

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

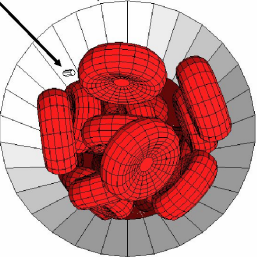
НАНОТЕХНОЛОГИИ – совокупность приемов и методов, применяемых при изучении, проектировании, производстве и использовании наноструктур, устройств и систем, включающих целенаправленный контроль и модификацию формы, размера, взаимодействия и интеграции составляющих их наномасштабных элементов (около 1-100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

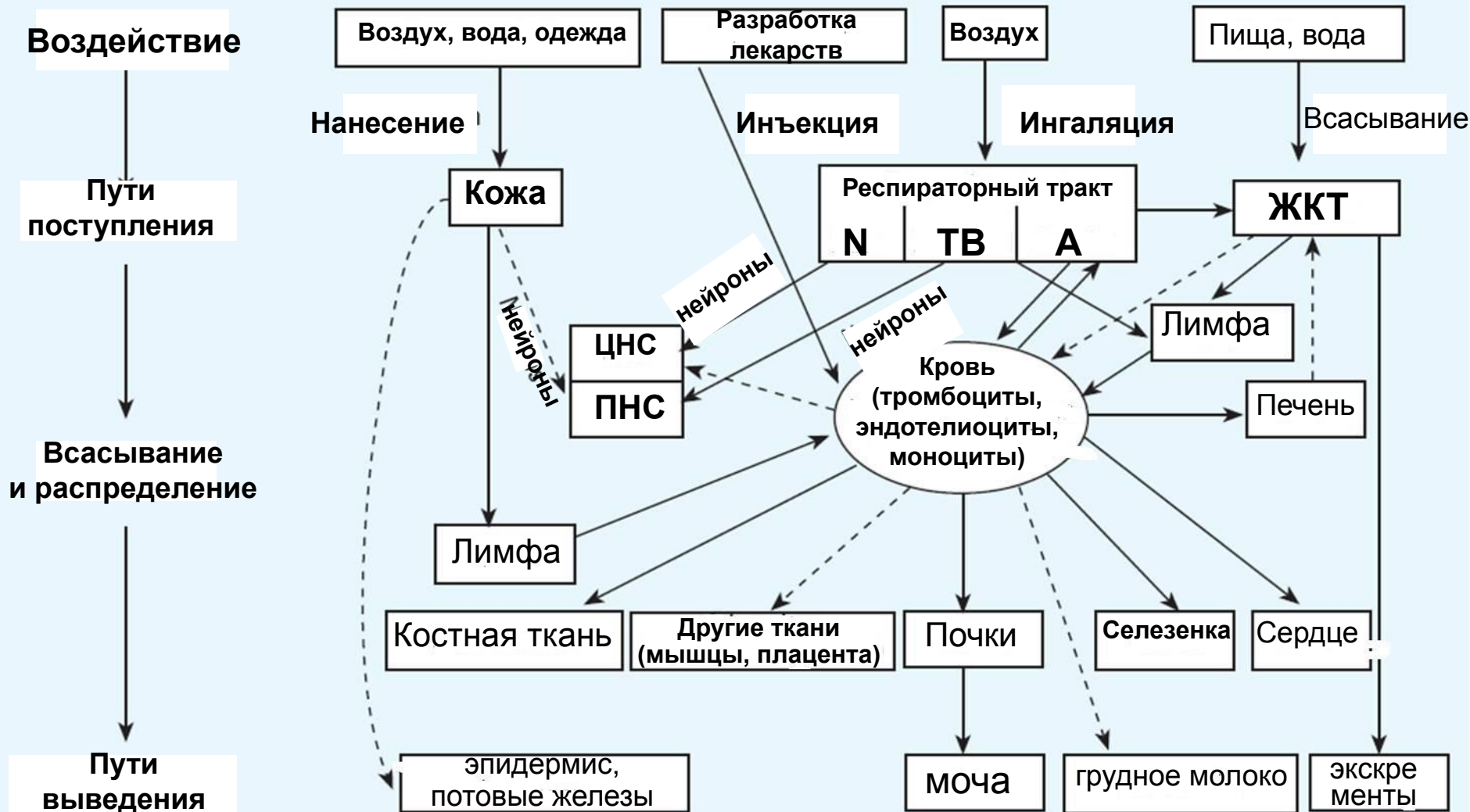
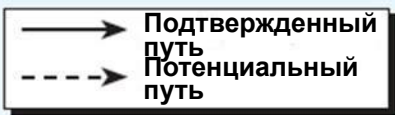
- исследование физических и химических свойств наночастиц;
- исследование движения, превращения и взаимодействия наночастиц в окружающей среде;
- идентификация и анализ наночастиц в окружающей среде;
- исследование влияния наночастиц на организм человека и экосистемы;
- исследование эффектов наночастиц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

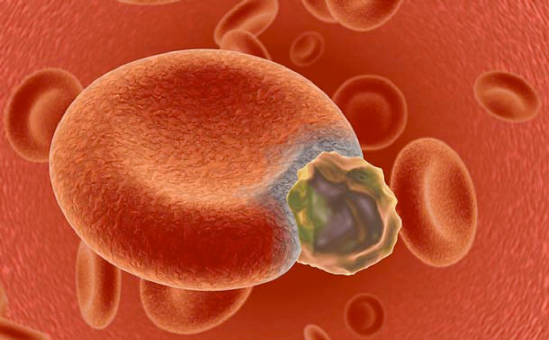


Нанотехнологии для разработки инновационных лекарственных средств

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

Биокинетика наночастиц в организме человека

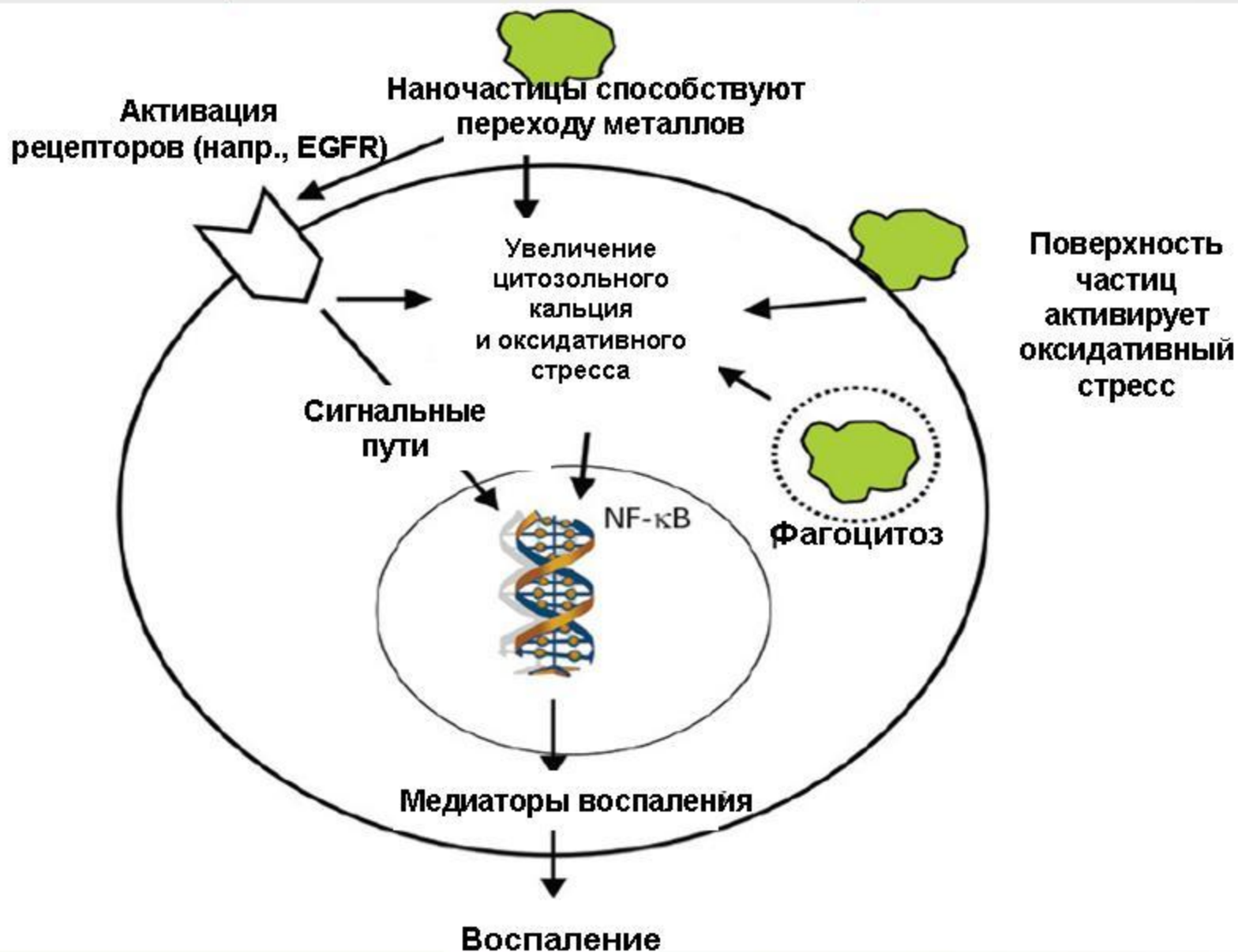




КИНЕТИКА NSP: КРОВЬ – КОСТНАЯ ТКАНЬ

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) Полилизогексилцвинкрилат (биodeградируемый)	Быстрый пассаж через эндотелий в кости, захват фагоцитами	Gibaud et al. 1994, 1996, 1998

Механизмы токсичности наночастиц (Donaldson and Tran, 2002)

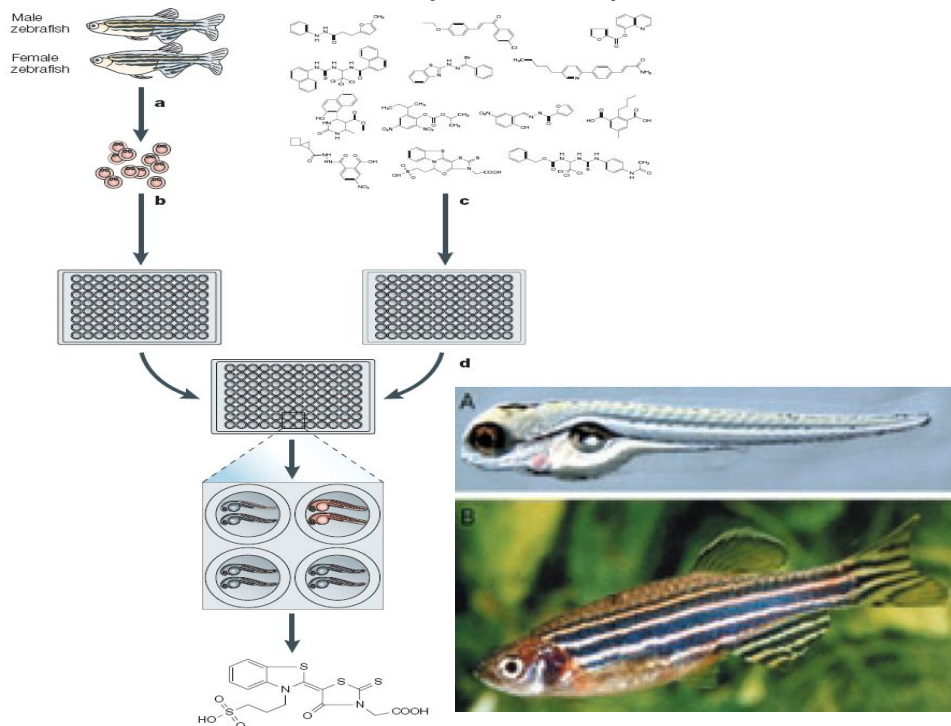


Биомоделирование в исследовании токсических эффектов наночастиц

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

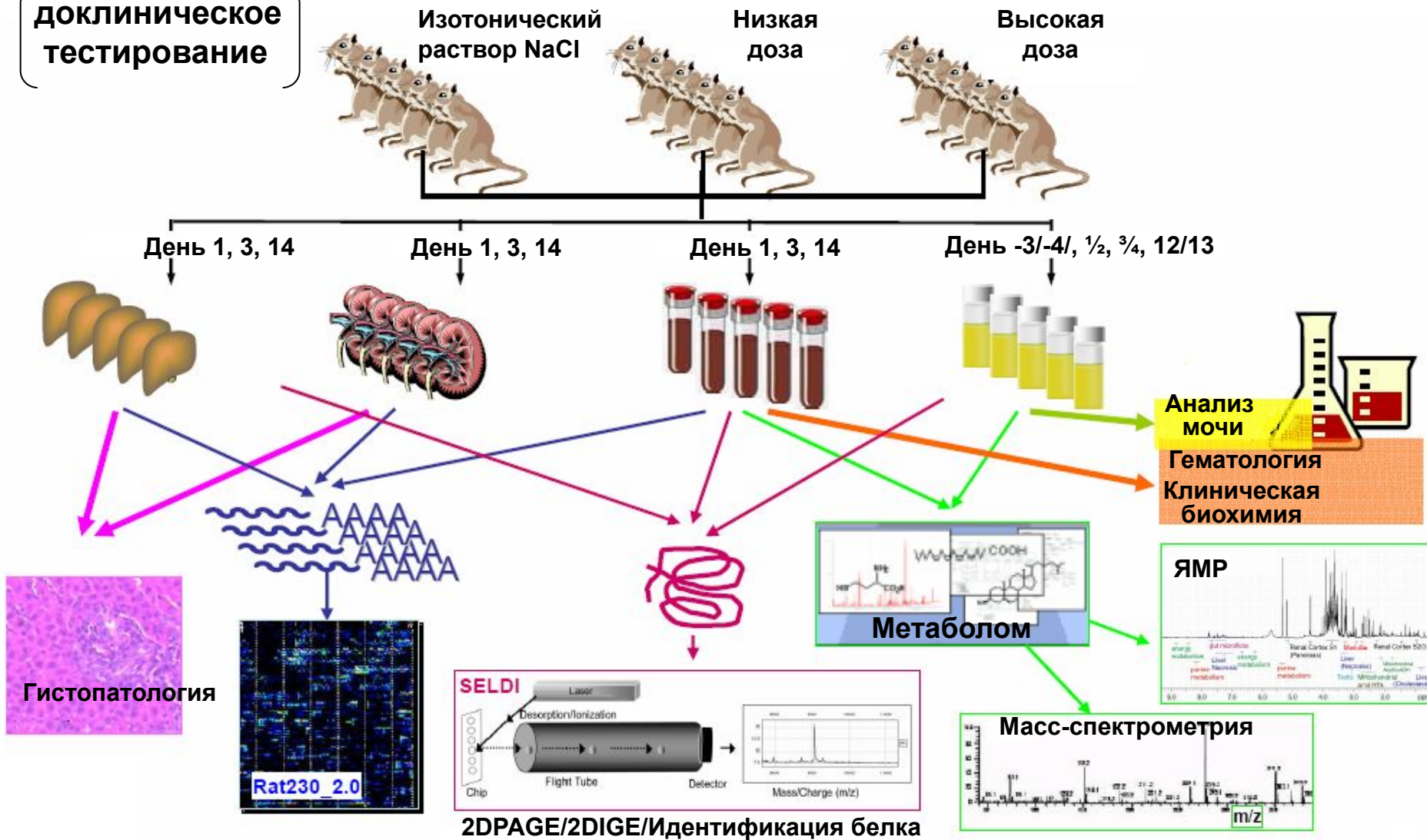
Недостатки

- 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

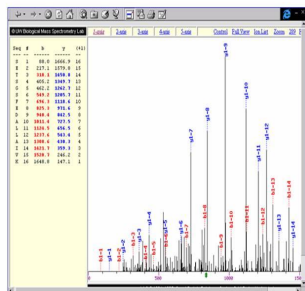
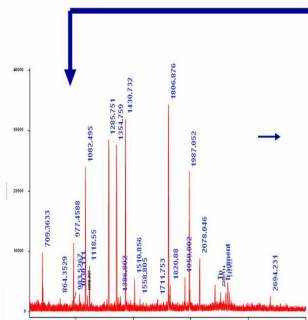
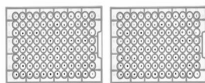
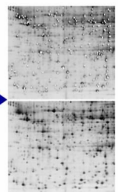
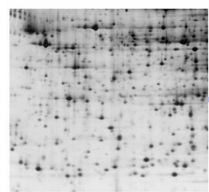
для токсикогеномных, токсикопротеомных исследований

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

Сканирование и анализ геля

Вырезание точек

Расщепление белков на пептиды и нанесение образца на планшеты



MALDI-TOF-МС

ВЭЖХ/МС/МС + секвенирование

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

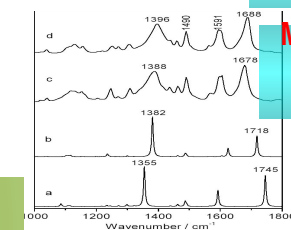
Блок-схема исследований по биоэквивалентности



Программа



исследования
Подбор
команды
исследователей

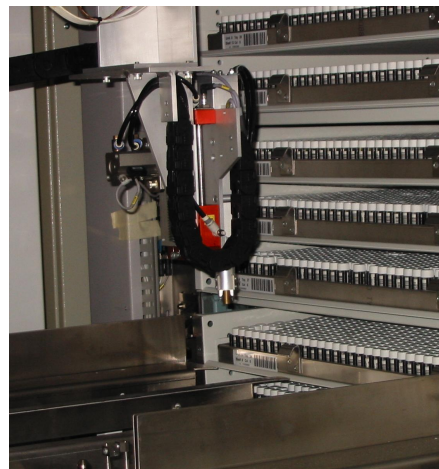


Математическая
статистика
Окончательный
отчет

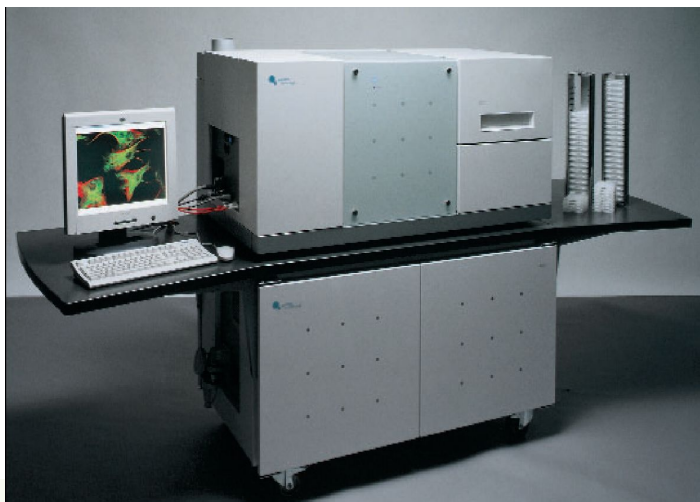
Высокопроизводительный скрининг биомолекул – участников механизмов токсичности наночастиц



Более 100 000 образцов за 24 часа



Стандартизация пробоподготовки и хранение биообразцов

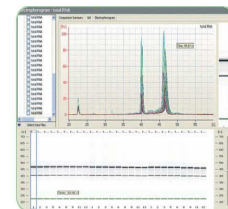
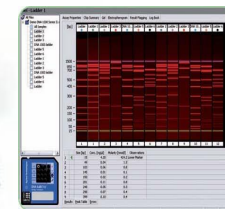


>50,000 данных в цветном формате за 24 часа

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



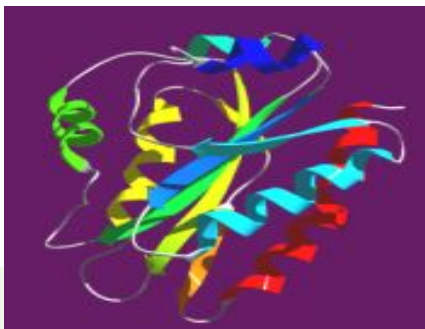
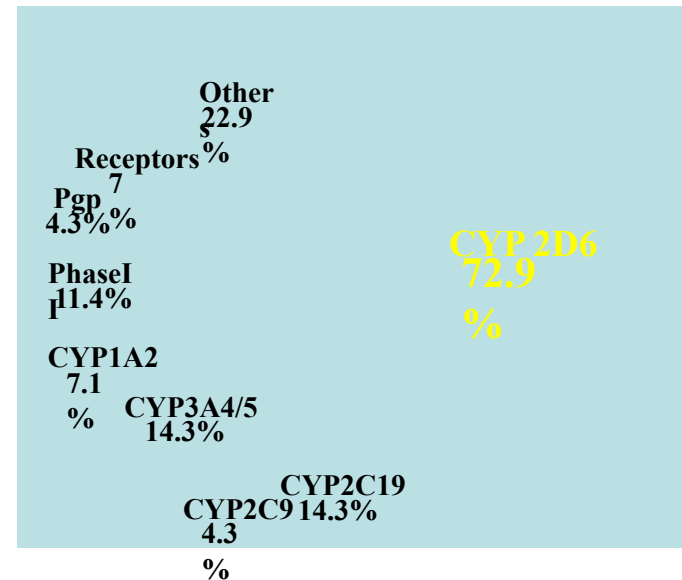
1. Исследование активности ферментов методами:

- 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)

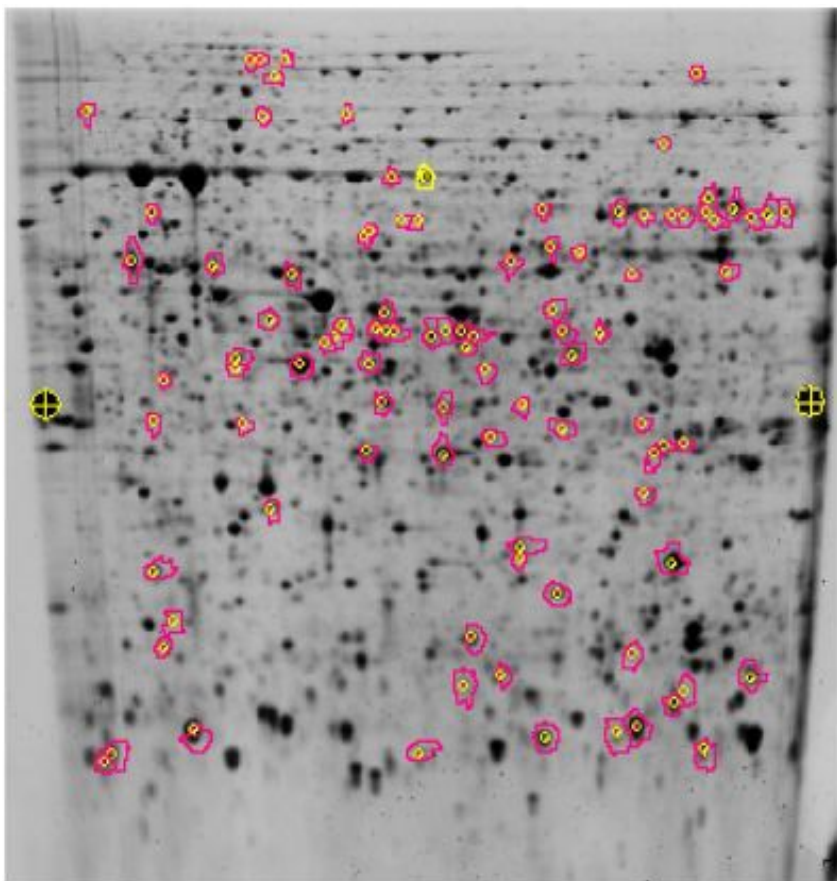


Исследование молекулярных профилей биообразца органа-мишени с помощью технологий токсикопротеомики (2DIGE, 2DPAGE/MS/MS)

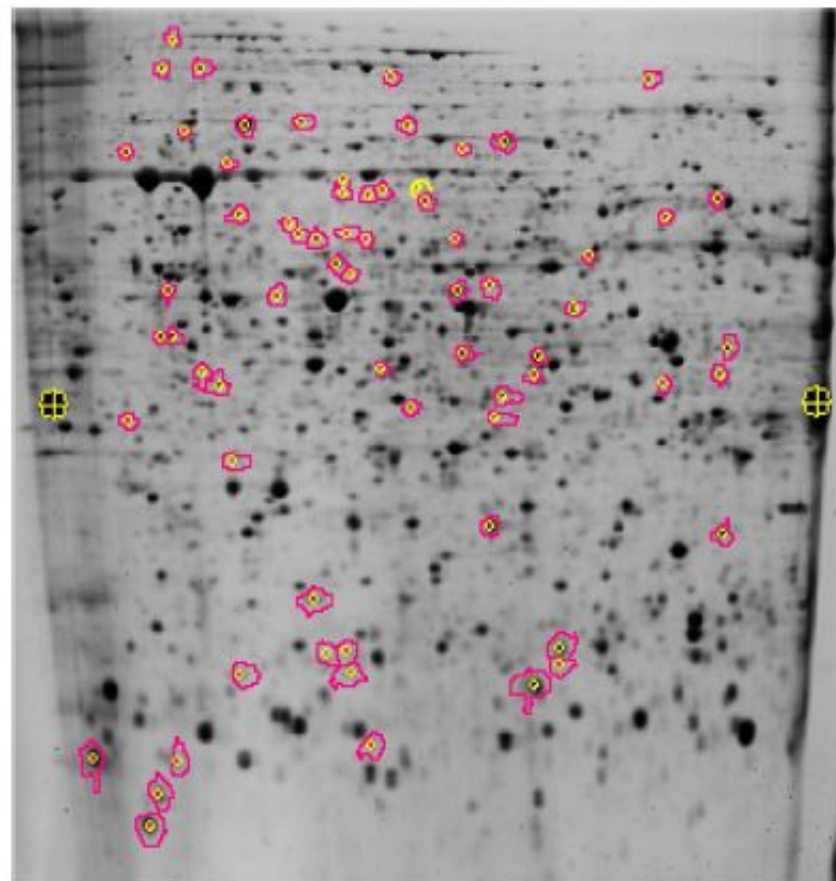
Технология LC/MS/MS

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

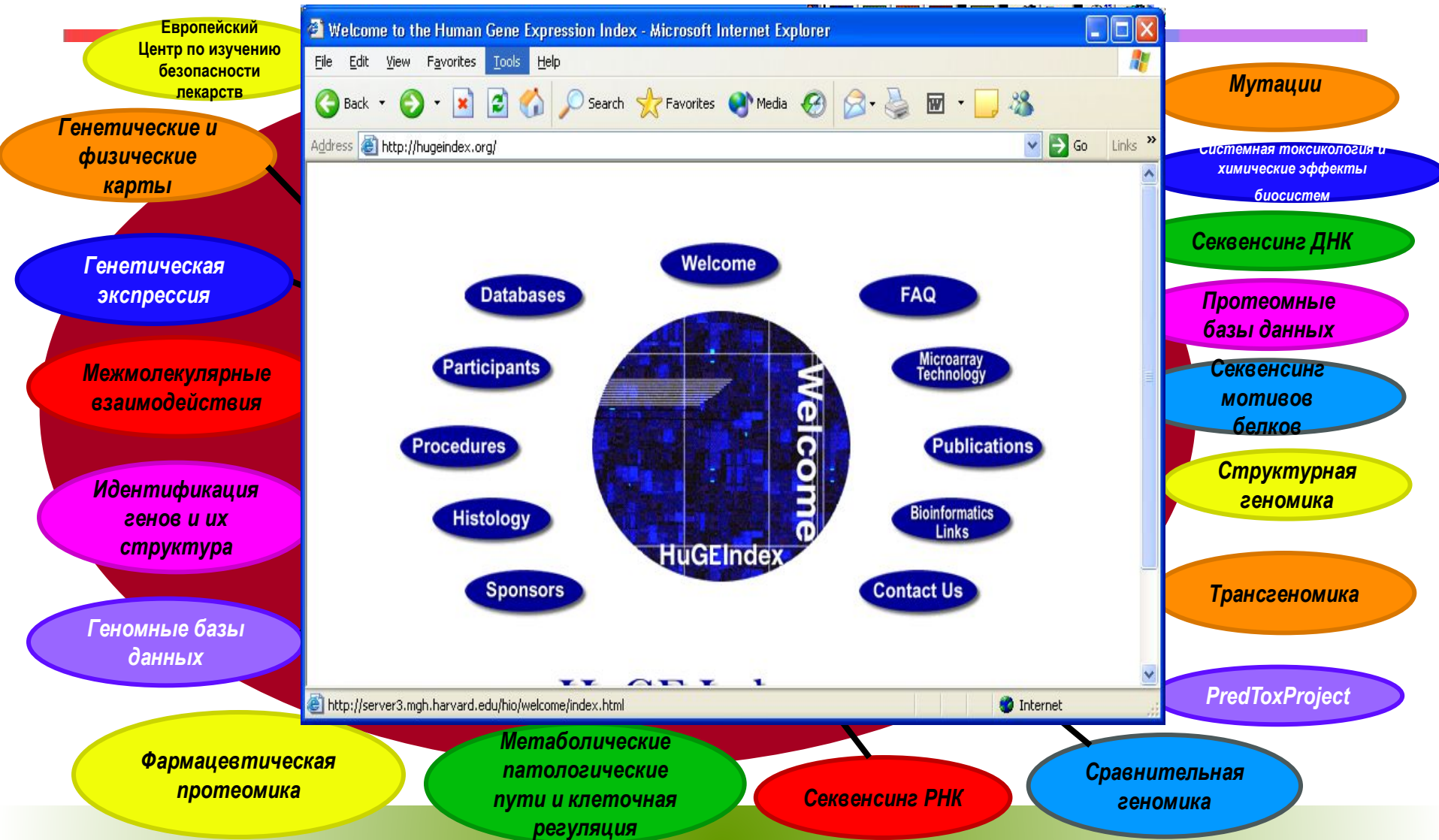
Точки белков с увеличившейся
экспрессией



Точки белков со
сниженной экспрессией

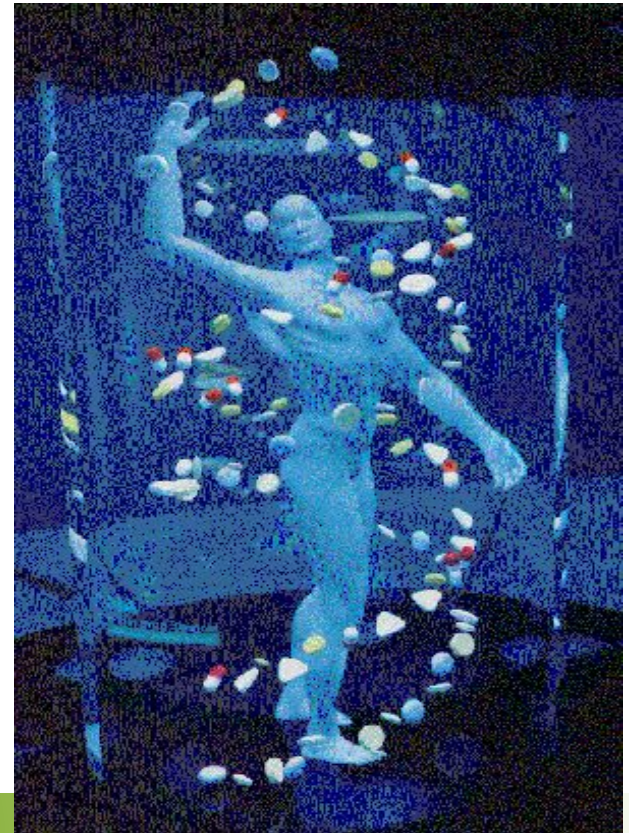


Компьютерные базы данных сети INTERNET по токсикогеномике, токсикопротеомике, токсикометабономике

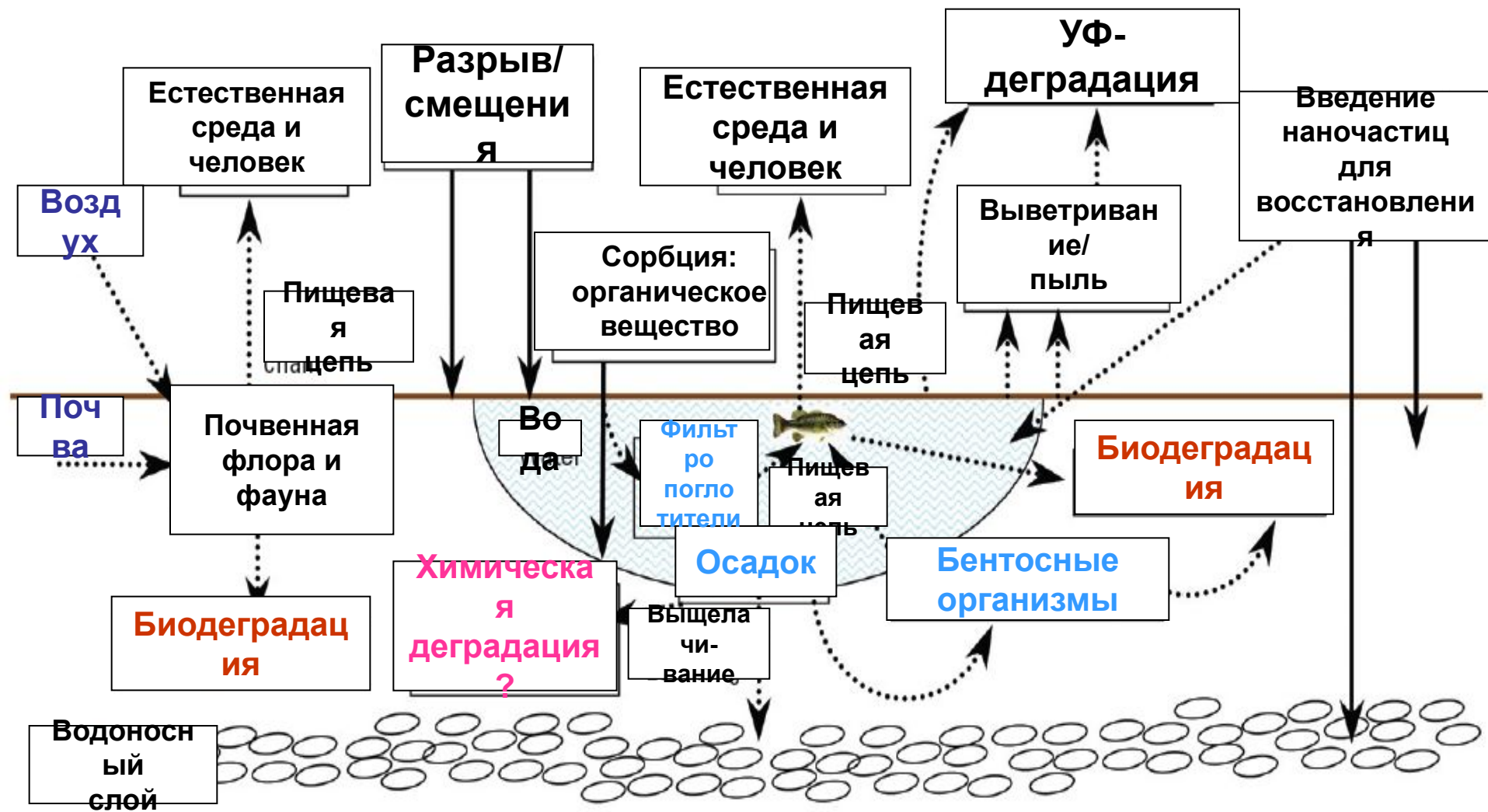


Информационно-диагностическая база по токсическим и побочным эффектам наночастиц

- 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.

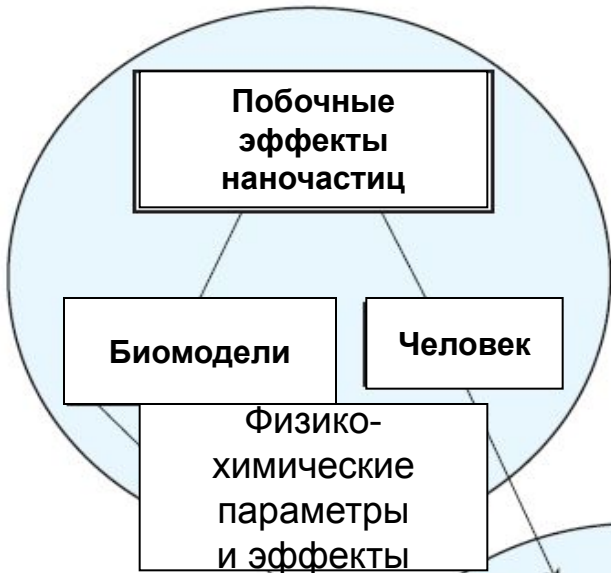


УЧАСТИЕ НАНОЧАСТИЦ В ОСНОВНЫХ ЭТАПАХ КРУГОВОРОТА ВЕЩЕСТВ В ОКРУЖАЮЩЕЙ СРЕДЕ



Наноматериалы и влияние их на окружающую среду

Идентификация опасности



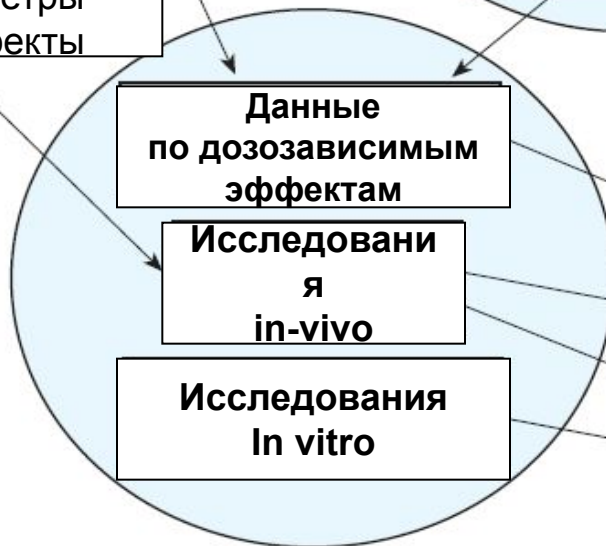
Оценка воздействия



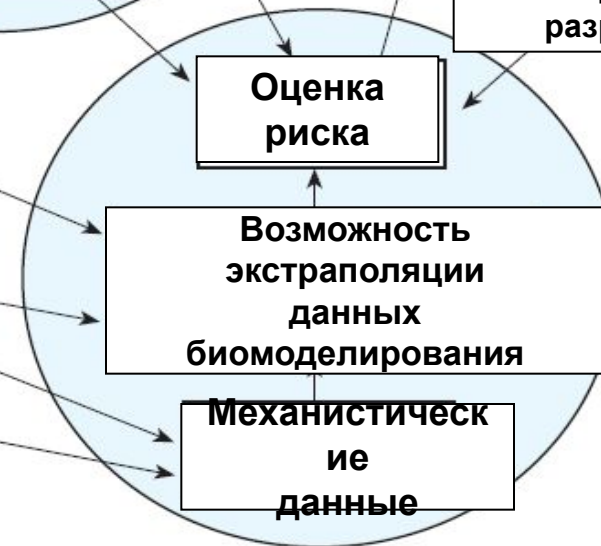
Управление риском



Дозозависимые воздействия



Характеристика риска



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

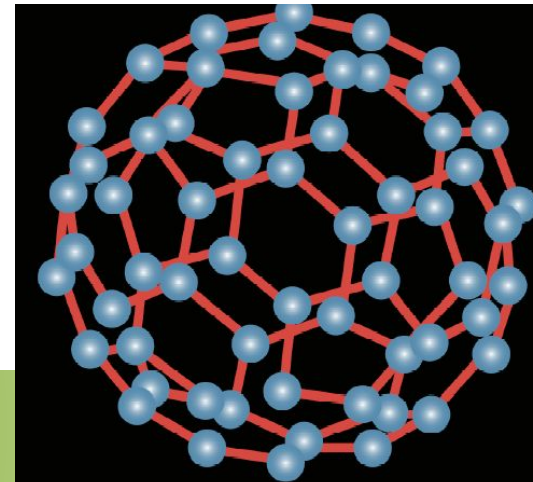


- ❖ Закон РФ «О лекарственных средствах»
- ❖ Нормативная база и предложения в области нанотехнологий в РФ (ГК Роснано).
- ❖ Письмо Департамента государственного контроля качества, эффективности, безопасности лекарственных средств и медицинской техники Минздрава России от 26 июля 2001г. №291-22/91 «О 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.



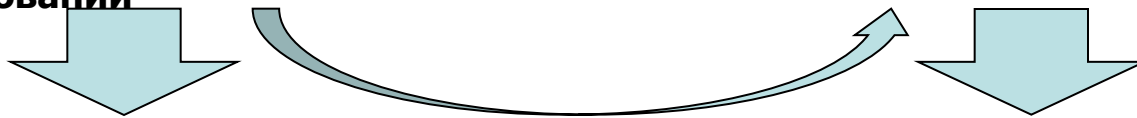
Этапы организации лаборатории токсикологии

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

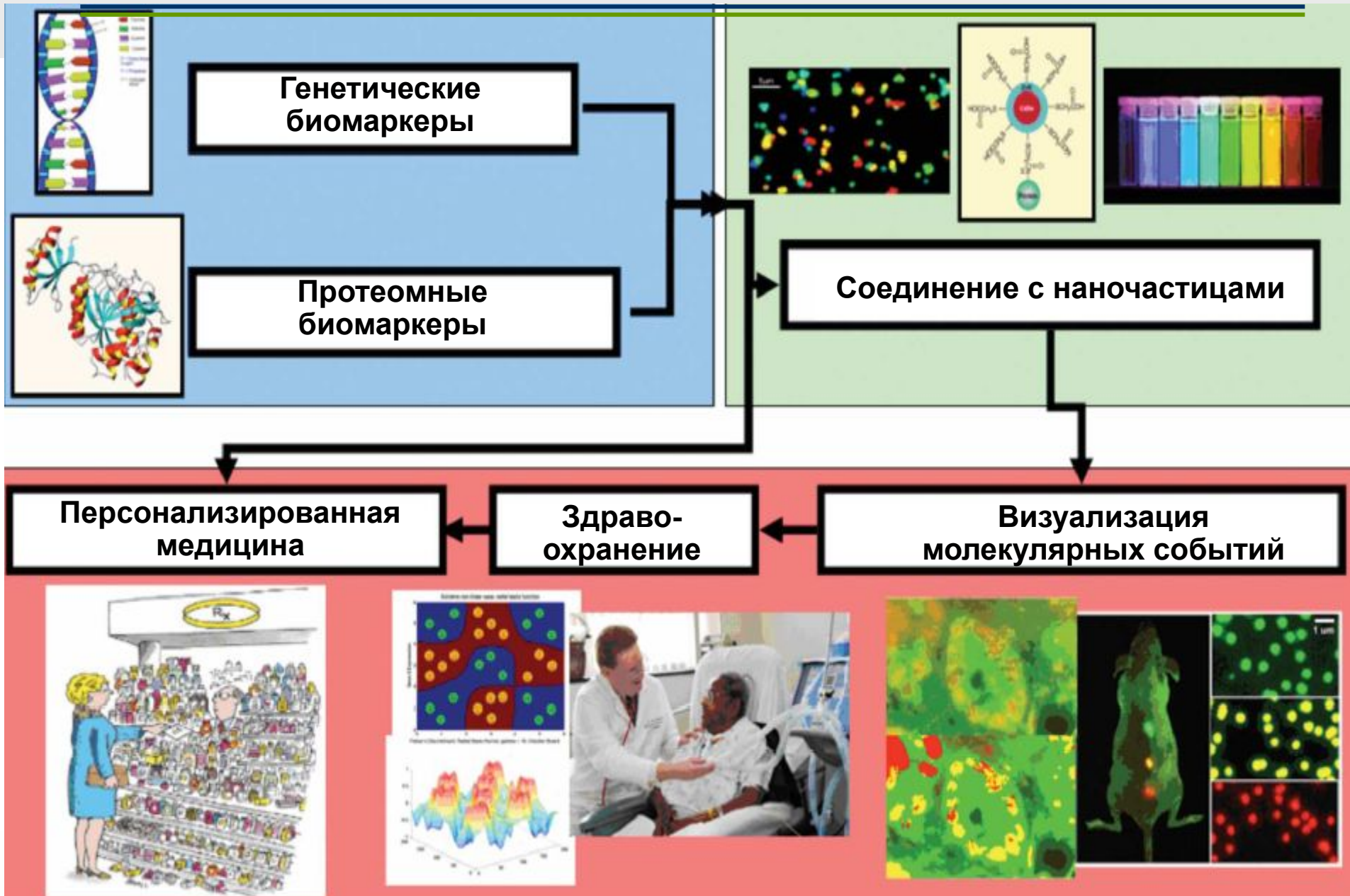
- Код работ и услуг
- 01.003 лабораторная диагностика (Приказ Минздрава России от 26.07.2002 № 238 «Об организации лицензирования медицинской деятельности»).
- 05.007 лабораторная генетика
- 03.019 клиническая фармакология
- 06.002 общественное здоровье и организация здравоохранения

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!**

