

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«Восточно-Сибирский институт медико-экологических
исследований»

Разработка новых подходов к оценке безопасности нанокompозитов



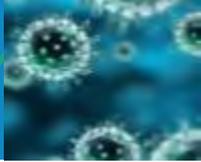
Докладчик:

Новиков Михаил Александрович

*к.б.н., научный сотрудник лаборатории
биомоделирования и трансляционной
медицины*

Ялта, 2018

Актуальность исследования



Отсутствие единого протокола исследования токсичности наночастиц и наноматериалов

ПАРАДОКС

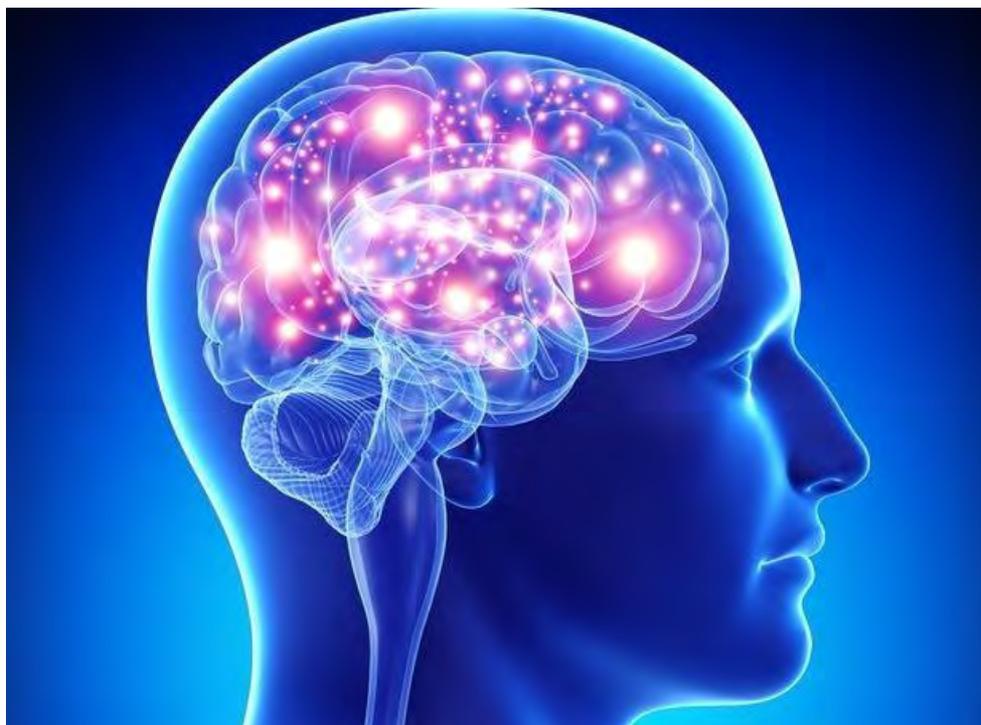
ОДУ наносеребра = ПДУ серебра
в воде водоёмов *0,05 мг/л* в воде водоёмов

Необходимы новые методические подходы, учитывающие клеточные и внутриклеточные эффекты действия



Цель работы:

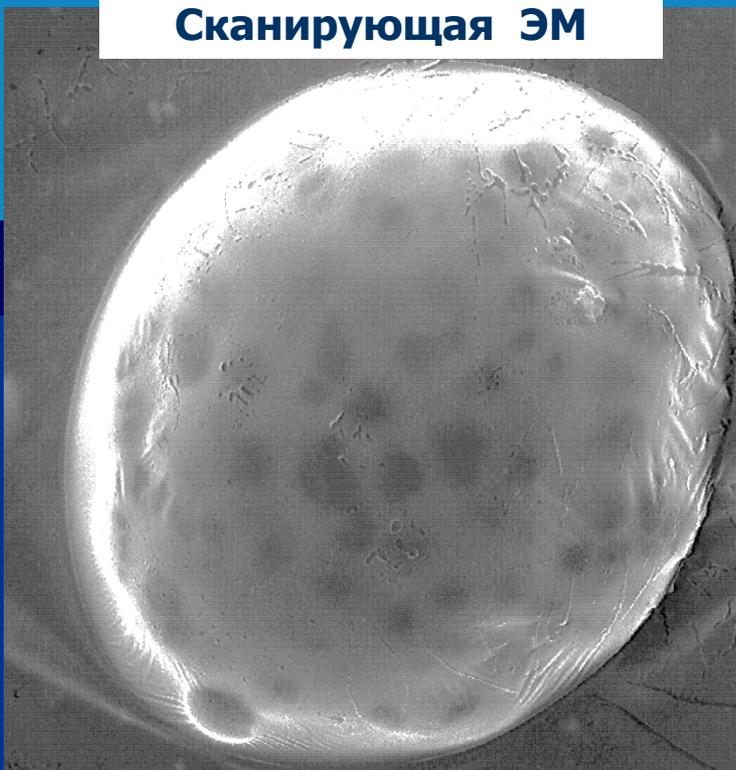
**разработка новых методических подходов
для оценки нейротоксичности
нанокompозитов**



Физико-химическая характеристика матрицы и нанокомпозитов

Макромолекула арабиногалактана с инкапсулированными наночастицами

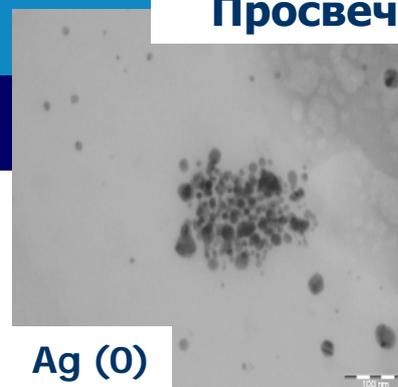
Сканирующая ЭМ



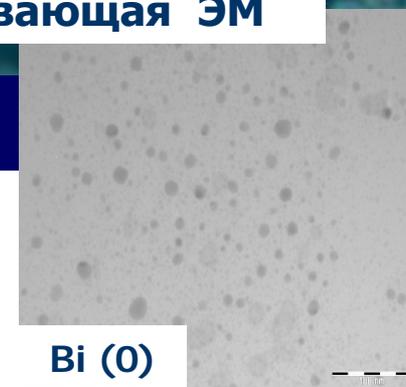
$d \approx 200 \text{ nm}$

Наночастицы внутри макромолекулы арабиногалактана

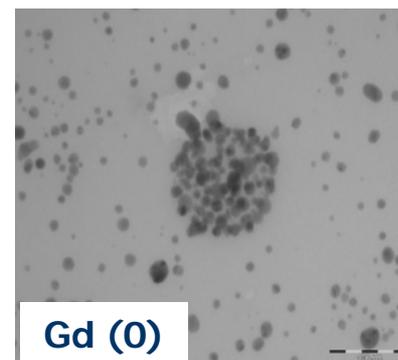
Просвечивающая ЭМ



Ag (0)



Bi (0)



Gd (0)

$d \approx 2-8 \text{ nm}$

% содержание металлов – 3%



Результаты определения LD50 исследуемых нанобиоконпозитов

Согласно ГОСТ 12.01.007-76

Вид эксперимента: **острый**

Способ введения: **внутрижелудочный**

Дозы: в диапазоне от 1500 до 5000
мг/кг

Вид животных: **мыши белые
беспородные**

Пол: **самцы и самки**

Масса: **18-20 г.**



AgAG
BiAG > **5000 мг/кг**
GdAG

**IV класс
опасности**
(малоопасное
вещество)



Проведение экспериментальных исследований

Вид животных: **крысы белые б/п**

Пол: **самцы**

Возраст: **3-4 месяца**

Вид эксперимента: **подострый**

Способ введения: **внутрижелудочный**

Продолжительность затравки: **9 дней**



ГРУППА AgAG

(доза 500 мкг Ag на 1 кг массы по 0,5 мл)

N=20

ГРУППА BiAG

(доза 500 мкг Bi на 1 кг массы по 0,5 мл)

N=20

ГРУППА GdAG

(доза 500 мкг Gd на 1 кг массы по 0,5 мл)

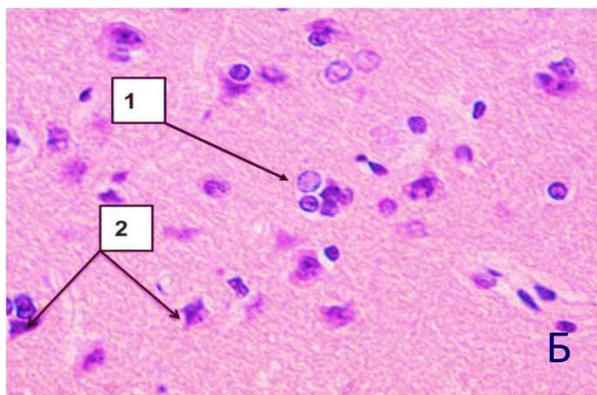
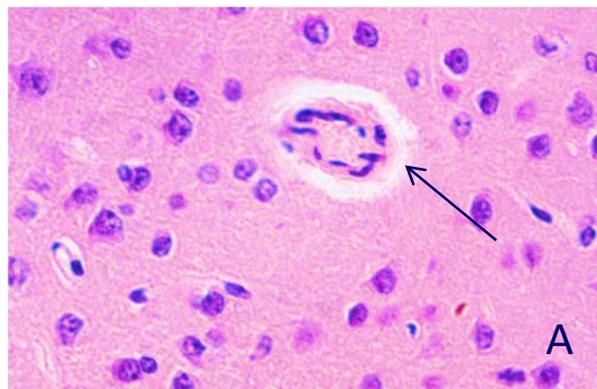
N=20

ГРУППА
КОНТРОЛЬ
H₂O (дист)
N=20

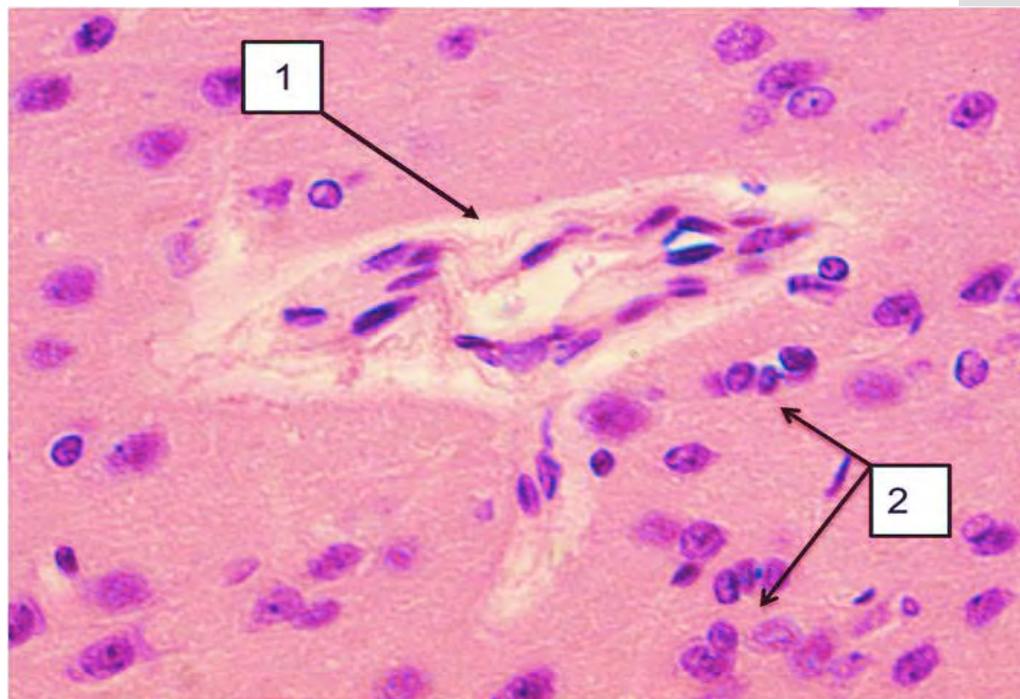
ГРУППА
АГ
0,5 мл
N=20

Методы:
морфологический
морфометрический
иммуногистохимический
генетический
электр.-микроскопич.

Морфологическое исследование коры головного мозга при воздействии AgAG



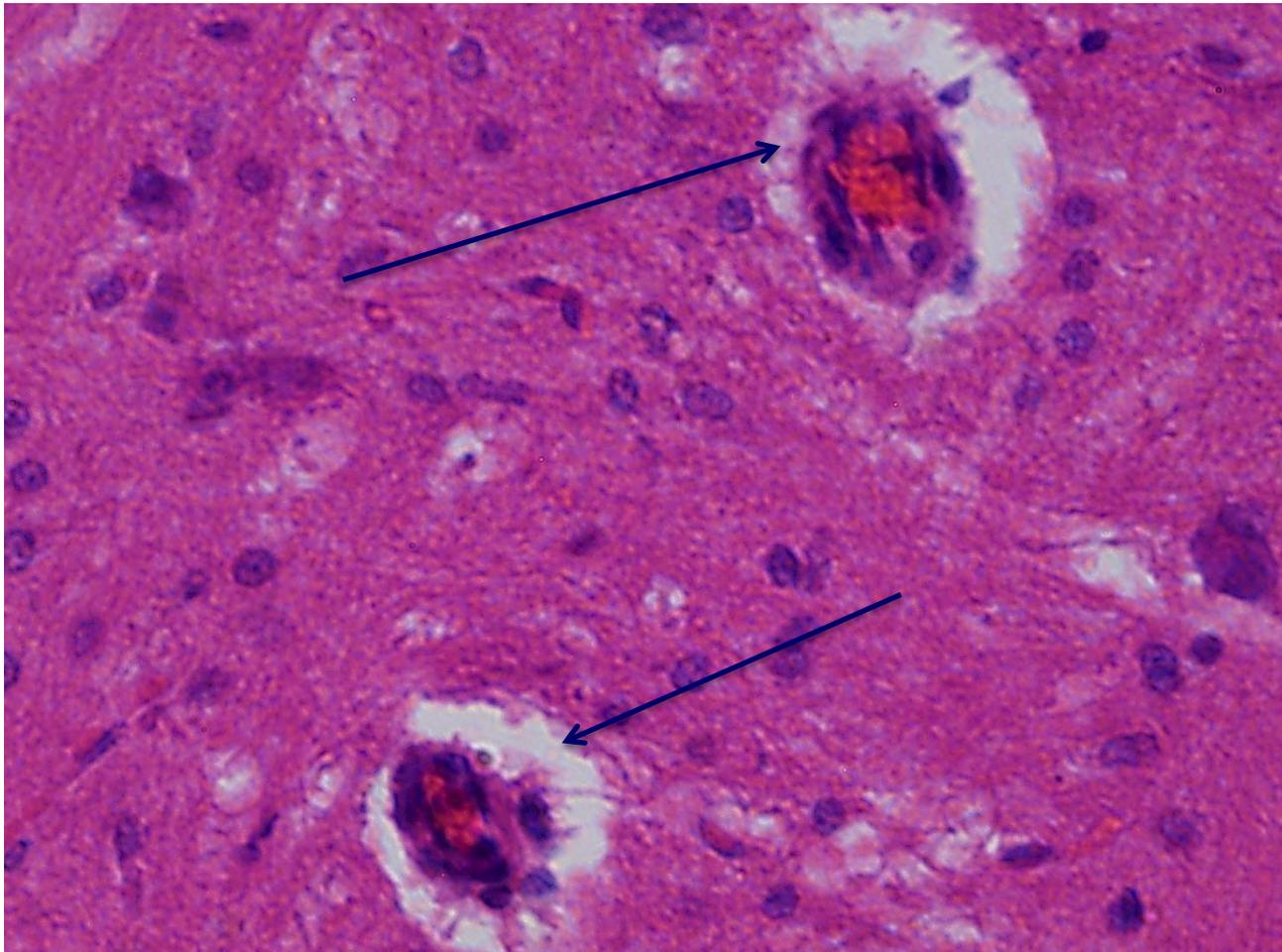
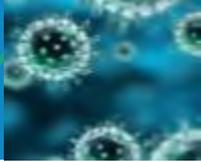
Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы AgAG: А - Расширение периваскулярных пространств, стенка артерии утолщена, рыхлая, миоциты и эндотелиоциты набухшие (стрелка), Б - 1 – нейрофагия; 2 – тёмные нейроны. Окраска гематоксилин-эозином Ув. ×400



Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга животных группы AgAG: 1 – расширение периваскулярных пространств, стенка артерии утолщена, рыхлая, миоциты и эндотелиоциты набухшие; 2 – нейрофагия. Окраска гематоксилин - эозином. Ув. ×400

Реакция белых крыс при внутривенном введении вновь синтезированного нанобиокомпозита на основе частиц Ag(0) и арабиногалактана / М.А. Новиков, Е.А. Титов, Л.М. Соседова, Л.А. Остроухова и др. // Химико-фармацевтический журнал. - 2014. - Т. 48. - № 6. - С. 33-36

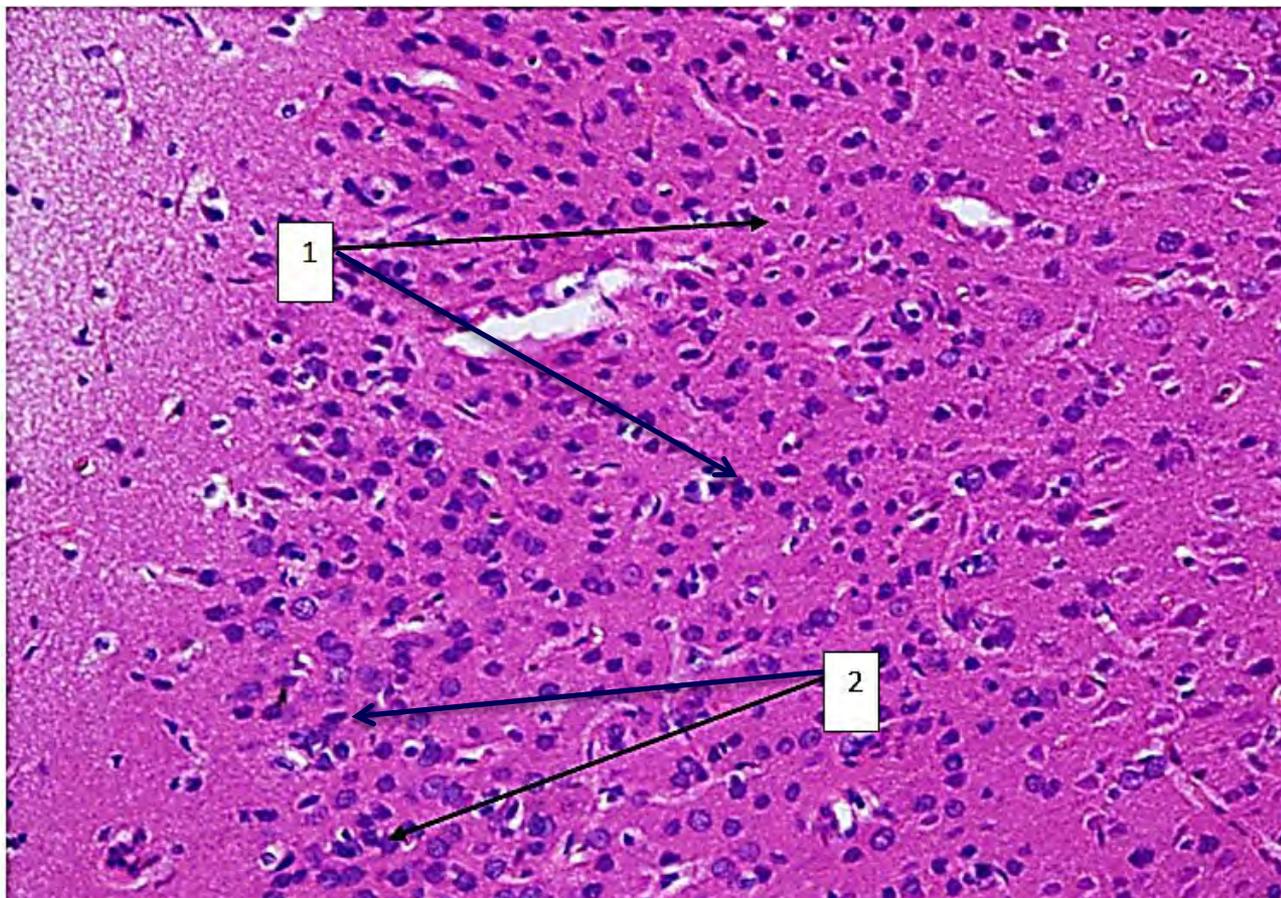
Морфологическое исследование коры головного мозга при воздействии ВиАГ



Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга при воздействии ВиАГ. Периваскулярный отёк сосудов, разрыхление миоцитов сосудистой стенки (↑). Окр. гематоксилин-эозин. Ув. X 400.



Морфологическое исследование коры головного мозга при воздействии GdAG



Результаты обзорной гистологии теменно-височной доли коры головного мозга при воздействии GdAG. 1 – нейронофагия. 2 – дегенеративно измененный нейрон. Окр. гематоксилин-эозин. Ув. X 400.



Площадь митохондрий (мкм²) нейронов коры головного мозга при воздействии нанобиокомпозитов

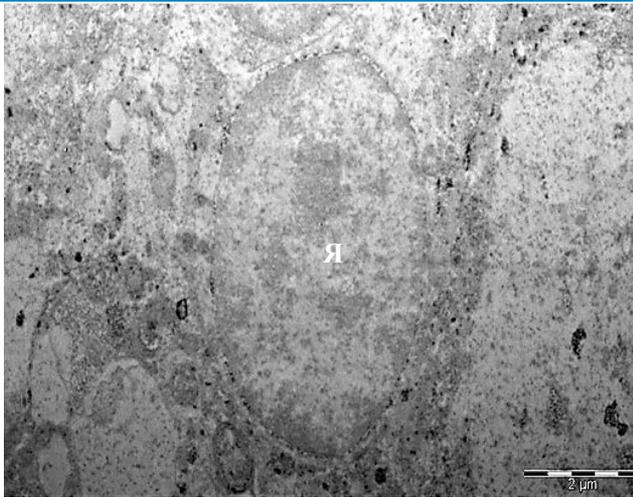


* - различия значимы по отношению к контрольной группе, $p \leq 0,01$

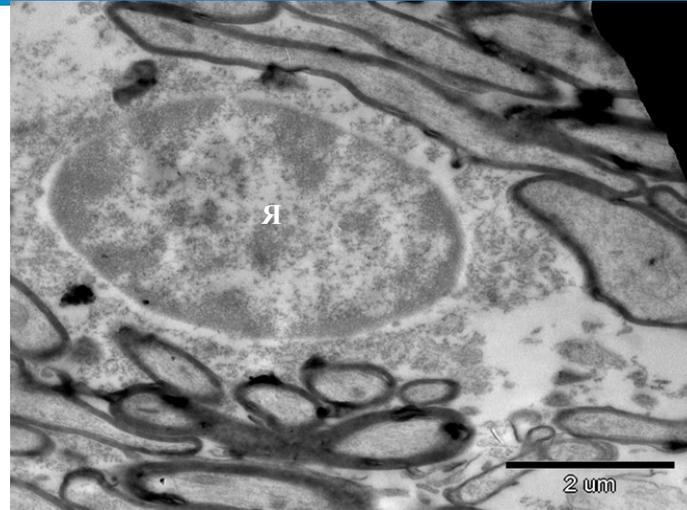
- различия значимы по отношению к группе АГ, $p \leq 0,01$

Нейроцитотоксический эффект наночастиц серебра инкапсулированных в полимерную матрицу / М.А. Новиков // Медицина труда и промышленная экология. - 2015. - № 9. - С. 105.

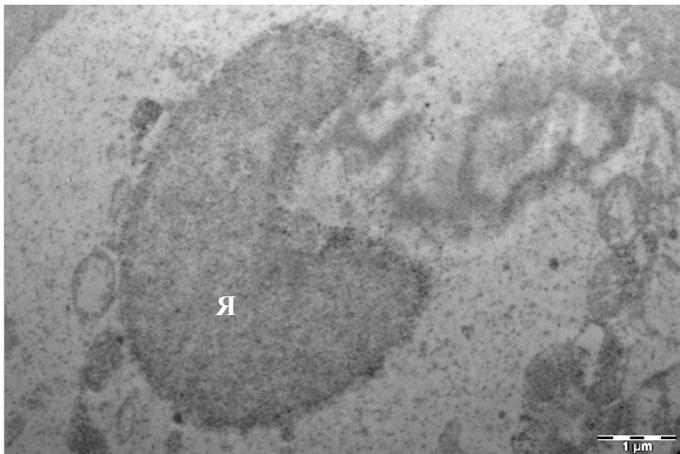
Результаты электронно-микроскопического исследования клеток головного мозга при воздействии нанобиоконпозитов



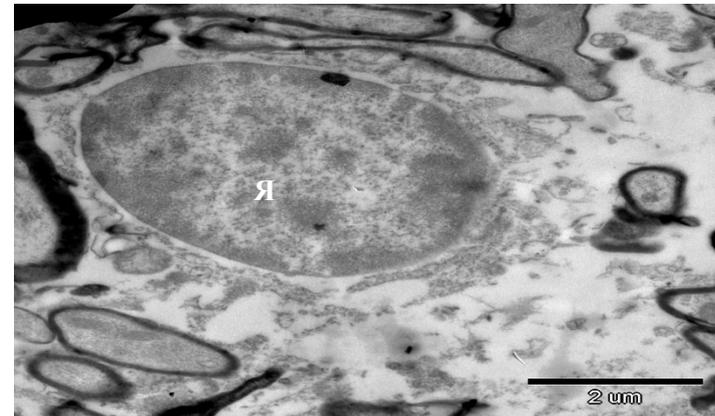
Электроннограмма препарата животного группы АГ.
Ядро (Я) в норме. Ув. X6000



Электроннограмма препарата животного группы
BiAG. Ядро (Я) в норме. Ув. X6000

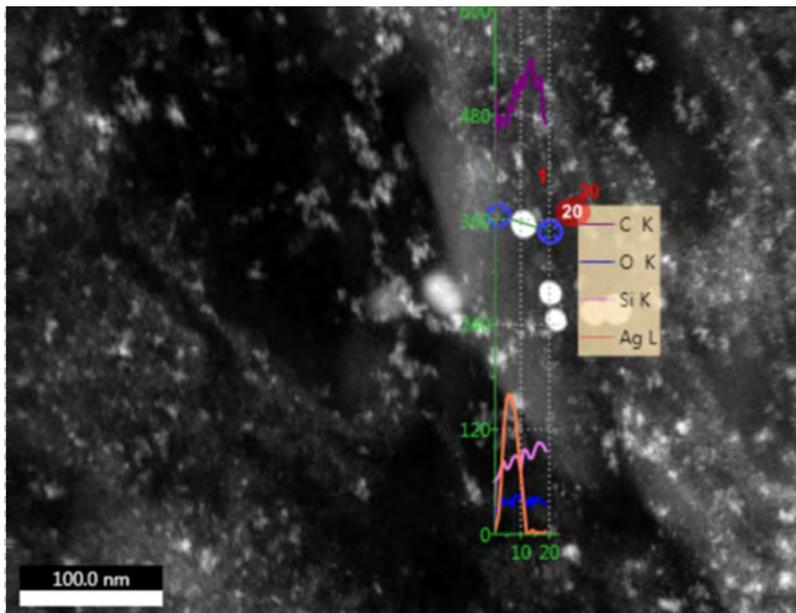
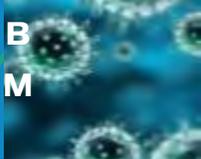


Электроннограмма препарата животного группы
AgAG. Деформация ядра (Я). Ув. X 12000



Электроннограмма препарата животного группы
GdAG. Ядро (Я) в норме. Ув. X6000

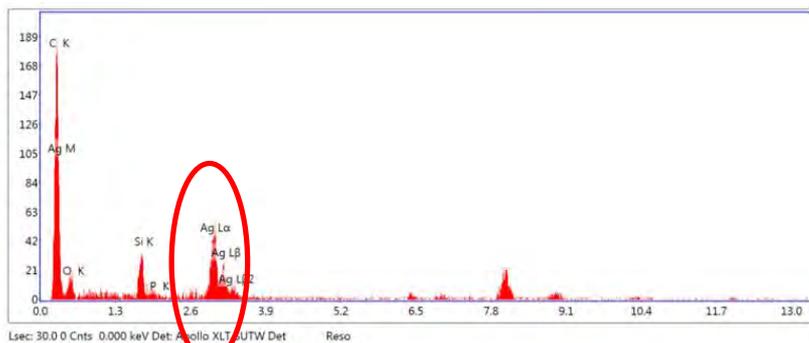
Результаты электронно-микроскопического определения наночастиц серебра в структуре нервной ткани (просвечивающий микроскоп FEI Techni 2G с полевым эмиттером и энергодисперсным детектором)



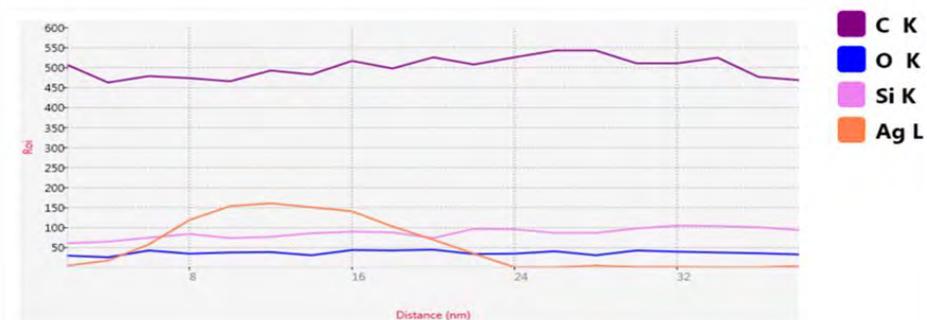
Количественные результаты (теоретические)

Элемент	Весовой %	Атомный %
C	63,00	88,74
O	4,15	4,39
Si	3,36	2,02
P	0,56	0,31
Ag	28,93	4,54

Микрофотография ткани головного мозга животного, подверженного воздействию AgАГ. Ув. X 64000

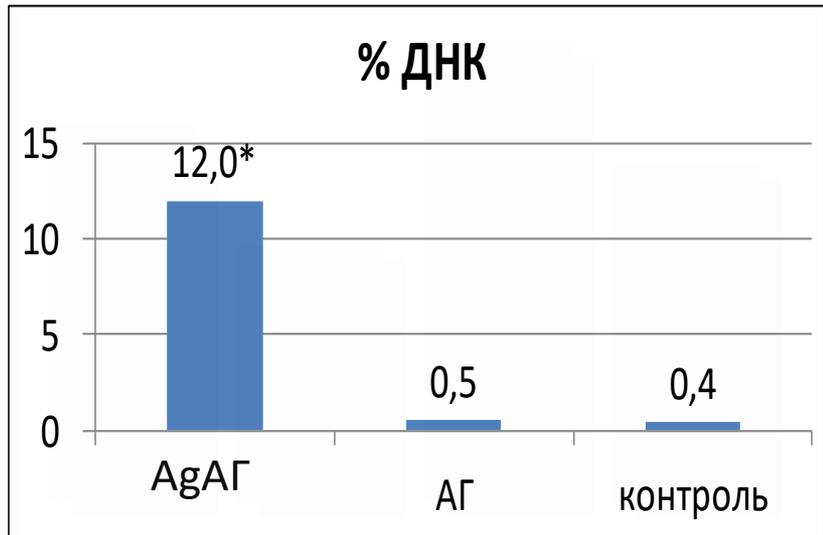
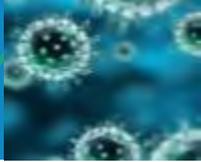


Результаты спектрометрии участка ткани головного мозга животного, подверженного воздействию AgАГ



Профиль обнаруженных элементов участка ткани головного мозга животного, подверженного воздействию AgАГ

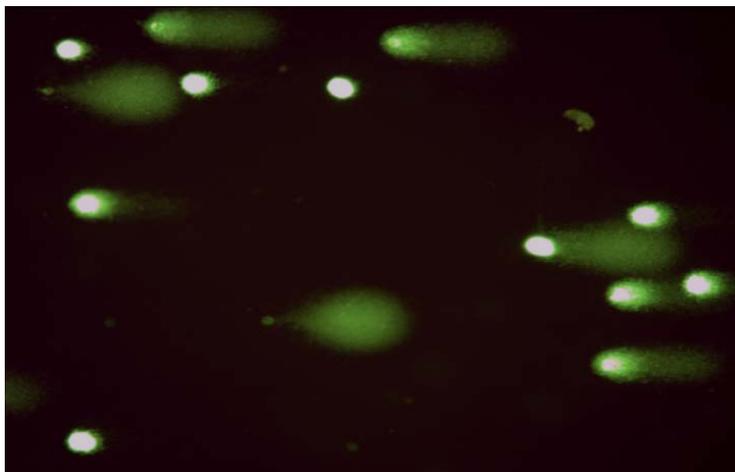
Результаты обследования клеток головного мозга при введении AgAg методом ДНК-комет, Me(Q₂₅-Q₇₅)



*- сравнение с контролем при $p < 0,01$

Группы	min-max %ДНК
AgAg	0,01-58,99
арабиногалактан	0,01-15,02
контроль	0,01-18,19

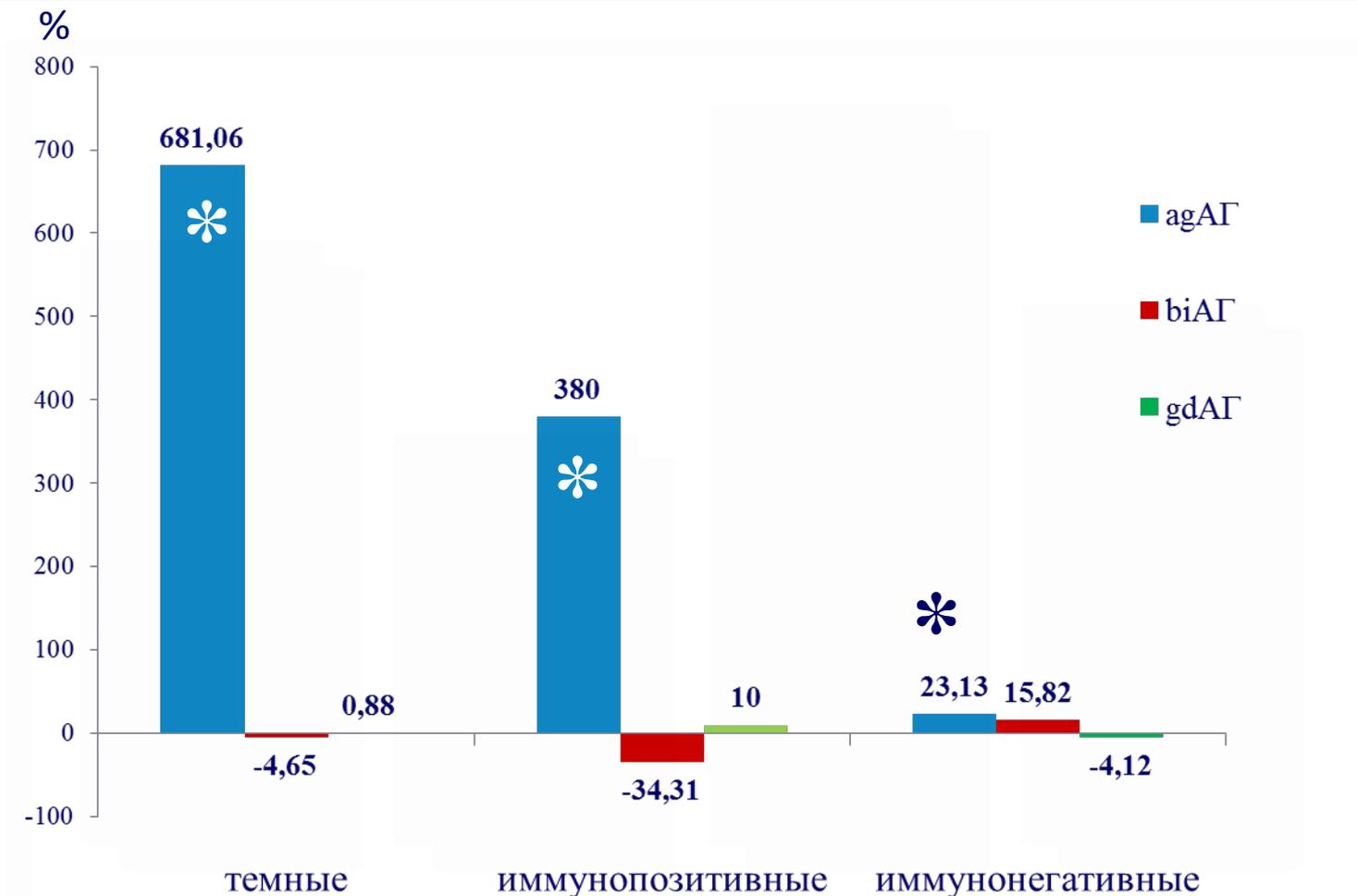
Повышенный уровень поврежденности ДНК в клетках головного мозга свидетельствует о наличии у AgAg генотоксического эффекта.



Активность апоптоза в нервной ткани белых крыс при воздействии арабиногалактана наносеребра / Л.М. Соседова, Е.А. Капустина, М.А. Новиков // Токсикологический вестник. - 2015. - № 6. - С. 27-31.

«ДНК-кометы» апоптотических клеток

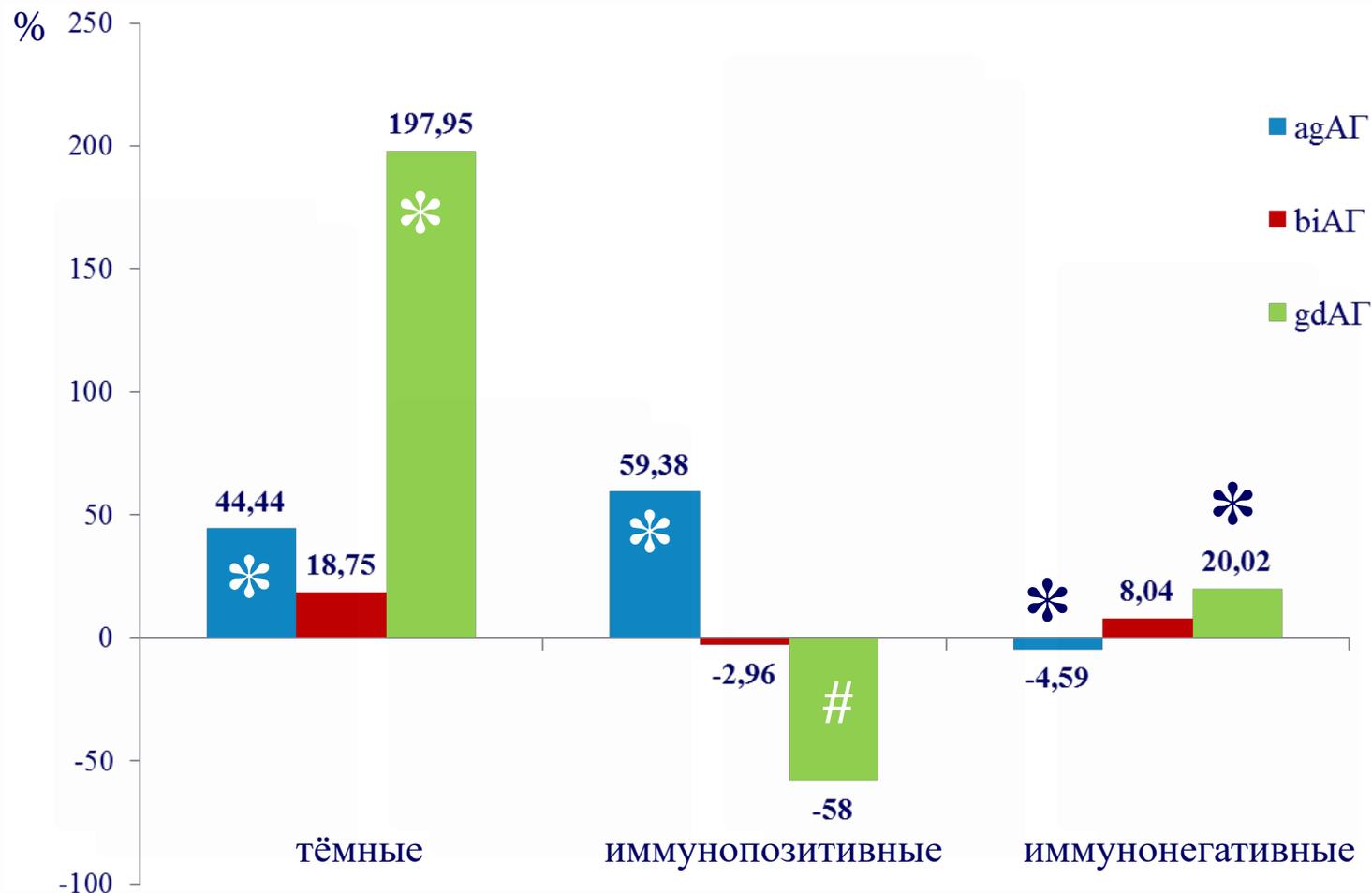
Экспрессия проапоптотического белка caspase-3 в нейронах белых крыс при воздействии нанобиокомпозитов Ag, Bi, Gd; n=20



Примечание – * - различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при $p < 0,05$

Экспрессия белков caspase-3 и bcl-2, как показатель функционального состояния ткани головного мозга белых крыс при воздействии аргентумарабиногалактан / Е.А. Титов, М.А. Новиков, Л.М. Соседова // Медицина труда и промышленная экология. – 2016. - №5. - С. 40 – 43.

Экспрессия антиапоптотического белка bcl-2 в нейронах белых крыс при воздействии нанобиокомпозитов Ag, Bi, Gd; n=20



Примечание – * - различия статистически значимы по сравнению с группой АГ при $p < 0,05$; # - различия имели характер тенденции при сравнении с группой АГ.

Экспрессия bcl-2 как критериальный показатель воздействия нанобиокомпозитов / Е.А. Титов, М.А. Новиков // Токсикологический вестник. - 2014. - № 4. - С. 34-38

ОСНОВНЫЕ ВЫВОДЫ



Арабиногалактан является эффективным контейнером для доставки наночастиц в головной мозг, обеспечивая проникновение последних через гематоэнцефалический барьер

Для оценки нейротоксичности нанокompозитов наряду с методами классической токсикологии необходимо применять методы внутриклеточной оценки действия веществ: морфометрический, иммуногистохимический, генетический

Молекулярная диагностика экспрессии внутриклеточных белков дополнительно обеспечивает более высокую степень достоверности апоптотического процесса при разных способах воздействия нанокompозитов

Развитие апоптотического процесса может служить ключевым критерием нанопасности соединений

Внедрение результатов исследований

- Диссертационная работа «Экспериментальная оценка особенностей токсического действия серебросодержащих нанобиоконпозитов» (г. Санкт-Петербург, 2017 г.)
- **17** статей , из них:
- в журналах РИНЦ – 11;
- в журналах WoS и Scopus - 6,
- в том числе:
- ✓ Biochemical and morphological changes in white rats after intragastric injection of a synthetic nanobiocomposite based on silver nanoparticles and arabinogalactan / **M.A. Novikov**, E.A. Titov, L.M. Sosedova, L.A. Ostroukhova [et al.] // Pharmaceutical Chemistry Journal. - 2014. - Т. 48. - № 6. - P. 387-390.
- ✓ Toxicity evaluation of polyvinyltriazole and a related silver-containing nanocomposite / G. F. Prozorova, A. S. Pozdnyakov, S. A. Korzhova, T. G. Ermakova, **M. A. Novikov**, E. A. Titov, L. M. Sosedova // Russian Chemical Bulletin, International Edition. – 2014. - Vol. 63. - №. 9. - P. 2126—2129.
- ✓ Effect of silver nanoparticles encapsulated in a polymer matrix on the structure of nervous tissue and expression of caspase-3 / E. A. Titov, **M. A. Novikov**, L. M. Sosedova // Nanotechnologies in Russia. - 2015. - Vol. 10. - № 7–8. - P. 640–644.
- ✓ The Effects of Nanosilver, Encapsulated in a Polymeric Matrix, on Albino Rats Brain Tissue/ L. M. Sosedova, T. M. Filippova, **M.A. Novikov** // Nano Hybrids and Composites, 2017, Vol. 13, pp. 263-267.

2 патента на изобретение



Благодарю за
внимание!





Патенты:

1. Способ оценки токсического действия наночастиц серебра, инкапсулированных в полимерную матрицу арабиногалактана, на ткань головного мозга лабораторных животных в отдаленном периоде воздействия / Е.А. Титов, М.А. Новиков, Л.М. Соседова // Изобретения. Полезные модели. Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. Оpubл. 27.03.2016 Бюл. № 9
2. Титов Е.А. Способ оценки процесса апоптоза в ткани головного мозга лабораторных животных / Е.А. Титов, М.А. Новиков, Л.М. Соседова, Т.В. Ганенко, Б.Г. Сухов, Б.А. Трофимов // Изобретения. Полезные модели. Официальный бюллетень Федеральной службы по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам. Оpubл. 31.05.2017 Бюл. № 16

