



Нанобезопасность: новые подходы к оценке рисков и токсичности наноматериалов

Н.Н.Каркищенко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Уникальные свойства наночастиц ограничивают возможности прогнозов, которые могут быть сделаны из наших знаний о больших веществах. Необходимо собирать информацию о размерах частиц, их структуре и квантово-механических механизмах, а также о функциях, способности взаимодействовать с протеинами и тканями. Необходимы тесты *in vitro* для определения безопасности или рисков от использования наночастиц, выяснения их избирательной токсичности и токсикокинетики. Присоединение к фуллеренам C_{60} пиридинов и пиримидинов усиливало их избирательную нейротропную активность, но в 3-5 раз повышало их общую токсичность. Опыты *in vitro* должны стать основой для лучшего предсказания возможной токсичности наночастиц и снижения числа использованных животных. Необходимы применение гетерогенных и генномодифицированных линий животных, переход от моделей-животных к животным моделям и использование компьютерного моделирования в нанобиотехнологиях.

Ключевые слова: нанориски, наномишени, фуллерены, избирательная нанотоксичность, биомоделирование нанопроцессов, модели животных.

Наночастицы, наноматериалы и нанотехнологии их производства кардинально отличаются по своим свойствам и эффектам, комплексу физических, химических и биологических свойств от веществ в форме макроскопических дисперсий и сплошных фаз. Безопасность наноматериалов и нанотехнологий является важнейшим фактором, регламентирующим промышленное производство и внедрение в здравоохранение нанопродуктов. Для абсолютного большинства наноматериалов не известны механизмы поступления в организм, биосовместимости, биотрансформации, транслокации в органах и тканях, элиминации и, что особенно важно, их токсичности. В

России, США, странах Евросоюза, Канаде, Японии, Китае и других странах ведутся обширные исследования по оценке безопасности и потенциальных рисков, связанных с производимыми наноматериалами [5, 11]. В России разработаны и в 2007 году утверждены Постановлением Госсанэпиднадзора «Концепция токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов» и Приказом Роспотребнадзора – методические рекомендации «Оценка безопасности наноматериалов» [<http://stroy.dbases.ru/Data1/52/52003/index.htm>].

Биомишени токсического действия для наноматериалов

Определим основные термины, понятия нанотехнологий и примерную классификацию наноматериалов.

Нанотехнологии – совокупность принципов, методов и технологий, развивающихся на атомном, молекулярном или макромолекулярном уровне, направленных на создание и использование структур, способов и систем модификации объектов и/или их компонентов в масштабе 1-100 нм, обладающих принципиально новыми свойствами и функциями.

Наноматериалы – продукция и материалы, содержащие структурные элементы в виде наночастиц, обладающие качественно новыми свойствами, позволяющими осуществлять их интеграцию в полноценно функционирующие микро- и макросистемы.

Нанориски – количественные или качественные проявления негативного воздействия наноматериалов на здоровье и репродуктивные последствия людей и животных и среду их обитания.

Критерии нанобезопасности – отсутствие или крайне низкий уровень объективных параметров нанорисков в отношении человека и окружающую среду.

Нанотест-системы – биомедицинские, физические, химические, информационные модели для оценки, валидации и экспертизы наноматериалов и нанотехнологий.

В соответствии с современными представлениями о форме, составе и физико-химических свойствах наноматериалов, можно выделить следующие направления исследований:

— углеродные наночастицы (фуллерены, нанотрубки, графены, нанопены, нанопровода и др.),

— неуглеродные простые наночастицы на основе кремния, магния, цинка, титана, золота, серебра и др. металлов,

— квантовые точки, нанороботы,

— наночастицы бинарных и композитных соединений,

— препараты наночастиц полимеров, биополимеров и др. сложных веществ.

Учитывая особенности поступления наночастиц в организм человека и животных, основными органами-мишенями являются ткани дыхательной, кишечной, иммунной, кожной систем, а критичными по последствиям действия наноматериалов являются головной мозг, костный мозг, репродуктивные и выделительные органы. Отсутствие единой шкалы приоритетов для оценки безопасности всего многообразия наноматериалов и низкая информативность, а, зачастую, неприменимость традиционных токсико-гигиенических характеристик к наноразмерным структурам, делает необходимым поиск и использование новых биомедицинских подходов к их оценке.

Можно полагать, что мишенями для наночастиц, в том числе углеродных, являются биологические макромолекулы (ДНК, РНК, белки), биологические мембраны, в том числе гистогематические (ГГБ), гематоэнцефалические (ГЭБ) барьеры, системы окисления-восстановления, в том числе перекисного.

Молекулы фуллеренов (C_{60} и C_{70}) обладают высокой электроотрицательностью, что позволяет использовать их для направленного транспорта различных

Т а б л и ц а

Изменение усредненных биохимических показателей в крови крыс через 3 часа после введения исследованных фуллеренилов в дозе 300 мг/кг

Показатель	Норма	Фуллеренилы
Глюкоза, mmol/l	7-8	7-7,5
АЛТ, U/l	32-38	29-31
АСТ, U/l	70-160	100-140
Щелочная фосфатаза, U/l	350-450	90-140

веществ и лекарств. Направленная доставка р-циклодекстрина с «привязанным» остатком фуллерена обеспечивала высокую ДНК-расщепляющую активность при освещении видимым светом [26]. Высокая эффективность биологического действия также достигается за счет объединения в одной молекуле и действующего начала (фуллерена как «генератора» синглетного кислорода), и системы его направленной доставки к молекуле-мишени (катионные группы связываются с анионными группами ДНК) [38].

Наночастицы соизмеримы с биологическими молекулами, вирусами, и, благодаря своим размерам, могут иметь новые химические и биологические свойства по сравнению с материалами бо́льших размеров. Они также могут входить и проникать в организм, взаимодействовать с клетками и тканями, недоступными для больших частиц способами. Наночасти-

цы захватываются клетками и попадают в неожиданные внутримолекулярные пространства (например, митохондрии или ядро) [2, 5, 8, 29].

Обратимся в качестве примера к фуллеренам, которые мы исследовали на протяжении ряда лет. Фуллерены C_{60} считаются малотоксичными (1200-2500 мг/кг). Соединения C_{60} с глутатионом, цистином или бета-аланином [21] являются альтернативными акцепторами свободных радикалов с хорошей биосовместимостью и отсутствием видимой токсичности. Многогидроксильные фуллерены также являются хорошими антиоксидантами [14]. $C_{60}(OH)_{24}$ – фуллеренол обладает защитным действием в отношении вызываемого доксорубицином оксидантного стресса [22]. Некоторые исследователи считают, что защитное действие фуллеренила возможно, когда оксидантный стресс в клетках печени слишком высок. В нормальных же условиях $C_{60}(OH)_{24}$ вызывает гепатотоксический эффект [22]. Несмотря на противоречивость немногочисленных данных по их физиологической активности, следует отметить, что фуллеренол в концентрации 30 нмоль предохраняет ткани ЦНС от повреждения, вызванного оксидантным стрессом, нормализует поведенческие реакции, устраняет явления энцефалопатии [37].

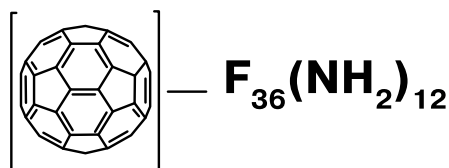


Рис. 1. Структурная формула фуллеренила $C_{60}-F_{36}(NH_2)_{12}$

По нашему предложению сотрудником РНЦ Курчатовский институт А.А.Филипповым, под руководством профессора А.А.Артюхова осуществлен синтез фуллеренов с фтор-, бром- и аминоксодержащими радикалами. В лабораториях фармако моделирования (к.б.н. А.О.Ревякин) и нанорегуляторных систем (к.б.н. Д.С.Сахаров) НЦБМТ РАМН исследованы следующие соединения фуллеренов (фуллеренилы): $C_{60}F_{24}$, $C_{60}Br_{24} \times 2Br_2$, $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$, $C_{60}(NO_2)_x$. На рис. 1 приведена структурная формула одного из исследованных фуллеренилов.

Наши исследования некоторых биохимических и гематологических показателей выявили определенные изменения у крыс после введения модифицированных фуллеренов. Исследования проведены на биохимическом анализаторе Reflotron (Германия) тест полосками, а также гематологическом анализаторе – Granis 3 (Франция).

В таблице даны обобщенные показатели изменения биохимических параметров при введении всех исследован-

ных фуллеренов. Параметры глюкозы, АЛТ снижались, а АСТ несколько повысились, отличаясь от нормы. Резкое уменьшение щелочной фосфатазы в среднем с 400 до 120 U/l могло бы говорить о сдвиге в буферных системах КЩР за счет низких значений pH вводимых фуллеренов. Но, поскольку изменения щелочной фосфатазы практически одинаковы при введении веществ с pH от 2,79 до 5,34, можно думать о достаточно сложных биохимических процессах взаимодействия исследованных фуллеренов с метаболическими системами организма. Исследованные препараты оказались малотоксичными и не имели видимых токсикологических проявлений в дозах, превышающих 800 мг/кг. В дальнейшем были получены водорастворимые соединения типа $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ (фторфуллеренпиридинияфторид), а также фуллеренилы, содержащие пиримидин и другие органические структуры. Присоединение к C_{60} пиридинов и пиримидинов существенно повышало токсичность новых веществ до 400-500 мг/кг при оценке общей токсичности.

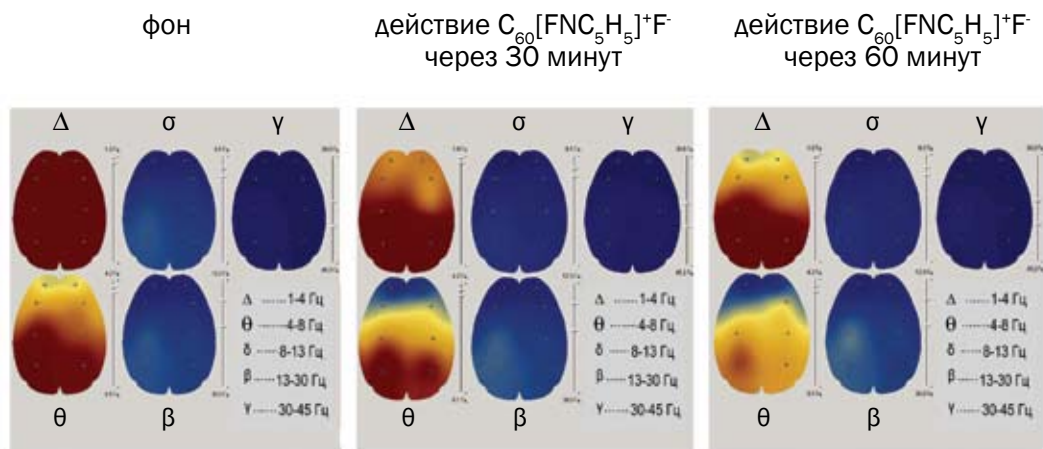


Рис. 2. Влияние фуллеренила $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$ на распределение спектральных плотностей мощности электрической активности мозга крыс.

Сотрудником нашего Центра к.б.н. Д.С.Сахаровым было показано, что при интраперитонеальном введении крысам модифицированных фуллеренов в разных дозах в динамике отмечались изменения спектральных мощностей электрической активности мозга (СМЭАМ) в частотной полосе от 1 до 45 Гц, преимущественно во фронтальных и теменно-затылочных областях коры (рис. 2).

Таким образом, можно констатировать способность фуллеренов распространяться в организме и взаимодействовать с различными органами-мишенями, вмешиваться в интимные внутримозговые регуляторные процессы. Одним из приоритетных органов-мишеней для фуллеренов является головной мозг. Но дальнейший прогресс в понимании механизмов действия, поиске и детализации мишеней для фуллеренов требуют иных подходов к биомоделированию на наноразмерном уровне.

Целью таких моделей должны стать ответы на такие вопросы как:

- каким путем наночастицы проникают в органы-мишени?
- могут ли наночастицы получить доступ к тканевым пространствам и приводить к системной токсичности?
- применима ли концепция химической адсорбции к наночастицам?
- каковы риски после местного и системного применения наночастиц?
- каково отношение наночастиц к липидным доменам, протеинам и способны ли они доносить лекарства, используя природные наноносители?
- как взаимодействуют наночастицы с рецепторами и модифицируют ли они эффекты лекарств?
- каковы механизмы проникновения наночастиц через ГГБ и ГЭБ?

— какова токсикокинетика наночастиц и влияет ли она на кинетику лекарств и других ксенобиотиков?

— могут ли они инициировать воспаление?

— модифицируются ли в организме углеродные наночастицы?

— каковы проявления эффектов и механизмы токсичности нанометаллов?

Это далеко не все вопросы, требующие незамедлительного ответа, хотя по некоторым из них уже имеются научные результаты. Так, частицы цинка и оксида титана, используемые в продуктах для ухода за кожей, способны проникать через барьер *stratum corneum* кожи кролика, с наивысшим поглощением из водяных и масляных растворов [20]. Известны различия между наночастицами и «традиционными» опасными химическими веществами, которые заключаются в том, что дезактивация наночастиц значительно более сложная и менее эффективная ввиду их твердой структуры, чем для обычных химических веществ из-за их растворимости.

Наночастицы уже используют в косметических средствах, таких как отбеливатели в зубных пастах, отражающих материалах в солнечных экранах, серебряные наночастицы используют в антисептических покрытиях. Наночастицы используют также в лекарствах, которые вводят через кожу, легкие или непосредственно в большой орган. Такие новые свойства дают большие возможности, но ставят вопрос о безопасности наночастиц [29].

На уровне наших современных знаний о природе взаимодействия наночастиц с биологическими субстратами можно составить многостраничный труд, заполненный одними лишь вопросами.

Но жизнь требует ответа уже сегодня, что диктует необходимость внесения новых биомедицинских инициатив по оценке нанобезопасности и наноэффективности современных материалов.

Для установления органных, тканевых и атомно-молекулярных мишеней для наночастиц требуется построение и создание принципиально новых моделей, переход от животных-моделей к моделям животных, альтернативное, математическое и компьютерное моделирование, осуществляемое на принципиально новых основах.

Идентификация рисков наноматериалов

Наночастицы с размерностью 1-100 нм имеют совершенно иные физико-химические параметры, механизмы и точки биомедицинского приложения. Это связано с нахождением большинства атомов на межфазной, внешней поверхности частиц, что в свою очередь обуславливает новые для медиков и биологов *квантово-механические* закономерности их действия. Иные электромагнитные, спектральные, физико-химические, биологические механизмы проявляются в уникальности мембранопроницаемости, антимикробного действия, влияния на регуляторный аппарат живых клеток, в том числе генный, в наличии особой механической прочности наноструктур и т.д. Развитие нанотехнологий и создание новых наноматериалов, обеспечивая научно-технический прогресс будущего, в то же время создает зону риска для человека и окружающей его среды.

До последнего времени наночастицы в аспекте *рисков* систематически не изучались, но некоторые эпидемиологи-

ческие исследования с их использованием были проведены [31]. Дополнительно был выявлен ряд факторов неблагоприятного влияния наноматериалов в различных организмах и окружающей среде [30, 36]. Фармацевтическое использование также было источником информации о потенциальной транслокации наночастиц от сайта внесения к периферийным областям организма [15].

Крайне противоречивые данные касаются нанобезопасности фуллеренов. По одним данным фуллерены C_{60} имеют общую токсичность на уровне 2500 мг/кг, по другим 1200-1500 мг/кг. Если согласиться с данными об их крайне низкой общей токсичности, то трудно объяснить данные ряда авторов, согласно которых фуллерен C_{60} токсичен по отношению к эритроцитам крыс и человека, при этом его токсичность не связана с окислительным стрессом [4]. Предполагается токсичность и водорастворимого фуллерена C_{60} [7].

Хотя существуют серьезные данные по фуллерену и его производным, в которых авторы не отмечают *in vivo* ни острой, ни хронической токсичности, однако факт накопления фуллеренов в организме является, безусловно, настоящим, если не отрицательным, при рассмотрении возможностей применения фуллерена в медицине [25]. В отличие от фуллерена C_{60} , нанотрубки, смешанные углеродные наночастицы ускоряли сосудистый тромбоз [32].

В тестах для наночастиц необходимо особое внимание уделить характеристике состоящих из них наноматериалов. При оценке нанобезопасности полученных инженерными способами наноматериалов, таких как фуллерены, одно- и многослойные углеродные трубки, ок-

сиды металлов наноразмеров, такие как TiO_2 , частицы с диаметром в нанометр низкой растворимости, считающихся наноматериалами, должны быть найдены принципиально новые процедуры изучения токсичности и точек окончания эксперимента при *ингаляционном, пероральном и трансдермальном* путях проникновения наночастиц.

Ингаляционные риски. Переносимые по воздуху дискретные наночастицы преимущественно двигаются конвекцией и диффузией. Частицы такого размера осаждаются преимущественно в дыхательных путях путем диффузии [24]. Наночастицы могут проходить через биологические мембраны и ткани, которые непроницаемы для больших частиц. Показано проникновение частиц диоксида титана (TiO_2) наноразмера в интерстиций легких, а кинетика иридия включает транслокацию его во вторичные органы [20, 35]. Эффекты ингаляционного влияния наноматериалов могут проявляться и вне дыхательных путей. Изучены эффекты загрязнения воздуха и показано, что повышение смертности прямо связано с чистыми частицами [16]. Исследования учитывали изучение респираторных и кардиоваскулярных эффектов. В хорошем обзоре относительно судьбы наночастиц, описана их деградация в легких и потенциальный провоспалительный и оксидативный стресс, как нанозависимый клеточный отклик [10].

При введении крысам C_{60} в дозах 1,5 и 3 мг/кг эндотрахеально, с использованием воды как транспортного средства, уже через сутки обнаружили увеличение результатов перекисного окисления липидов в жидких продуктах бронхоальвеолярных полостей. Те же изменения отмечались и спустя 3 месяца, при этом

не наблюдалось больше никаких негативных изменений в структуре и функциях тканей легких [35].

Токсикологи как никогда нуждаются в новых технологиях получения информации об эффектах влияния дискретных наночастиц для понимания воздействия наноматериалов, поскольку силы сцепления, поддержания наночастиц как агрегатов и агломератов, также как и их аэродинамический диаметр, влияют на их способность переноситься по воздуху, поступать в организм и распределяться в нем. Процедуры оценки функционирования основных тканей и органов могут стать хорошей базой для контроля на животных, хотя могут быть не менее важны альтернативные подходы, включая клеточный, субклеточный уровни и математическое моделирование [1, 3, 20, 34].

Пероральные риски. Одним из важнейших путей проникновения наночастиц, по-видимому, является желудочно-кишечный тракт. Проникновение наночастиц от 10 до 100 нм через стенки желудочно-кишечного тракта наблюдаются при обычном и принудительном кормлении через зонд [20]. Хотя имеющиеся данные указывают, что при пероральном введении фуллерены не всасываются, не эффективны и экскретируются, прежде всего, с калом [20], отрицать способность наночастиц преодолевать ГТБ в стенках желудка и кишечника было бы опрометчиво.

Трансдермальные риски. Пока нет информации о том, могут ли наночастицы проникать через эпидермальный барьер и аккумулироваться в тканях дермы. Аvascularный эпидермис может являться депо для наночастиц, недоступных для переноса фагоцитами. Прин-

ципиально важным является выявление рисков развития воспаления в кератиноцитах, оценки процессов дезактивации наночастиц в коже и особых условий растворимости наночастиц в липопротеидных эпидермальных структурах.

Наноматериалы и наночастицы способны проникать в *stratum corneum* и оказывать токсическое воздействие на нижние слои. Адсорбция наночастиц может осуществляться путем: перемещения по межклеточному фосфолипидному пути, внутриклеточно (возможно путем эндоцитоза), межклеточно, через волосяные фолликулы или потовые протоки. За счет дополнительного транспорта наночастицы могут подвергаться экскреции [20].

В настоящее время развиваются модели *in silico* и *in vitro* для замены животных при исследовании наноматериалов. Существующие методы *in silico* ставят своей целью определить чувствительность кожи к определенным наноматериалам. Модели и экспертные системы QSAR отображают риск и/или потенциальную информацию через идентификацию влияния основных компонентов или их комбинаций на животных, если

данные введены ранее в базу. Несмотря на отсутствие в системе данных по токсикологическим точкам окончания эксперимента для человека или детальных руководств, как именно оценивать риск для человека, система позволяет выявить ранние фазы чувствительности кожи к наноматериалам без использования тестов на животных [27].

Существует ли избирательная токсичность на наноуровне?

Уникальные физико-химические свойства, которыми обладают наноматериалы, требуют изучения возможных рисков и вреда, наносимых человеку и окружающей среде, а также развития лучшего фундаментального понимания моделей воздействия наноматериалов как факторов, которые продвигают всесторонние исследования токсикологии и оценки безопасности.

Исходя из классического деления фармакологических и токсических веществ на *агонисты* и *антагонисты*, к которым априори можно отнести все наноматериалы, следует обратить особое внимание на известный постулат А.Альберта, что

«токсичность антагонистов является их наиболее ценным свойством, поскольку... служит на благо здоровья человека» [9]. Не обсуждая спорность такого взгляда, согласимся с тем, что для

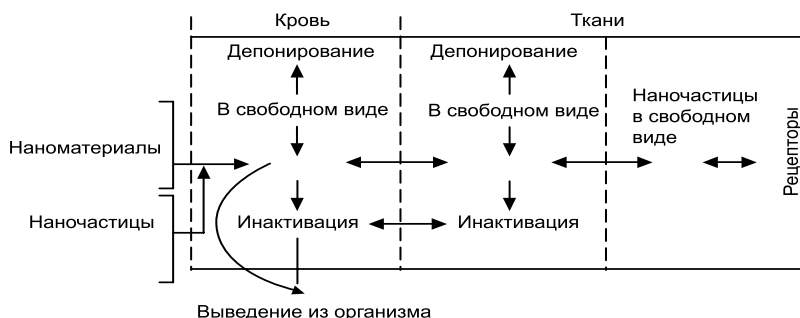


Рис. 3. Теоретические принципы адсорбции, распределения и выведения наноматериалов, а также комплементарности наночастиц с рецепторами.

искомых нановоздействий во многих случаях была бы важна *избирательная токсичность*.

Для многих лекарственных средств характерна следующая закономерность: при условии полной обратимости токсического действия и избирательности эффектов, они тем *ценнее*, чем *токсичнее*. Данное заключение отнюдь не парадокс, а фармакологический факт не только для лекарств, но, по-видимому, и для веществ наноразмерного уровня. Однако мы должны учитывать, что в отношении наноразмерных частиц не могут быть в полном объеме приложимы наши представления о физико-химических механизмах, поскольку в силу вступают квантово-механические закономерности. Уже имеющиеся публикации о позитивных и неблагоприятных эффектах наноматериалов крайне противоречивы. Проиллюстрируем на примере фуллеренов.

Известно, что в результате *реакций замещения* химических веществ образуются соединения того же класса, а *реакции присоединения* дают соединения другого класса. Однако для наночастиц, включая фуллерены, реакции замещения *невозможны*, так как в них *нечего замещать*. А при присоединении любых атомных или молекулярных структур, фуллерены остаются соединениями того же класса.

Фуллерены C_{60} с такой легкостью присоединяют свободные радикалы [6], что позволяет назвать эту молекулу «губкой для радикалов». Это предопределяет их антиоксидантную активность и целый ряд уникальных фармацевтических свойств, с различными порогами острой токсичности.

Синтезированные А.А.Филипповым по нашему предложению C_{60} -фуллеренилы, содержащие пиридины и пи-

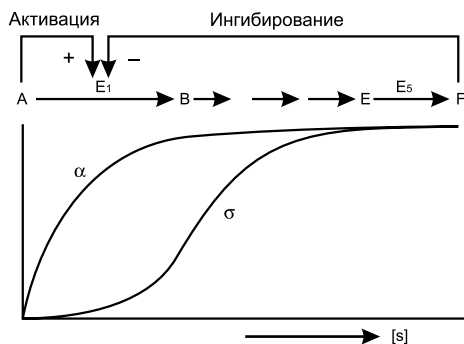


Рис. 4. Гипотетически кинетика наночастиц и наноматериалов соответствует кинетике аллостерических или регуляторных ферментов в процессе биотрансформации веществ. А – субстрат, F – продукт, В-Е – промежуточные соединения, E1 – E5 – ферменты.

римидины, обнаружили высокую избирательную токсичность, чем исходные продукты. Так, четвертичная водорастворимая аммониевая соль фторфуллеренпиридинийфторида $C_{60}[FNC_5H_5]+F^-$ уже в дозах 300 мг/кг обнаруживала признаки острой токсичности в отношении головного мозга и ряда паранхиматозных органов. Избирательность действия этих фуллеренилов на мозг установлена нами методами оценки СМЭАМ и нарушения когерентных связей в основных зонах конвекситальной коры головного мозга крыс.

Рассматривая взаимодействие наночастиц, как и любых других веществ с тканями, легко представить его в виде занятых ими комплексов реакционно-активных групп. Подобное явление описывается в рамках *оккупационной теории*. И.Ленгмюр показал четкую взаимосвязь физики и химии таких взаимодействий. После его работ стала понятна суть явления адсорбции, обусловленного суммой всех химических связей (ван-дер-ваальсовыми, водородными, ионными, ковалентными, электростатическими

и т.д.). Но пока не ясно, насколько приложима оккупационная теория к квантово-механическим процессам, по законам которых работают наночастицы.

Примером регуляторов в биологических системах может стать инактивация наноматериалов как токсикантов (рис. 3). Первый фермент в мультиферментных системах биотрансформации является обычно регулятором. Поскольку аллостерические ферменты часто участвуют в регулировании (регуляторные ферменты), роль сигнала управления (α) играет эффектор (положительный – активатор, отрицательный – ингибитор) (рис. 3-4).

Кинетика ферментативных реакций в отношении токсиканта протекает в присутствии эффектора и характеризуется графически либо сигмовидной кривой, либо изменением наклона кривой в присутствии эффектора. Таким образом, закон действующих масс (Гульдберг-Вааге) подчеркивает механизм обратной связи (рис. 4).

Согласно Ленгмюру, если при адсорбции не происходит образование ковалентных связей, то это – обратимый процесс, когда положение его равновесия устанавливается в соответствии с законом действующих масс (рис. 4). Из этого закона Ленгмюр вывел уравнение:

$$\frac{X}{m} = \frac{abc}{1+ac}$$

где X – масса адсорбированного вещества, m – масса адсорбента, c – концентрация неадсорбированного вещества, a и b – константы.

Это уравнение показывает, что адсорбент насыщается при высоких значениях c . Если $c > 1$, то правая часть уравнения равна b . Мы привели некоторые

представления из оккупационной теории и уравнение Ленгмюра потому, что они поясняют, почему при каждом последующем удвоении дозы лекарств на основе нановеществ их позитивный эффект может быть менее ощутимым, а *токсический* способен возрастать. При этом кривая зависимости эффекта от дозы должна бы представлять собой гиперболу для наносубстанций (рис. 4).

Но будут ли наночастицы подчиняться уравнению Ленгмюра, а их проявления укладываться в границы оккупационной теории? Следующие примеры, по крайней мере, не отрицают такую вероятность. Показано, что агрегаты наночастиц, вероятно, могут быть объектом механизма нормального макрофагового клиренса. Продемонстрировано [31], что при последующих внутритрахеальных вливаниях ультрачистых частиц TiO_2 , они были фагоцитированы альвеолярными макрофагами, которые предотвращали как реакцию воспаления легких, так и проникновение ультрачистых частиц в промежуточные ткани. Однако наночастицы способны вызывать воспаление в дыхательных путях, вероятно как следствие вовлечения в процесс относительно большой площади поверхности. В исследованиях [10] ингаляции $10 \text{ мг/м}^3 \text{ TiO}_2$ в течение 13 недель вызвали воспаление легких у крыс и мышей, аналогичное вызванному значительно более высокими дозами чистого TiO_2 .

В процессе биомоделирования адсорбционных способностей наночастиц в коже и других тканевых структурах в целях установления избирательной токсичности наноматериалов, краеугольным камнем является корректность в планировании и проведении экспериментов. Другим краеугольным камнем исследо-

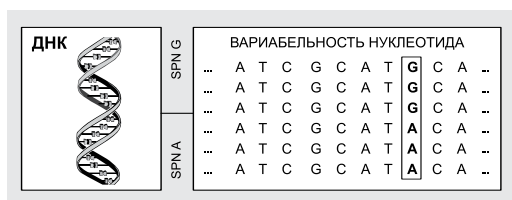


Рис 5. Идентификация SNPs для различных популяций лабораторных животных, связанных с вариабельностью нуклеотидных последовательностей в нанотехнологиях.

ваний избирательной токсичности является поиск и выбор альтернативных моделей. Исследования *in vitro* показали, что многослойные углеродные нанотрубки (не являющиеся оптимизированными для биологических приложений) способны инициировать раздражение в эпидермальных кератиноцитах человека, которые являются первичной процедурой локального изучения [28]. Иными словами необходим выбор путей: использования клеточных культур *in vitro*, диффузии через клетки, системных моделей кожи или иных тканевых барьеров. В качестве модели *in vivo* используется кожа крыс или мини-свиней. Однако существуют ограничения в получении качественных и количественных показателей при изучении избирательной токсичности наноматериалов *in vivo*. В некоторых случаях было бы лучше изучать взаимодействие *in vitro* для оценки стартовой дозы токсичности в *in vivo*-эксперименте.

Сочетание *in vivo*-методов с альтернативным моделированием позволит уже на этом этапе изучения наноматериалов выяснить: в какой мере *избирательная токсичность* присуща наносубстанциям и каким из них? В свою очередь это поможет открыть пути для конструирования лекарств с неожиданными и крайне важными для медицины свойствами.

Нанотоксикология: новые подходы к животным-моделям

Большинство токсикологов понимают необходимость контроля за внутрииндивидуальной изменчивостью. Но большинство из них такой контроль не любят и избегают его, поскольку он снижает норму сигнал/шум, лежащую в основе ошибочно отрицательных результатов. Токсикологи, конечно, учитывают, что животные должны быть одинакового веса, должны иметь одинаковую диету, быть свободными от болезней, и находиться в контролируемой внешней среде. Они также должны быть одинаковы по биомаркерам токсичности, которые токсикологи предполагают измерять. Но не все понимают, что это может быть достигнуто исключительно за счет использования *гетерогенных, инбредных, геномодифицированных* или *нокаутных* линий. А это для токсикологов далеко «не поле чудес», с безрадостными объемами исследований на крысах и крупных животных [12].

В то же время мировой опыт показывает, что в токсикологических исследованиях именно мыши (49,3%) являются наиболее часто используемым видом, далее следуют крысы (15,8%), не-млекопитающие (14,4%), сельскохозяйственные животные (7,6%), мелкие млекопитающие, исключая крыс и мышей (6,9%), приматы (4,3%) и другие животные (1,6%).

Индивидуальные особенности включают генетические и не-генетические компоненты. Токсикологи пытаются контролировать не-генетические компоненты, но не делают даже попыток контролировать генетические особенности. Еще Russell и Burch указывали, что «в

токсикологических тестах надо использовать гетерогенных животных» [33], что при оценках наноматериалов становится не только желательным, но и обязательным условием.

Клинико-генетические наблюдения различий лекарств и токсикантов дали толчок к развитию токсикогенетики. Подчеркнем, что токсикогенетика изучает общие особенности генетической детерминированности, а геномика объясняет индивидуальные различия эффекта токсикантов. Индивидуальные особенности человека и животных определяются вариабельностью нуклеотидных последовательностей, например SNP G и SNP A (рис. 5).

Не вызывает сомнения, что наночастицы взаимодействуют с ДНК и вмешиваются в генетические процессы организма. Это относится и к металлам, и к двуокиси кремния, и к углеродным частицам. Хотя основная совокупность данных свидетельствует о том, что сам фуллерен и некоторые его производные ни острого, ни хронического жесткого токсического действия в условиях *in vivo* и *in vitro* не проявляют, тем не менее, это утверждение справедливо только в тех случаях, когда не проявляются фотодинамические свойства и не образуются при действии света активных форм кислорода (АФК).

Установлено, что фуллерен C_{60} индуцировал в клетках саркомы у мышей и глиомы у крыс и человека образование АФК, после чего наблюдался некроз с повреждением мембраны клетки, без измельчения ДНК, в то время как соединение этого фуллерена с гидроксильными группами $C_{60}(OH)_n$ вызывало апоптоз с разрушением ДНК и отсутствием асимметрии в проницаемости мембраны [23].

Способность связываться с двухцепочечной ДНК позволяет расщеплять ее при облучении видимым светом вследствие катионно-водорастворимого производного фуллерена [38].

В этом случае высокая эффективность биологического действия также достигается за счет объединения в одной молекуле и действующего начала (фуллерена как «генератора» синглетного кислорода), и системы его направленной доставки к молекуле-мишени (катионные группы связываются с анионными группами ДНК). Поэтому абсолютно необходимы новые подходы к дизайну экспериментов по оценке наноматериалов на гетерогенных животных, принципы которых разработаны и хорошо оптимизированы [17].

При оценке наночастиц и наноматериалов оправдано использование нового теста на 28-дневную токсичность, который включает 4 уровня доз, на крысах обоего пола в количестве 10 аутобредных голов в каждой группе, всего – 80 голов, например, WAG или Wistar. Для минимизации использования животных, в эксперимент включают 3-5 линий крыс (например, линии WAG/GY, F344/Y, BK/Y, AUG/LacY, LEW/Y, созданные или поддерживаемые в нашем Центре) по 3 головы от каждой линии вместо 10 голов WAG. Этот эксперимент будет включать: 4 уровня доз, животных двух полов, три линии и 3 крысы в каждой группе, всего – 72 крысы. Какие достоинства, преимущества и чувствительность у этого эксперимента?

Выбор линии. Генетическое подобие среди имеющихся в наличии линий мышей и крыс всегда существует, как и информация об их продолжительности жизни, спонтанных патологиях и дру-



Рис. 6. Мыши линии B10.GFP, все их органы, ткани, клетки и субклеточные структуры флуоресцируют в ультрафиолетовом облучении.

гих характеристиках линий. Данные по контролю за животными можно собрать очень быстро, и они будут более надежными, чем текущие данные по аутбредным стокам, которые не проверяют на аутентичность [12].

Практичность эксперимента. Не составит труда использовать 12 голов крыс обоего пола (пара пометов) каждой из трех линий. Проведение эксперимента ничем не отличается от традиционного. Чтобы сделать его еще практичнее, можно взять три линии с разным окрасом, и разделить его на три небольших эксперимента, включающего по 24 животных. Результаты можно объединить в процессе статистического анализа. Цель эксперимента – сравнение *наноматериалов*, их *доз*, а не *линий*.

Новые знания. Минимальное количество животных на дозу $\times$ пол $\times$ количество групп в эксперименте должно быть 2, если генетические вариации в отклике определены (каждая крыса WAG генетически отличается и генетические вариации не определены). Поэтому, в принципе, возможно проведение эксперимента с 2 крысами каждой из 5 линий. Чем

больше линий, тем меньше практическая значимость, но *больше* учет *генетической восприимчивости* в эксперименте с получением адекватной информации и *новых знаний*.

Чувствительность и преимущества. Проведен небольшой эксперимент по изучению хронического действия фуллеренола в дозах 25, 50 и 100 мг/кг, вводимых еженедельно. Сравнялось действие на группе крыс WAG по 8 животных на каждую дозу по сравнению с экспериментом, включающим 2 животных из 4 инбредных линий. Норма сигнал/шум была существенно выше в группах инбредных животных. Инбредные линии показали ярко выраженную токсичность доксорубина и протективное действие фуллеренола на сердце и печень [22], в эксперименте только с WAG это выявлено не было. Это дает преимущество в уменьшении количества животных в эксперименте, при том, что его чувствительность существенно повышается.

Восприимчивость и достоинства. Эксперимент, поставленный на нескольких линиях, часто показывает различную восприимчивость линий. Оценка нанобезопасности должна основываться на самой чувствительной линии, но в ряде случаев необходимо найти *ген* такой *восприимчивости*. Это поможет уяснить механизм нанотоксичности и получить данные для инновационных лекарств в будущем. К сожалению, токсикологи никогда не делали попыток использовать такой дизайн [17].

Если вместо крыс использовать мышей, то понадобятся более радикальные изменения. По зарубежным данным именно мыши (91,4%) были наиболее часто используемым видом для генных

модификаций, а лишь затем – крысы (3,6%), зебрафиши (2,3%), свиньи (1,4%) и другие виды, включая цыплят, овец и коров (1,3%). Наиболее часто использовались для генных модификаций мыши линий C57BL/6 (48,1%), 129Sv (11,1%), Balb/c (4,3%), CD1 (2,5%) и FVB (0,3%). Преимущество в использовании мышей заключается в широкой доступности различных линий и обширной базы данных по генетике мыши, соответствие генов мыши/человека, и относительная простота генетических манипуляций с мышью. Генетические модификации могут включать «вставку» необходимого гена.

Другой подход включает короткие по продолжительности тесты с использованием нескольких биомаркеров для выявления определенного вида нанотоксичности. Эти эксперименты имеют высокую норму сигнал/шум и хорошую повторяемость. Если механизм нанотоксичности понятен, то его легко повторить в тестах *in vitro*.

Нанобезопасность: от животных-моделей к моделям животных

Современные технологии существенно отличаются от тех, которые были во времена Russell'a и Burch'a столетия назад. Неизменными остаются принципы гуманной экспериментальной техники, получившие название «Концепции трех R» [33]. Уже нельзя просто «взять животное», а следует выбрать между все возрастающим числом хорошо описанных видов животных, инбредных, трансгенных, нокаутных линий. В биомедицине наблюдается переход от выбора животных для эксперимента к созданию специализированных линий под задачи исследования. Новые парадигмы

современной биомедицины и биотехнологий заключаются в том, что жизнь может быть изучена не только в целостном организме, но и в отдельных клетках вне животного, что дает новый импульс альтернативному биомоделированию.

В 2008 г. за открытие зеленого флуоресцентного белка (GFP) О.Симомура, М.Чалфи и Т.Роджер были удостоены Нобелевской премии. На основе аналогичных исследований в нашем Центре осуществляется перенос гена зеленого белка (мышь линии B10.GFP) на генотип мышей линии C57BL/KsLeprdb/+, на основании которых создаются новые биомодели для визуализации и поиска новых эффективных способов лечения и оценки наноматериалов (рис. 6).

Можно ли считать эти направления исследований в качестве альтернативного биомоделирования? На данном этапе развития науки на этот вопрос следует ответить утвердительно, рассматривая его как концептуальное пространство создания новых «моделей животных», что существенно изменит взгляды на путях инновационного нанотоксикомоделирования. Такие предпосылки уже имеются, а в лабораториях генетики и постгеномных технологий нашего Центра они осуществляются. Их суть заключается в том, что когда создается новая генетически модифицированная модель животного, меняются сама суть, понятия и определения нового вида «эксперимента». В системе «новых экспериментов» следует сначала выделить четыре фазы: получение овоцитов из суперовулированных самок мышей (фаза 1), отбор и имплантация удачных эмбрионов в суррогатных матерей (фаза 2); маркировка новорожденных детенышей и генетический анализ тканей (фаза 3); программы кросс-бридинга,

включающие получение, создание запаса животных, дополнительный генетический анализ (*фаза 4*).

Основные же условия использования животных в эксперименте, такие как научная методология, возможность применения принципа трех R, оценка баланса между страданиями животных и важностью целей исследования позиционируются в *фазе 5*. Хотя этические нормы в большинстве своем подразумеваемы, они редко бывают научными. Одни из них несомненны: *научные*, в виде составления плана на основе подходящей методологии; *экономичные* для уменьшения количества животных; *эмпатичные*, в форме использования методов, уменьшающих страдания/дискомфорт; *скромные*, т.е. использование клеточных культур вместо животных. Другие, как, например, баланс и основа логики – *этический принцип пропорциональности* – дискуссионны [2, 3].

Разумеется, никто не будет создавать новую линию, моделирующую те или иные особенности животных для каждого наноматериала. Но и на существующих биомоделях можно просто не увидеть возможные риски и опасности нанопродуктов. По мере накопления данных о свойствах и закономерностях действия наночастиц будут выявляться требования к животным-моделям и *моделям животных*. Важно то, что пути их конструирования на основе фенотипических полиморфизмов существуют уже сейчас.

Альтернативные модели

Естественно, что в тестах на оценку токсичности наноматериалов применительно к человеку и окружающей среде

пока использовали лишь общие подходы. Необходимы новые оценки потенциальной токсичности ингаляций, оральной и кожной токсичности таких наноматериалов как углеродные частицы, двуокись кремния, фуллерены, оксид магния, оксид цинка и диоксид титана. Диоксид титана используется в 70% мирового производства красителей и косметики. В то же время он классифицирован Международным Агентством по изучению рака как возможный канцероген человека [20].

Необходимо развитие и поиск альтернативных моделей на основе методов оценки физико-химических, протеиновых и иммунных процессов.

Химическое взаимодействие наноматериалов. Окислительный потенциал, образование свободных радикалов, липидные и водорастворимые составляющие, твердые/жидкие фракции наночастиц и их свойства, летучесть, pH наноматериалов, могут быть измерены экспериментально, или, в ряде случаев, рассчитаны с определенной степенью достоверности. Традиционно эти химические параметры используются в QSAR-моделях для предсказания токсикологических точек окончания эксперимента (т.е. с использованием уже существующих данных из экспериментов на животных). Могут быть также включены качественные показатели: данные по кинетике (взаимодействия, липофильность, гидроскопичность) с использованием имеющихся баз данных по опытам *in vivo*. В моделях *in silico* входные химические параметры для наноматериалов могут быть также построены эмпирически.

Наночастицы и протенины. Для лучшего понимания любого метаболического

процесса при действии наноматериалов необходимо установить взаимодействие с протеинами для стимулирования иммунного отклика. Разработан подход *in chemico* для определения профиля взаимодействия с использованием панели из шести простых пептидов AcFAAXAA, где X = Cys, Lys, Tyr, His или Arg с окончанием H₂N-FAAAAAA N-нуклеотида. В этом подходе можно получить взаимодействие пептидов отобранных нуклеотидов для предварительного тестирования, но не иммуногенетический отклик действия наночастиц, который определяют исключительно *in vivo*.

Хотя нет необходимости воздействовать прямо на ткани для выяснения их чувствительности при оценке наноматериалов, в настоящее время создаются клинические «воспалительные» базы данных, с использованием dodecyl – SDS для оценки потенциальных «наноомик»-технологий при создании баз данных для оценки рисков наноматериалов (рис. 7). Интерстициальная жидкость оптимальна для протеомики, метаболомики (масс-хроматографическая спектрометрия газов) и анализа цитокинов (люминимультиспектральный анализ). Эти исследования дают большое количество данных для транскриптомики, которые затем подвергаются анализу с использованием большого числа биоинформационных методов, включая платформу Cytoscape (США). Этот набор аналитических подходов весьма полезен для идентификации большого числа новых генных сетевых работ и методик, которые, как ожидается, могут быть полезны в применении новых информационных средств и «наноомик» технологий для определения точек окончания эксперимента в других ситуациях и случаях (рис. 7).

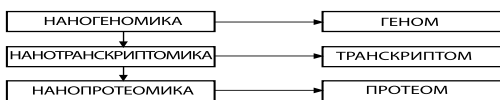


Рис. 7. На основе изучения генополиморфизма возникли три уровня аналитических подходов (*ген-РНК-белок*) на путях от геномики к протеомике, которые становятся базой для оценки нанобезопасности.

Наноиммунные процессы. В этом направлении также осуществляется активный поиск новых альтернативных моделей.

а) *Эпидермальное воспаление.* Создание воспалительного отклика было индуцировано на предплечье и было отображено биопсия кожи для анализа методами транскриптомими (полная последовательность генома человека), протеомики (в совокупности с масс-спектроскопией с использованием ITRAQ™ пептидные метки) и иммуногистохимии. Кератиноциты – преобладающие эпидермальные клетки внутри кожи. Они производят большое количество воспалительных цитокинов, которые поднимают тревогу в клетках Лангерганса в присутствии инфекционных агентов или наночастиц. С учетом этой роли в моделировании расширения деятельности клеток Лангерганса, активность кератиноцитов может быть использована как модель эпидермального воспаления. Эта информация может быть базовой для последующих исследований. Хотя тестов, утвержденных Европейским центром по валидации альтернативных методов, для определения повреждений кожи при действии наноматериалов пока нет, они активно разрабатываются [27].

б) *Активация дендритных клеток.* Два метода, основанных на моделях клеток, подобных моноцитам человека,

находятся в настоящее время на рассмотрении для изучения возможностей их применения в нанотехнологиях. Например, была проведена серия опытов для изучения откликов дендритных клеток с лигандами Toll-like рецепторов до или в процессе воздействия наночастиц для выявления, могут ли эти молекулы синергетически усиливать рецепторы дендритных клеток или цитокиновую экспрессию [27]. Индуцированные наночастицами отклики (как для сенситизаторов, так и для не-сенситизаторов) могли быть синергетически усилены стимулированием Toll-like рецепторов. Результаты совместных исследований (COLIPA, Sens-it-iv Framework VI integrated project) направлены на изучение того, что, как предполагается, различные раздражители, включая наночастицы, активируют дендритные клетки различными путями. Забегая вперед можно сказать, что для определения дополнительных точек окончания эксперимента (т.е. цитокиновой секреции при воздействии наноматериалов [27]) могут понадобиться методы дополнительной активации существующих дендритных точек, в соответствии с их химически обусловленными доменами [27].

в) *Пролиферация Т-клеток*. Первичная пролиферация Т-клеток как отклик на химическое воздействие наноматериалов – индикатор того, что субстанция является иммуногенной. Имеются публикации по первичной пролиферации Т-клеток *in vitro*. Но протоколы по ко-культурам Т-клеток делают такие подходы трудозатратными и пока крайне сложными для стандартизации [27].

Статистические модели или высокая точность ошибки

Точность является результатом выбранной для моделирования цели. Клеточная культура – модель низкой точности человека. Нечеловекообразные приматы или мини-свиньи – модели более высокой точности, т.к. в большей степени отражает человека. Поскольку люди аутобредны, то этим часто аргументируют выбор аутобредных животных для эксперимента, подкрепляя их некими статистическими выкладками, которые зачастую соответствуют парадоксу Марка Твена: «Есть ложь, наглая ложь и статистика».

Ошибка при построении такого рода «статистических моделей» заключается в постулате того, что модели должны быть точными. В действительности нам нужны модели для различения компонент, которые являются токсичными и нетоксичными на заданном уровне дозы наноматериалов. Абсолютно не важно, будет это получено с помощью «черного ящика», на клеточных культурах, мышцах или приматах. Важно одно, правильно ли модель отражает токсичность для человека или окружающей среды. Мы не должны строить модель, подобную человеку во всех отношениях. Хорошая статистическая модель для токсикологии в конечном счете не модель с неконтролируемыми генетическими вариациями, найденными у человека. Клинические испытания должны быть большими, так как люди имеют большую изменчивость. Кривые оценки доза–отклик, оцененные токсикологами, зачастую неточны, так как они получены на неконтролируемых по генетическим признакам животным, но тем не менее экспериментаторы пере-

дают их своим коллегам-клиницистам для получения результата с большими затратами, неточностями и иными неприемлемыми издержками.

Анекдотично, но классический статистический анализ играет весьма *несущественную роль* в оценке токсикологических эффектов [17, 18], в том числе и для нанопродуктов. Типичный кратковременный тест токсичности может включать данные по гематологии, клинической биохимии, весу органов и результаты гистологии, а также другие переменные, насчитывающие более 100 наблюдений по каждому животному – или более 8000 показателей. Результаты, как правило, конфиденциальны для коммерческих компаний и регулирующих органов, поэтому не понятно, какие статистические методы были использованы в конкретном случае или как они были интерпретированы. Если же результаты таких исследований публикуются, в отчет включают лишь несколько результатов, а использованные стандартные статистические методы, зачастую не подходят к сложным экспериментам.

Это может привести к *ложным положительным выводам*. С другой стороны поправка Бонферони может не подходить к данным исследованиям, так как показатели коррелируют друг с другом. Более подходящими являются многовариантные методы (широко используемый теперь анализ *микроэкспериментов*), но они сложны для интерпретации результатов. Если используются несколько инбредных линий, это добавляет сложности. Результаты экспериментов должны интерпретироваться максимально доступно. Далеко не все различия между испытуемыми группами действительно важны токсикологически [17].

Оценка безопасности наноматериалов без использования животных может проводиться на основе моделирования процессов, например с помощью методов Монте Карло. Новые экспериментальные подходы, основанные на *ex vivo* кожи человека, изучают такие параметры как сравнительные концентрации нанопродуктов на коже и кинетику наночастиц. Затем могут быть проведены исследования *in silico* для извлечения информации о сравнительной биоактивности кожи и установления математических параметров данных. Однако реальные показатели биоактивности свободных наноматериалов в стенке ЖКТ, альвеолах или коже зависят от их метаболизма, адсорбции тканей и понимания механизмов происходящих процессов [27].

Компьютерные модели

Современные методы *компьютерного моделирования* позволили разработать алгоритмы и программы для более точного прогноза ожидаемой токсичности, а также эффектов воздействия на здоровье человека. Эти компьютерные программы получили обобщенное название *модели количественных соотношений между структурой и активностью* (Quantitative Structure-Activity Relationship – QSAR models).

Модель TOPKAT для изучения на крысах пероральных препаратов содержит 19 моделей QSAR, данные из этих моделей были получены для обработки экспериментальных данных по летальным дозам (LD_{50}) на основе оценки 4000 химических веществ. Каждая *количественная модель определения структуры токсичности QSAR* оценивает LD_{50} для крыс по пероральным препаратам

для определенного набора химических средств. Модель ТОРКАТ для изучения на крысах препаратов, применяемых в виде ингаляций, содержит 5 моделей QSAR, и данные по всем этим моделям были получены в эксперименте *по средним летальным концентрациям* LC_{50} для почти тысячи химических веществ, включая наноматериалы. В модели учтены время проведения эксперимента 0,5-14 часов, точки окончания экспериментов и концентрации. Химические вещества были сгруппированы в 5 классических моделей. Каждая QSAR-модель оценивает острую LC_{50} для крыс по специфическому классу химических веществ в единицах моль/м³/час [39]. Развитие нанотехнологий требует создания аналогичных и специальных моделей по всем группам наноматериалов.

В Отчете международного семинара по методам *in vitro* для оценки системы острой токсичности (Report of the International Workshop on *in vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity) указывается, что для оценки острой токсичности нет необходимости проводить тесты для выявления всех специфичных эффектов по влиянию на органы в моделях *in vitro*. Вместо этого, может быть достаточно, провести тестирование энергетического метаболизма и способности химических веществ, а значит и наноматериалов, нарушать функции эпителиального барьера. Кроме того, не существует методов *in vitro* для прогноза острой токсичности в опытах с ингаляциями, хотя некоторые модели еще находятся на стадии развития и компьютерного моделирования.

В настоящее время не существует подходящих альтернативных методов существующих для оценки биокинетических

факторов, а также токсико- и фармакокинетики наносоединений. Эти методы необходимо использовать в комбинации с альтернативными методами определения точек окончания эксперимента, в соответствии со стратегией развития схем новых методов включая острую токсичность [13, 19]. В любом случае, обозримое будущее не сулит полную замену лабораторных животных альтернативными и статистическими моделями, хотя научные тенденции альтернативного и компьютерного моделирования и желания исследователей вселяют надежду на прогресс в этой области знаний.

Заключение

Влияние инженерносозданных нанотехнологических материалов на здоровье изучено недостаточно. До настоящего времени дебатов и дискуссий в литературе больше, чем конкретных данных об их действии. Наноматериалы не являются простым гомогенным классом. Большое число параметров, характеризующих физико-химические и квантово-механические свойства наночастиц и наноматериалов, пока не экстраполированы в отношении человека и окружающей среды в аспекте их рисков, безопасности и токсикологических характеристик.

Отсутствуют адекватные модели, которые позволили бы познать сущность нанотоксического действия различных материалов. Это в равной степени относится как к животным-моделям, так и к альтернативным, математическим, компьютерным моделям на уровне клеточного и субклеточного действия наноматериалов. Это подтвердилось при исследовании нами биологических и