

Разработка и оптимизация протокола тестирования токсичности веществ с молекулярной массой более 3 кДа на рыбах (Zebra fish).

Актуальность исследования

Тестирование острой токсичности веществ на эмбрионах рыб (Fish Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test), активно вытесняет более дорогостоящие, трудоемкие и сопряженные с этическими проблемами токсикологические исследования на других видах позвоночных. В настоящее время существует несколько стандартизированных протоколов FET. Для оценки токсичности наночастиц и полимеров с молекулярной массой более 3 кДа требуется дополнительная модификация FET – дехорионизация. Сроки и способы удаления хориона (ферментативный или механический) могут существенно влиять на результаты теста, как и выбор критериев оценки сублетального повреждения. Таким образом, требуется оптимизация способов дехорионизации с целью стандартизации и минимизации влияния дополнительного вмешательства на результаты тестирования, а так же выбор наиболее чувствительных критериев токсического повреждения. Более того эмпирически выведенная формула, позволяющая рассчитать LC_{50} для взрослых особей на основании данных FET, требует уточнения в случаях проведения дехорионизации, высокой молекулярной массы и наличие дополнительных свойств исследуемого вещества, например, магнитных. С этой целью требуется сопоставление результатов токсикологических исследований на взрослых особях и эмбрионах рыб.

Научная платформа

Инновационные фундаментальные технологии в медицине

Планируемый (ые) научные подразделения исполнители (с указанием руководителя исследования)

Руководитель исследования - Галагудза Михаил Михайлович, директор Института экспериментальной медицины ФГБУ "СЗФМИЦ им. В.А.Алмазова" Минздрава России, д.м.н., член-корреспондент РАН

Исполнители:

НИО токсикологии Центра доклинических трансляционных исследований Института экспериментальной медицины

НИЛ нанотехнологий Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины

НИГр экспериментальной патоморфологии Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины

НИЛ биопротезирования и кардиопротекции Центра экспериментального биомоделирования Института экспериментальной медицины

Ключевые слова

Zebra fish, токсичность, эмбриотоксичность, дехорионизация, наночастицы, магнитные наночастицы

Цель проекта

Разработка и валидация универсального протокола исследования токсичности высокомолекулярных веществ на эмбрионах рыб.

Задачи проекта

1. Сравнение влияния механического и ферментативного (с помощью проназы) способа дехорионизации на выживаемость эмбрионов Zebra fish.

2. Изучение возможности использования «неполной» дехорионизации – создание крупного дефекта в хорионе без его удаления, как более физиологичной и простой альтернативы «полной» механической дехорионизации.
3. Изучение отдаленных последствий разных способов дехорионизации на зрелые особи рыб с помощью морфологических исследований.
4. Определение оптимального срока удаления хориона ранее выбранным способом дехорионизации с помощью оценки степени смертности и травматизации эмбрионов.
5. Отработка методики проведения теста на эмбриотоксичность на дехорионизированных эмбрионах: содержание эмбрионов и замена раствора с осаждаемыми частицами вещества.
6. Сопоставление результатов теста на эмбриотоксичность с «неполной» и «полной» дехорионизацией для полимера (Luviquat НМ 552) и наночастиц различного химического состава (магнитные, кремниевые и хитозановые наночастицы).
7. Изучение отдаленных последствий теста на эмбриотоксичность с дехорионизацией для полимера (Luviquat НМ 552) и наночастиц на зрелые особи рыб с помощью морфологического исследования.
8. Определение наиболее чувствительных маркеров сублетального повреждения при поведении теста на эмбриотоксичность с дехорионизацией с полимерным веществом (Luviquat НМ 552) и различными типами наночастиц.
9. Исследование влияния магнитного поля на результаты теста на эмбриотоксичность с дехорионизацией при использовании магнитных наночастиц.
10. Изучение отдаленных последствий теста на эмбриотоксичность с дехорионизацией при тестировании токсичности магнитных наночастиц, проведенном в условиях воздействия магнитного поля на зрелые особи рыб с помощью патоморфологического исследования.
11. Проведение токсикологических исследований полимерного вещества (Luviquat НМ 552) на взрослых особях рыб и сопоставление их с результатами теста на эмбриотоксичность с дехорионизацией для выяснения правомерности использования расчетной формулы для определения LC_{50} у взрослых особей для веществ с высокой молекулярной массой.

Ожидаемые результаты проекта

Для повышения биодоступности фармакопрепаратов активно изучают возможности адресной доставки с помощью наноносителей. Использование наночастиц в медицине призвано увеличить эффективность фармакотерапии и снизить риск побочных эффектов, связанных с ней, что делает необходимым разработку наноносителей, безопасных для человека. Поскольку список новых наночастиц постоянно растет и потенциально безграничен, простой и точный способ экспресс-оценки их токсикологических свойств, для более глубокого дальнейшего изучения, призван ускорить процесс внедрения в клиническую медицину. Среди методик токсикологических исследований на позвоночных – FET на эмбрионах Zebra fish (DIN, 2001) является наиболее изученным, простым и экономически выгодным. Однако токсикологические исследования веществ с высокой молекулярной массой требуют дополнительных изменений в стандартных протоколах FET.

В результате выполнения проекта планируется:

1. Создание универсального протокола для изучения острой токсичности веществ с крупной молекулярной на эмбрионах Zebra fish.
2. Выяснение влияния дехорионизации на результаты теста FET с помощью сравнения разных протоколов удаления хориона и анализа литературы.
3. Определение токсичности (LC_{50}) четырех типов наночастиц с различными физико-химическими свойствами: магнетит, кремнезем, магнетит-кремнезем, хитозан.

4. Определение наиболее чувствительных критериев сублетального повреждения с помощью морфологического исследования взрослых особей рыб после проведения на них FET с дехорионизацией и экспозиции наночастиц (магнетит, кремнезем, магнетит-кремнезем, хитозан) и полимера (Luviquat HM 552).
5. Определение возможности экстраполировать результаты экспресс-тестирования токсичности наночастиц, полученные в результате модифицированного FET, на взрослых особей рыб.
6. Разработанные протоколы и методические подходы к изучению безопасности наноразмерных носителей на эмбрионах и взрослых особях рыб Zebra fish будут защищены 1 патентом на изобретение.

Назначение и предполагаемое использование (внедрение) результатов проекта

Использование полимерных соединений нашло широкое применение в современной медицине, особенно за счет концепции адресной доставки с помощью наноносителей. Улучшение биодоступности ранее известных лекарственных и диагностических препаратов может значительно расширить диапазон их применения, а также улучшить прогноз для многих пациентов с тяжелой патологией: онкология, сердечно-сосудистые, наследственные и другие заболевания. В свою очередь, сами наночастицы должны быть максимально безвредны для человека.

На сегодняшний день наиболее признанной во всем мире, в том числе Новым Европейским Законодательством (REACH), методикой оценки острой токсичности веществ можно считать тестирование эмбриотоксичности на рыбах Zebra fish. Преимуществами данной методики являются ее дешевизна, высокая воспроизводимость результатов и относительная простота в плане этической регламентации использования животных в медицине. Известно, что полученные результаты с большой точностью могут быть перенесены на взрослых особей и другие виды позвоночных, включая человека. Однако до сих пор не существует единого мнения об использовании данного теста для веществ, молекулярная масса которых не позволяет им проникнуть через хорион эмбрионов рыб, что требует дополнительных вмешательств, способных влиять на результаты теста.

Таким образом, итоговый результат проекта заключается в определении единых условий тестирования токсичности наночастиц на эмбрионах рыб, что позволит на раннем доклиническом этапе качественно и в сжатые сроки определять целесообразность дальнейшего исследования данного полимера в качестве основы для производства лекарственных наночастиц.

Описание предлагаемого научного исследования

Проблема токсичности наночастиц и наноматериалов, находящих применение в медицине в качестве переносчиков лекарственных препаратов, матриц и 3D-скаффолдов для тканеинженерных структур, в последние годы находится в центре внимания специалистов различных областей. Для дальнейшего развития нанотоксикологии требуется совершенствование методического аппарата и разработка стандартизированных протоколов тестирования безопасности наноразмерных частиц. В данном исследовании планируется разностороннее сравнение подходов к проведению тестов на эмбриотоксичность на Zebra fish для веществ с высокой молекулярной массой. Известно, что относительно крупные частицы не способны проникать через хорион, вызывая ложноположительный результат, в случае закупорки ими пор в хорионе, либо ложноотрицательный результат, в случае затрудненного проникновения вещества к тканям эмбриона. Само по себе удаление хориона является грубым вмешательством и может исказить результат исследования. Выяснение влияния сроков и способов удаления хориона на получаемый результат является одной из задач настоящего проекта. Будут разработаны способы оценки токсичности для наночастиц с учетом их физико-

химических свойств: размера, формы, скорости осаждения в растворе, биodeградируемости, наличия магнитных свойств и т.п. С помощью катионного полимера Luviquat HM 552 будет выполнен тест на эмбриотоксичность и токсичность в отношении взрослых особей рыб, для выяснения возможности переноса данных, полученных при помощи FET с дехорионизацией, на взрослых особей того же вида с помощью формулы, обычно используемой для молекул, проникающих через хорион.

Описание научных подходов и методов, используемых для решения поставленных задач

На начальном этапе будет проведен сравнительный анализ литературы по теме проекта. В качестве основного протокола FET будет использован протокол OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS, 2012. Fish Embryo Acute Aquatic Toxicity (FET) Test. Все исследования будут проводиться на Zebra fish SPF-категории, находящихся в стандартных условиях содержания (ZebTech, Techniplast, Italy).

Все поверхности, контактирующие с дехорионизированными эмбрионами (чашки Петри, 24-луночные планшеты), будут покрыты 2% агарозным гелем.

Морфологические исследования эмбрионов Zebra fish будут проводиться *in vivo* с помощью инвертированного биологического микроскопа Nikon Eclipse TI-S.

Анализ изображения будет производиться визуально и с помощью программного обеспечения NIS-elements Nikon.

Проведения манипуляций с эмбрионами Zebra fish будут проводиться с использованием инвертированного биологического микроскопа Nikon Eclipse TS-100.

Для проведения дехорионизации будут отработаны следующие методики:

1. Механическая дехорионизация эмбрионов Zebra fish по методике Henn, 2011;
2. Ферментативная (с помощью фермента проназы) дехорионизация эмбрионов Zebra fish по методике Westerfield, 2007.

Определение токсического повреждения эмбрионов и элеутероэмбрионов для расчета летальной дозы (LC₅₀) будет оцениваться по 4 главным критериям: коагуляция эмбрионов, отсутствие формирования сомитов, отсутствие отделение хвоста, отсутствие сердцебиения через 24 часа после фертилизации. Перечисленные критерии будут определяться 1 раз в 24 часа на протяжении 96 часов.

Также будут оцениваться «минорные» (сублетальные) признаки токсического повреждения: отсутствие спонтанных движений, другие нарушения развития сердечно-сосудистой системы, общая задержка развития, задержка пигментации, формирования отека.

Физико-химические характеристики субстанций, используемых в тесте FET с дехорионизацией:

1. Катионный полимер Luviquat HM 552,
2. Магнитные наночастицы из магнетита игольчатой формы,
3. Магнитные наночастицы из магнетит-кремнезема сферической формы,
4. Биodeградируемые наночастицы из хитозана сферической формы,
5. Наночастицы из кремнезема сферической формы.

Для токсикологического исследования на взрослых особях рыб будет использован катионный полимер Luviquat HM 552.

Патоморфологические исследования взрослых особей рыб будут проводиться с помощью макроскопической оценки и с помощью гистологических исследований (печени, почек, головного мозга, мышечной ткани) со стандартной окраской гематоксилин-эозином.

В экспериментах с дехорионизацией FET будут исследованы:

1. Различные методики дехорионизации;
2. Влияние срока дехорионизации на выживаемость эмбрионов;
3. Будет апробирован способ неполной дехорионизации;

4. Будет определена токсичность (LC_{50}) для четырех типов наночастиц с различными физико-химическими свойствами;
 5. Будет оценена чувствительность сублетальных признаков повреждения.
- Также сравнение токсикологических исследований на взрослых особях рыб полимера Luviquat НМ 552 с результатами FET с дехорионизацией позволит оценить правомерность использования расчетной формулы: $\log \text{Fish } LC_{50} = 1.07 \times \log \text{FET } LC_{50} - 0.35$ для определения LC_{50} у взрослых особей по данным FET для веществ с высокой молекулярной массой.