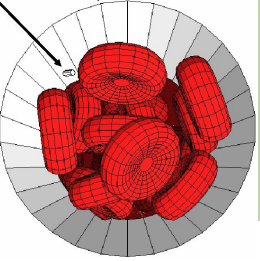
НАНОТЕХНОЛОГИИ – совокупность приемов и методов, применяемых при изучении, проектировании, производстве и использовании наноструктур, устройств и систем, включающих целенаправленный контроль и модификацию формы, размера, взаимодействия и интеграции составляющих их наномасштабных элементов (около 1-100 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.

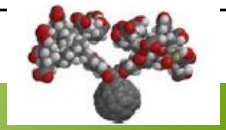
Цель нанотоксикологии: исследование риска, связанного со взаимодействием наноматериалов с организмом человека и окружающей средой.

Задачи нанотоксикологии:

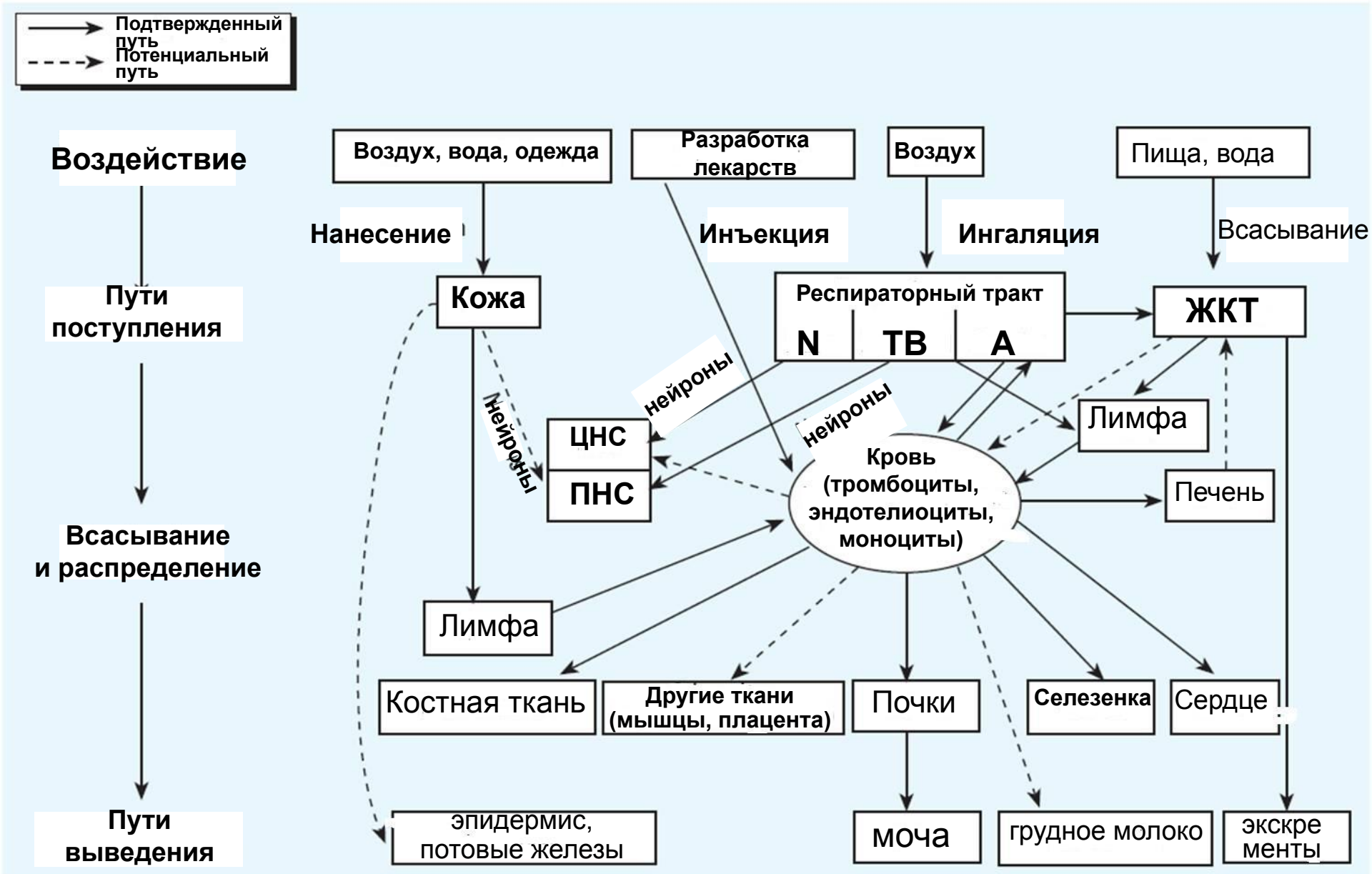
- исследование физических и химических свойств наночастиц;
- исследование движения, превращения и взаимодействия наночастиц в окружающей среде;
- идентификация и анализ наночастиц в окружающей среде;
- исследование влияния наночастиц на организм человека и экосистемы;
- исследование эффектов наночастиц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



Нанотехнологии для разработки инновационных лекарственных средств

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

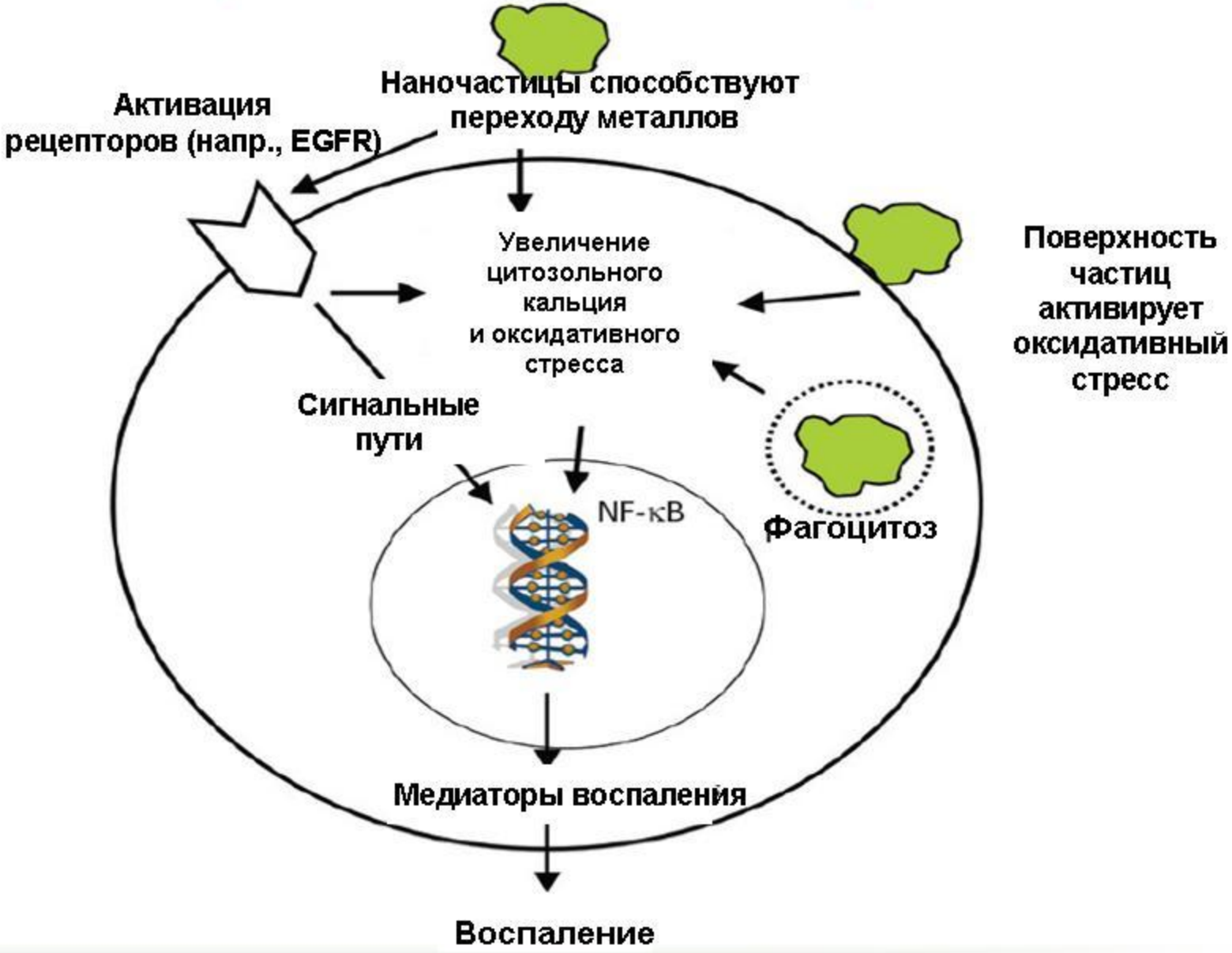
Биокинетика наночастиц в организме человека



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 (небиодеградируемый) Полилизогексилцвинакрилат (биодеградируемый)	Быстрый пассаж через эндотелий в кости, захват фагоцитами	Gibaud et al. 1994, 1996,1998

Механизмы токсичности наночастиц (Donaldson and Tran, 2002)



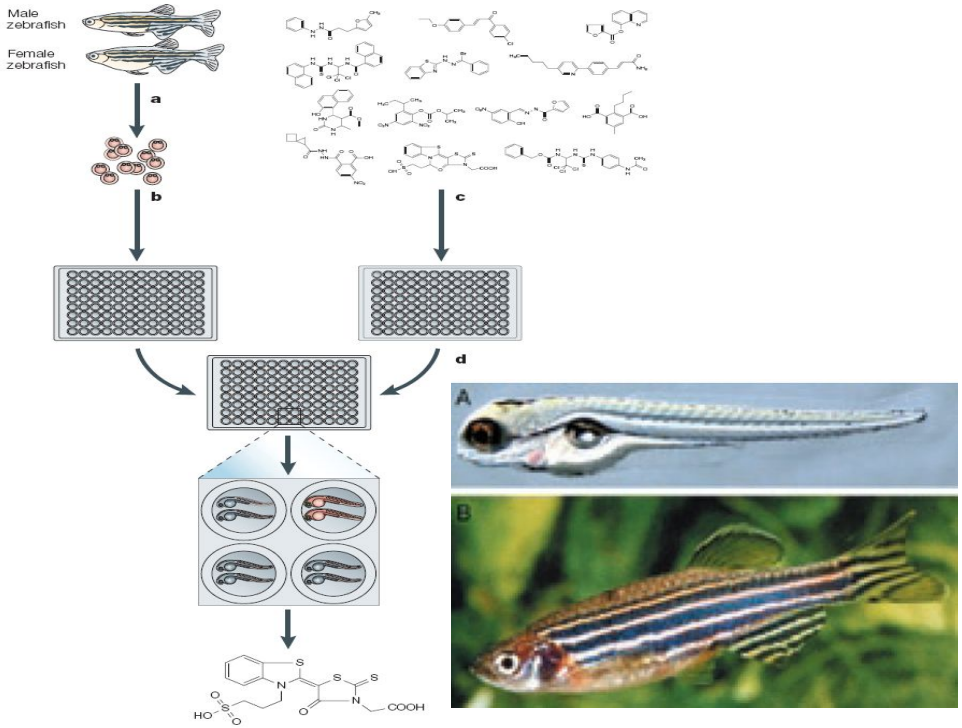
Биомоделирование в исследовании токсических эффектов наночастиц

Стандартные модели

(крысы, мыши, собаки и т.д.)

Новые биомодели

(zebrafish)



Преимущества

- Удовлетворительная
- схожесть с организмом человека

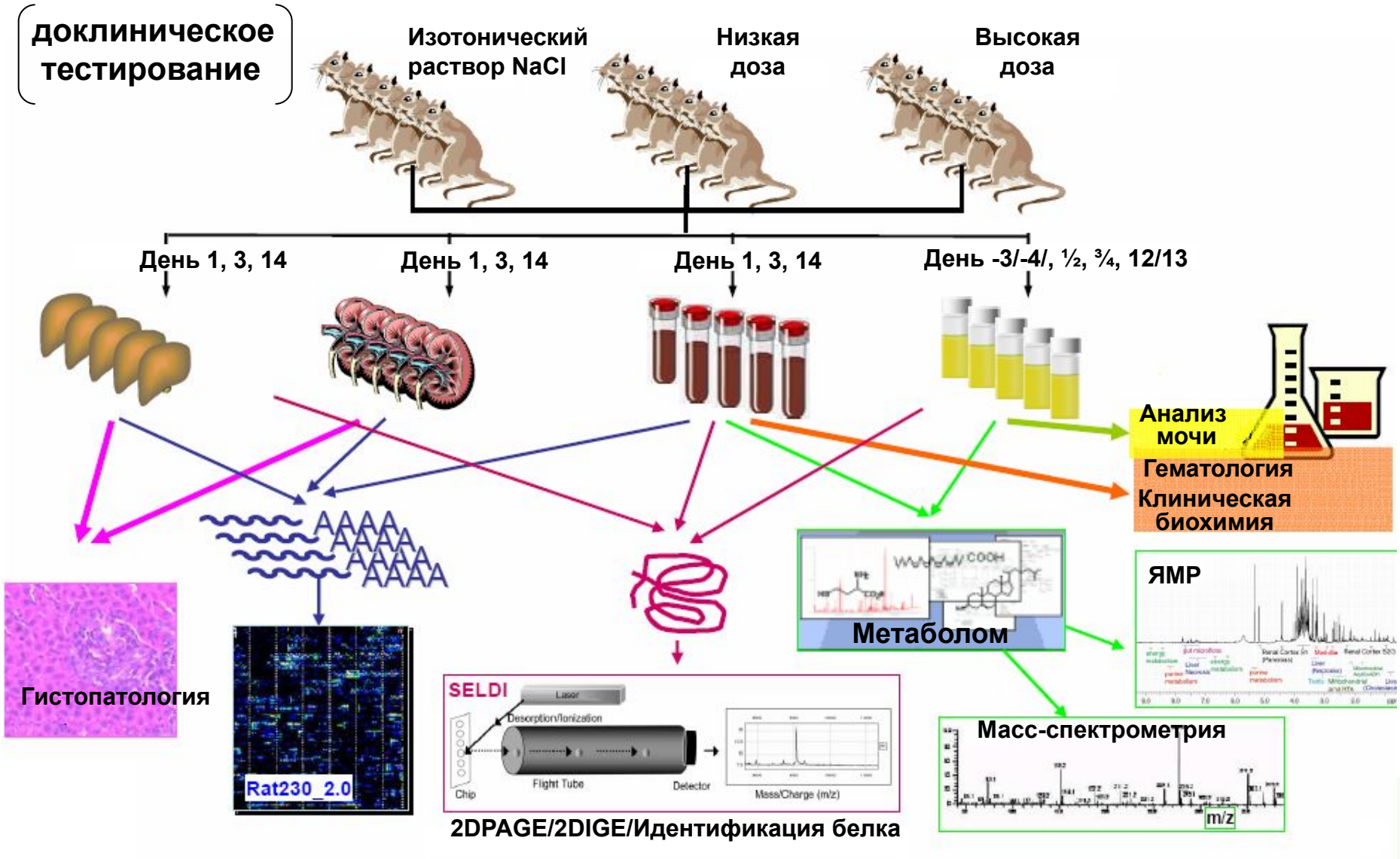
- - Низкая стоимость и широкий диапазон биомоделей
- Возможность проведения доклинических испытаний на ранней стадии
- Скрининг молекул, формирующих молекулярный паттерн токсических эффектов наночастиц

Недостатки

- Высокая стоимость и узкий диапазон
- Поздняя стадия доклинических испытаний

- Низкая схожесть с организмом человека, но высокие предиктивные возможности

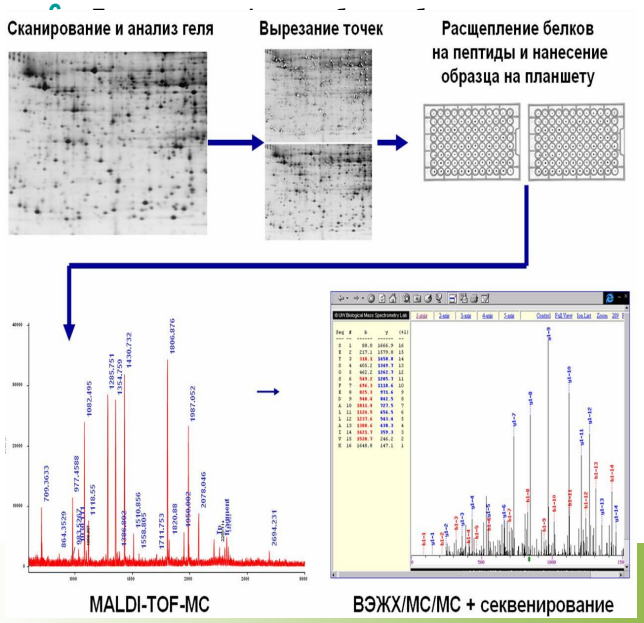
Методы биотестирования на ранних этапах разработки наночастиц



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



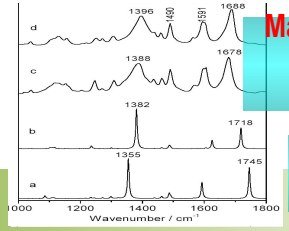
разработки фармакокинетической/ фармакодинамической модели лекарственного средства

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 (Kabs, Kel, Vd), 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



Программа исследований

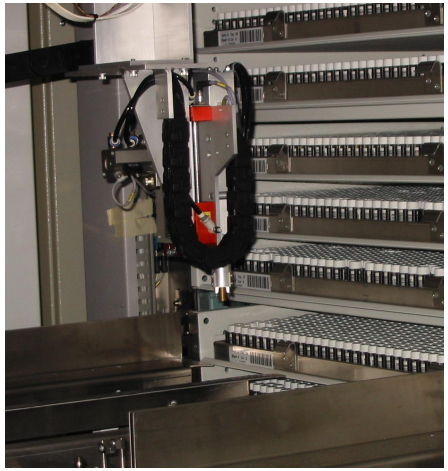
Подбор команды исследователей

Математическая статистика

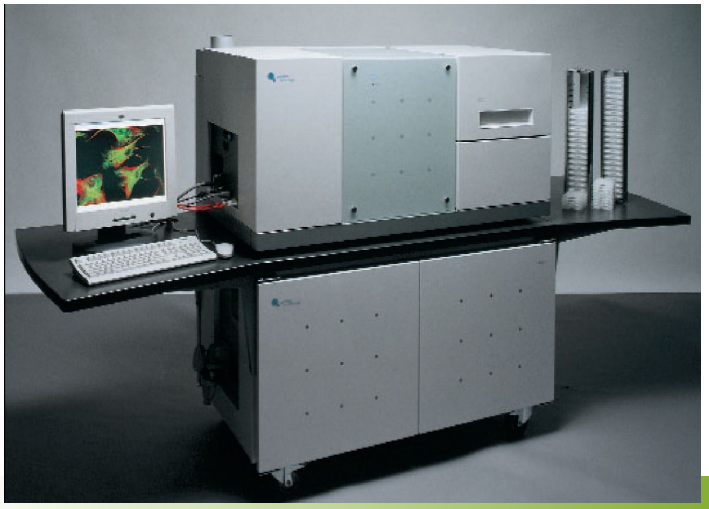
Окончательный отчет

Высокопроизводительный скрининг биомолекул – участников механизмов токсичности наночастиц

Более 100 000 образцов за 24 часа



Стандартизация пробоподготовки и хранение биообразцов

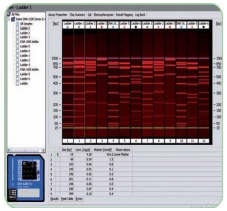


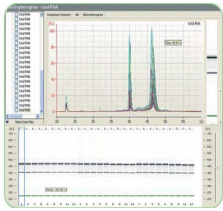
>50,000 данных в цветном формате за 24 часа

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.**

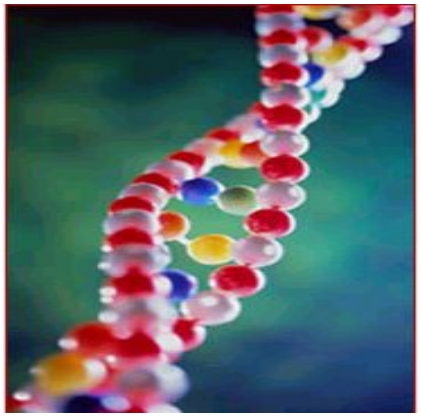
Быстрые технологии оценки токсичности наночастиц: микрофлюидные технологии





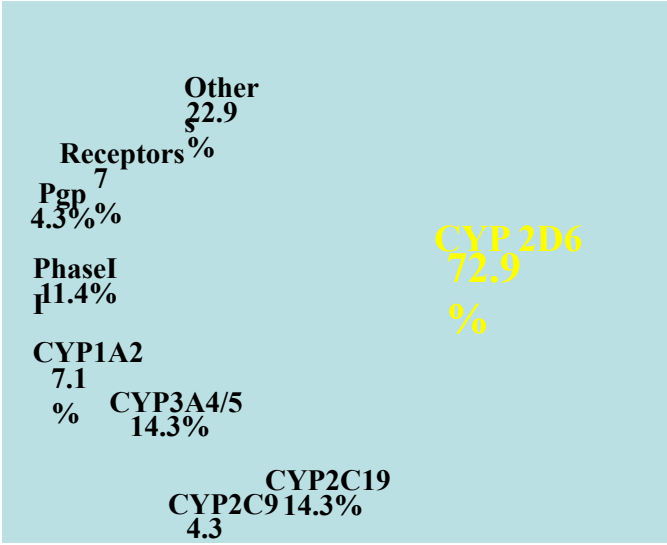
Методы тестирования токсических эффектов наночастиц

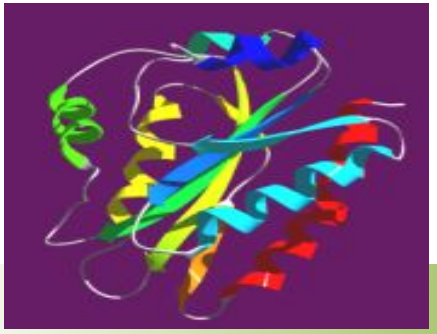
Методы тестирования активности и SNP ключевых ферментов



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)



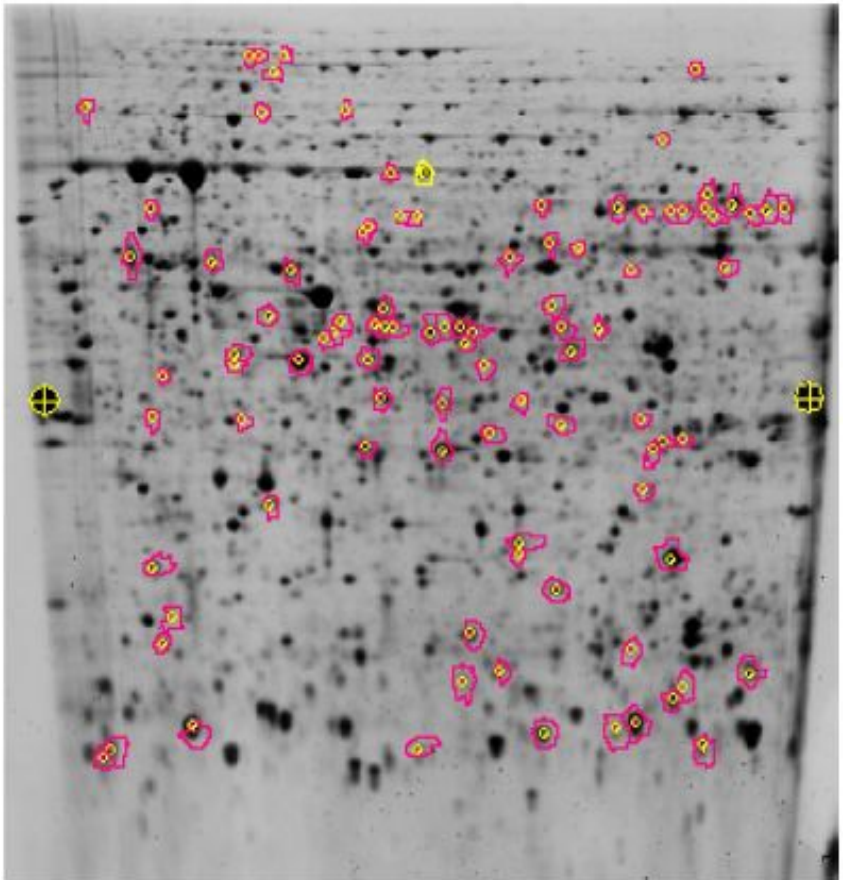


Исследование молекулярных профилей биообразца органа-мишени с помощью технологий токсикопротеомики (2DIGE, 2DPAGE/MS/MS)

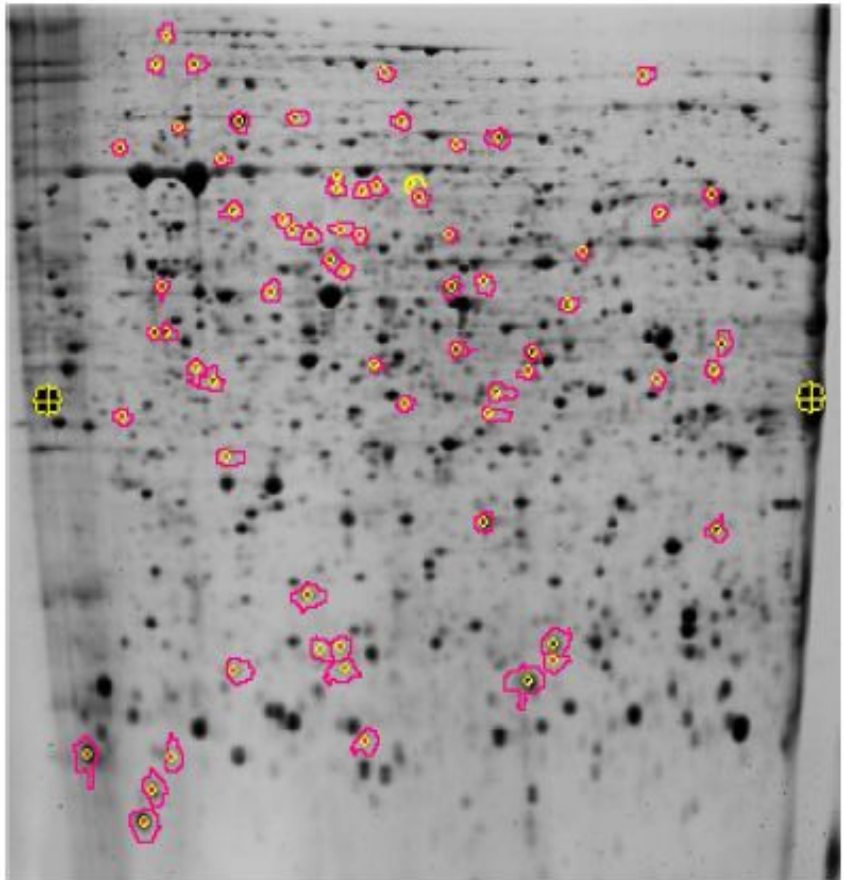
Технология LC/MS/MS

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

Европейский Центр по изучению безопасности лекарств

Генетические и физические карты

Генетическая экспрессия

Межмолекулярные взаимодействия

Идентификация генов и их структура

Геномные базы данных

Фармацевтическая протеомика

Метаболические патологические пути и клеточная регуляция

Секвенсинг РНК

Сравнительная геномика

PredToxProject

Трансгеномика

Структурная геномика

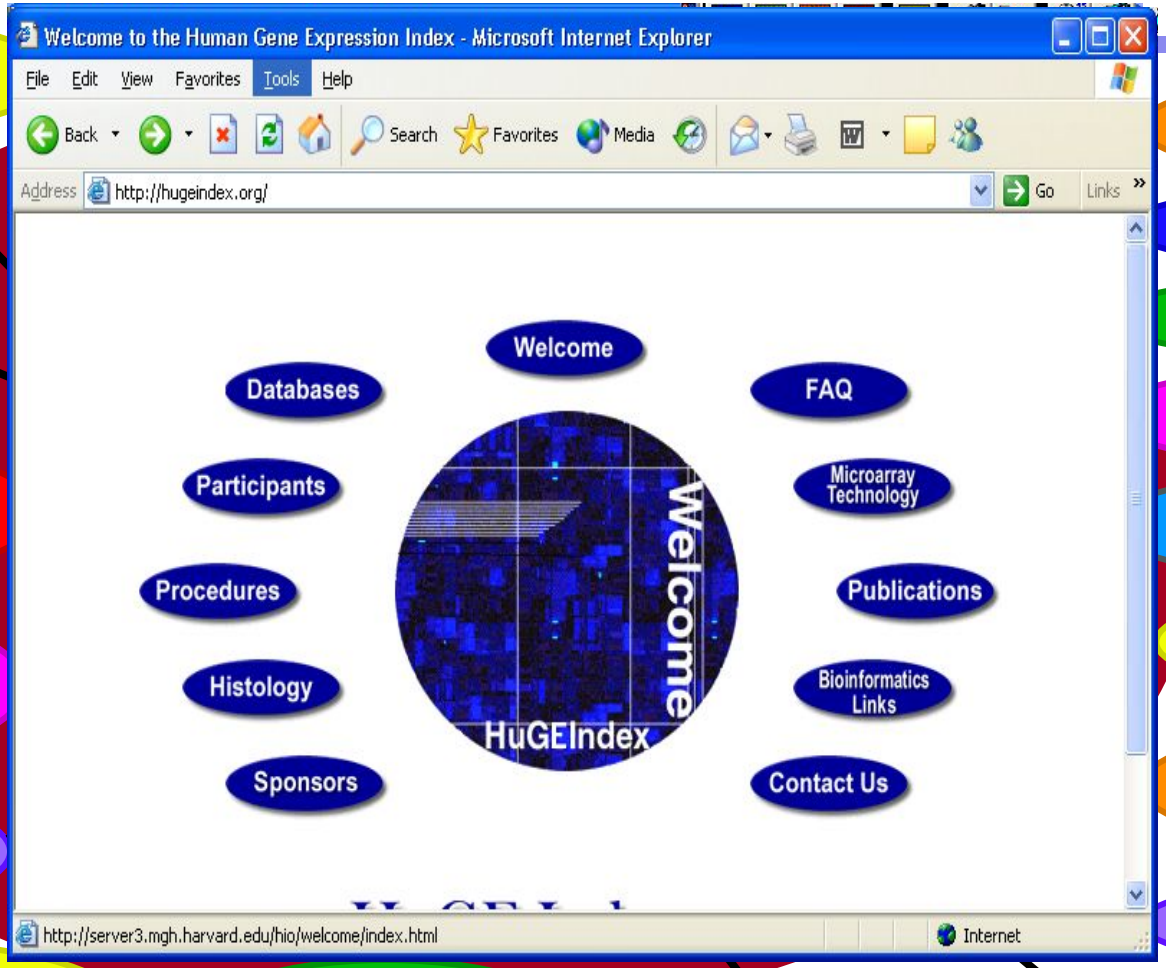
Секвенсинг мотивов белков

Протеомные базы данных

Секвенсинг ДНК

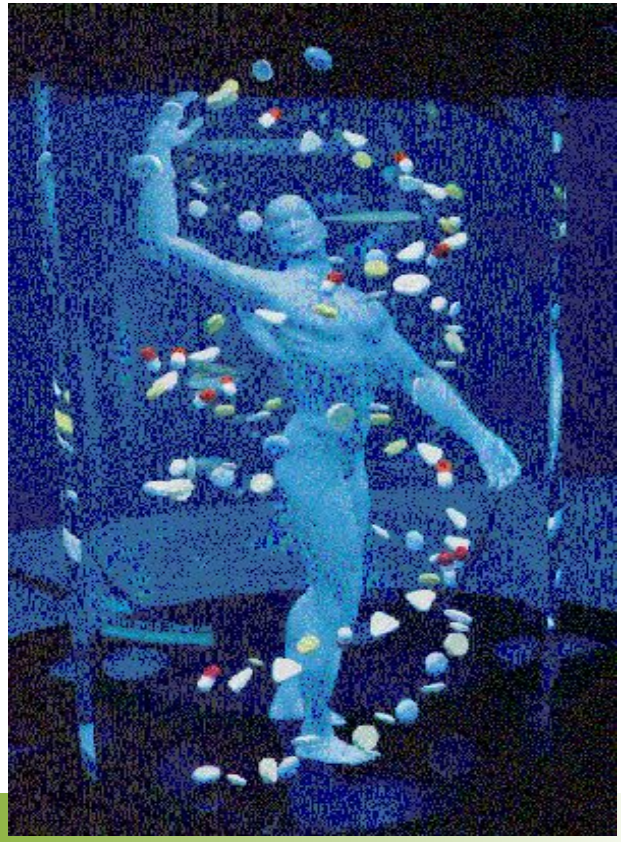
Системная токсикология и химические эффекты биосистем

Мутации

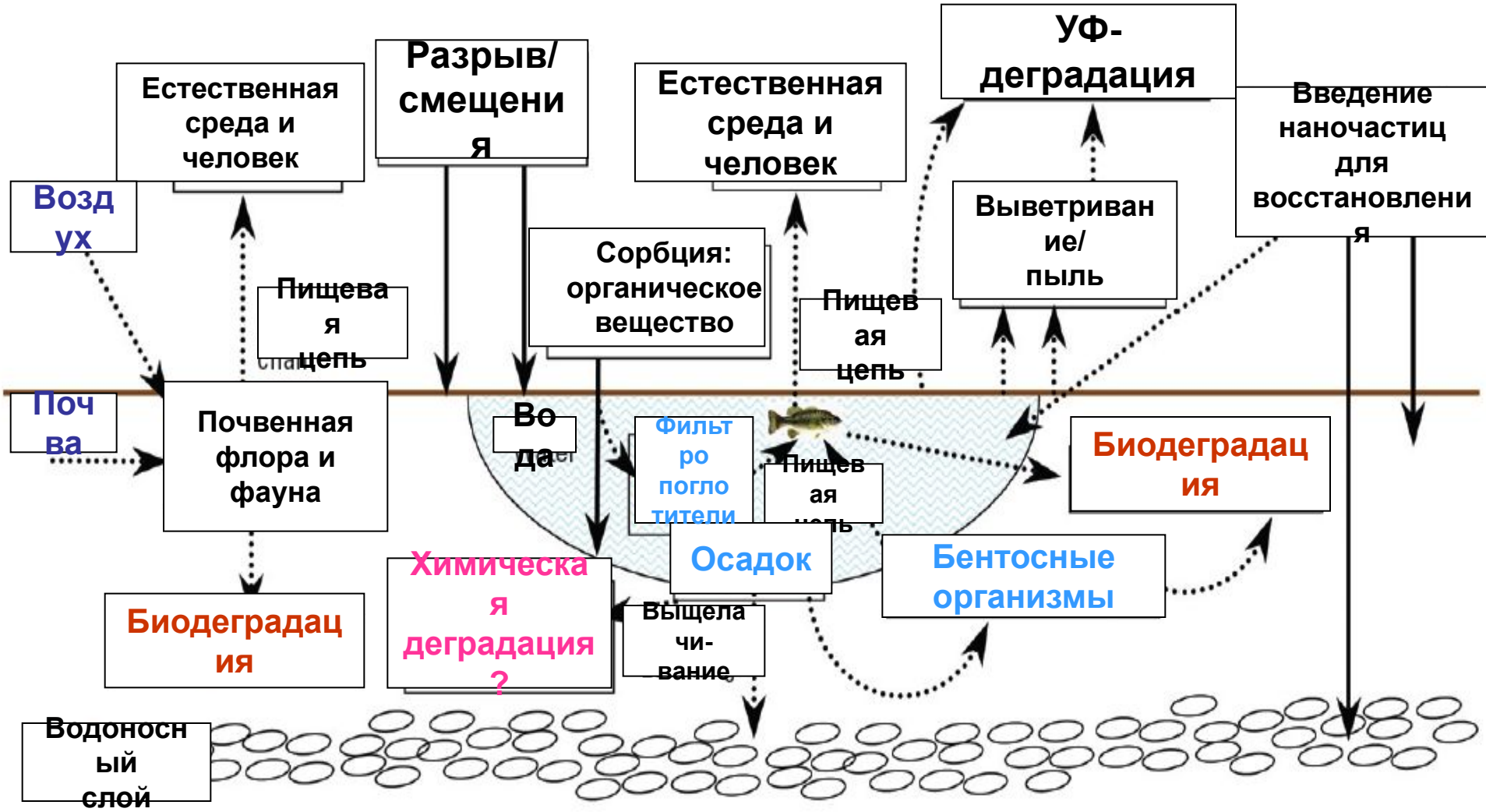


Информационно-диагностическая база по токсическим и побочным эффектам наночастиц

- 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

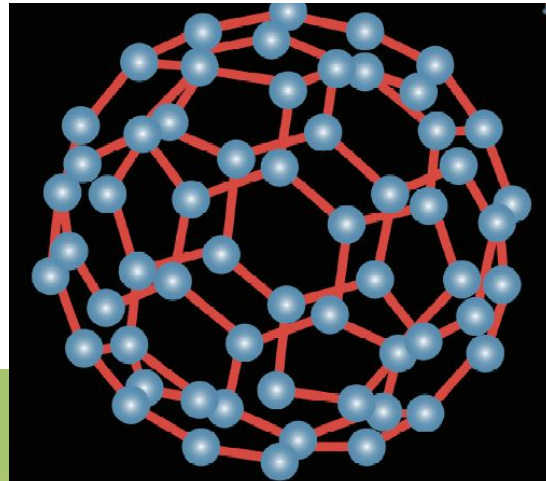
Нормативная база для успешной работы центров по регистрации токсических эффектов и побочных реакций на наночастицы

- 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.Белоусова.-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

- Наработка 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

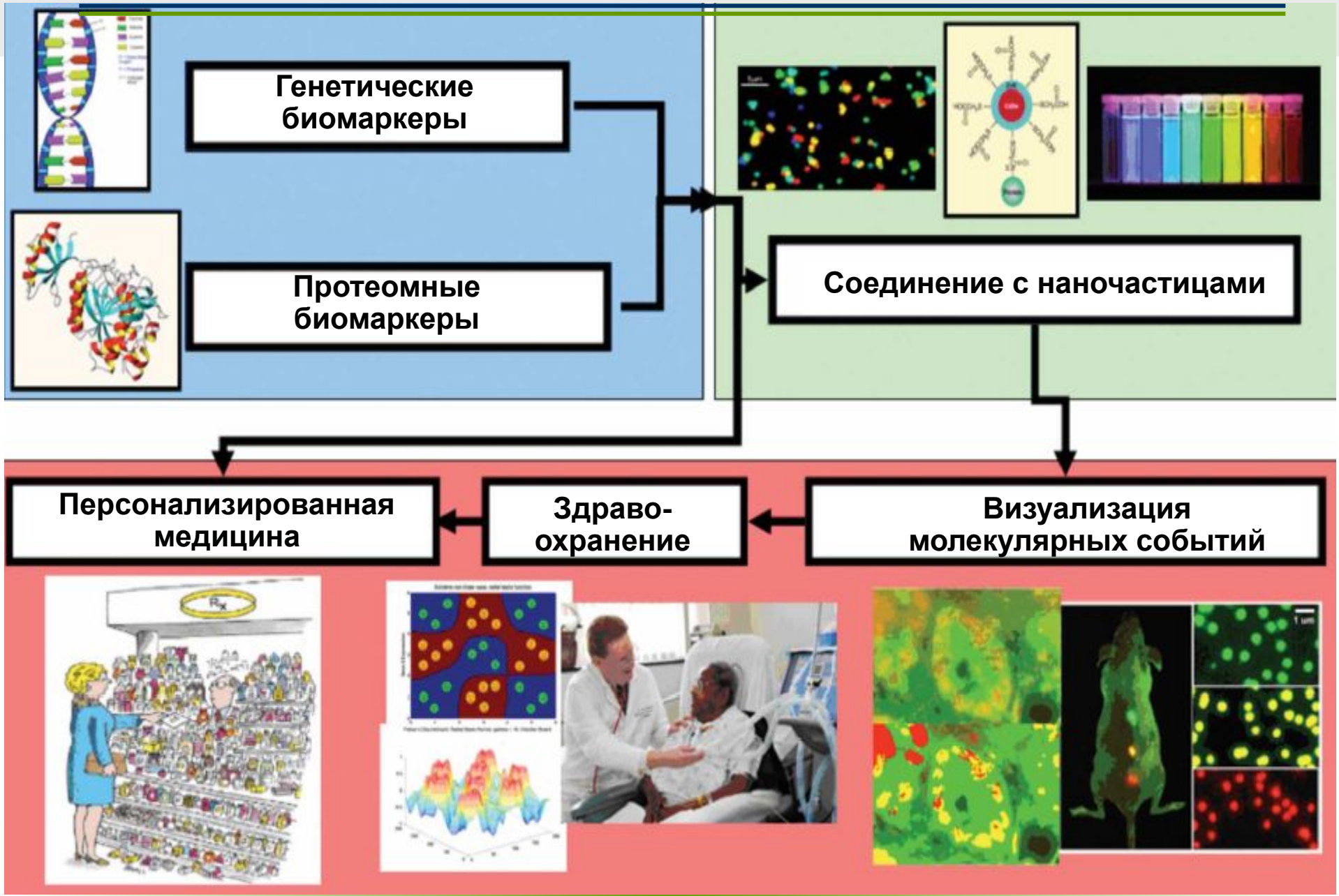
- Код работ и услуг
- 01.003 лабораторная диагностика (Приказ Минздрава России от 26.07.2002 № 238 «Об организации лицензирования медицинской деятельности»).
- 05.007 лабораторная генетика
- 03.019 клиническая фармакология
- 06.002 общественное здоровье и организация здравоохранения

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!