

федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской
Федерации
(Сеченовский Университет)

Методические рекомендации

Элективные дисциплины:

- **МЕДИЦИНСКАЯ ХИМИЯ**
- **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ОСНОВНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛОВЕКА И БИОДИЗАЙН
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**
- **ОСНОВЫ РАБОТЫ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ**

основная профессиональная образовательная программа
высшего образования - программа специалитета

33.05.01 Фармация



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Ферменты в свете дисциплины Медицинская химия и в свете разработки лекарственных препаратов.



ПРИМЕНЕНИЕ ФЕРМЕНТОВ В МЕДИЦИНЕ

Широкое применение в медицинской практике ферменты находят в качестве диагностических (**энзимодиагностика**) и терапевтических (**энзимотерапия**) средств.

Ферменты также используются в качестве **специфических реактивов** для определения ряда метаболитов.



Энзимодиагностика

заключается в постановке диагноза заболевания (или синдрома) на основе определения активности ферментов в биологических жидкостях человека.

К ферментам, используемым в энзимодиагностике, предъявляют следующие требования:

- органоспецифичность (тканеспецифичность) фермента;
- выход фермента в кровь при повреждении органа или ткани;
- низкая активность фермента в крови в норме.

При этом условно различают:

- Неспецифические ферменты;
- Тканеспецифические ферменты.



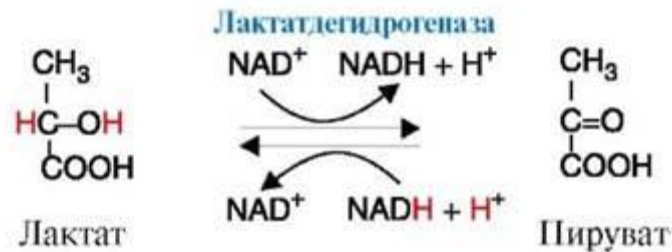
Ферменты, катализирующие одну и ту же химическую реакцию, но с разной первичной структурой белка, называют **изоферментами**.

Изоферменты часто являются **органоспецифичными**.

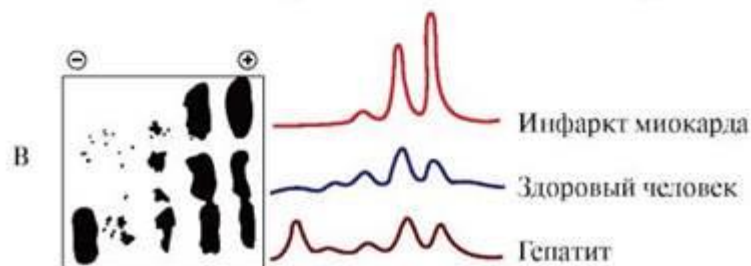
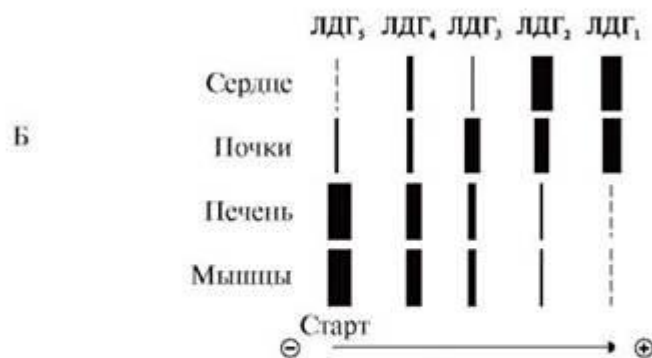
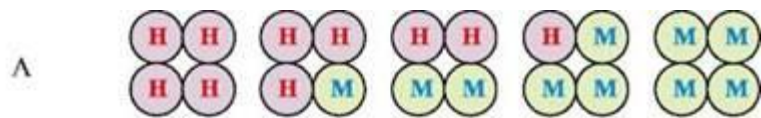


Лактатдегидрогеназа - олигомерный белок, состоящий из четырех субъединиц двух типов

- **M** (от англ. muscle - мышца)
- **H** (от англ. heart - сердце).



Реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой (ЛДГ)



Изоформы лактатдегидрогеназы:

А - строение различных изоформ ЛДГ;

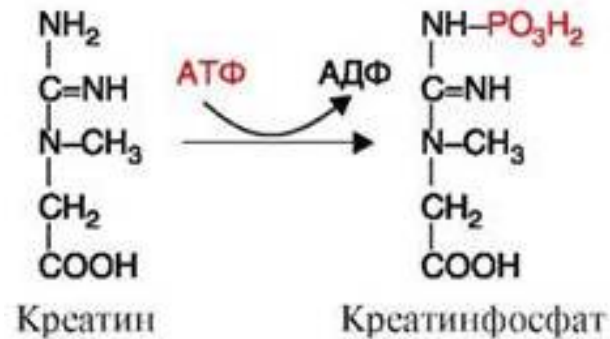
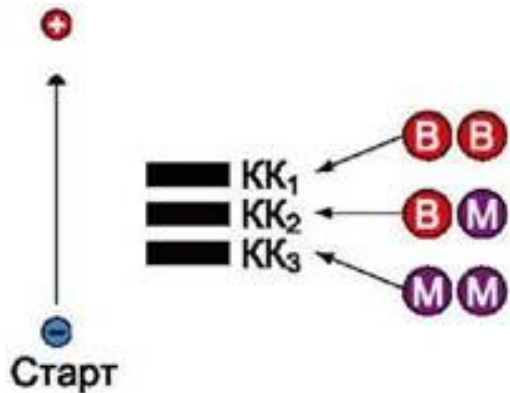
Б - распределения на электрофореграмме и относительные количества изоформ ЛДГ в различных органах;

В - содержание изоформ ЛДГ в плазме крови в норме и при патологии (электрофореграммы - слева и фотометрическое сканирование - справа)

Молекула **Креатинкиназа** представляет собой димер, состоящий из субъединиц двух типов

- **M** (от англ. muscle - мышца)
- **B** (от англ. brain - мозг).

Эти субъединицы образуют три изофермента: **BB**, **MB**, **MM**.
Изофермент BB находится преимущественно в головном мозге, MM - в скелетных мышцах и MB - в сердечной мышце.



Реакция, катализируемая ферментом креатинкиназа (K)

Структура и электрофоретическая подвижность различных изоформ креатинкиназы

При карциноме простаты, патологии костной ткани, метастатических карциномах определяют активность кислой фосфатазы, щелочной фосфатазы, холинэстеразы и некоторых других органоспецифических ферментов в сыворотке крови.

Принципы энзимодиагностики основаны на следующих позициях:

1. при повреждении клеток в крови или других биологических жидкостях (например, в моче) увеличивается концентрация внутриклеточных ферментов повреждённых клеток;
2. количество высвобождаемого фермента достаточно для его обнаружения;
3. активность ферментов в биологических жидкостях, обнаруживаемых при повреждении клеток, стабильна в течение достаточно длительного времени и отличается от нормальных значений;
4. ряд ферментов имеет преимущественную или абсолютную локализацию в определённых органах (органоспецифичность);
5. существуют различия во внутриклеточной локализации ряда ферментов.

Наиболее распространены следующие энзимодиагностические тесты:

- при заболеваниях сердца (инфаркт миокарда);
- при заболеваниях печени
- при заболеваниях поджелудочной железы;
- при заболеваниях простаты.



Применение ферментов в качестве лекарственных препаратов активно развивают в следующих направлениях:

- *заместительная* терапия;
- *элементы комплексной* терапии.

Применение ферментов в качестве лекарственных средств

1. Самыми распространенными ферментативными препаратами являются комплексы ферментов желудочно-кишечного тракта (Фестал, Панзинорм форте, Мезим форте, Энзистал и т.п.), содержащие **пепсин**, **трипсин**, **амилазу** и т.п., и используемые для заместительной терапии при нарушениях переваривания веществ в желудочно-кишечном тракте.
2. **Трипсин** – ингалируют при бронхолегочных заболеваниях для разжижения густой и вязкой мокроты.



3. **Фицин** используется в фармацевтической промышленности в качестве добавки к зубным пастам для удаления зубного налета.



4. **Рибонуклеаза** и **дезоксирибонуклеаза** входят в состав глазных капель для лечения вирусных конъюнктивитов.

При нанесении на рану они разжижают гной, при ингаляциях уменьшают вязкость слизи, деполимеризуя нуклеиновые кислоты в мокроте.



5. Ферментные препараты стали широко применяться при тромбозах и тромбоэмболиях для разрушения тромба.

например, **фибринолизин** (син.: плазмин), **стрептодеказа**, **стрептолиаза**, **урокиназа**, используемые для растворения свежих тромбов, обычно выделяются в самостоятельную группу



6. **Цитохром с** - белок, участвующий в процессах тканевого дыхания.

Его применяют при асфиксии новорожденных, астматических состояниях, сердечной недостаточности, различных видах гепатита и т.п.



7. Тканевой фермент **гиалуронидаза** нужна организму для обратимого изменения проницаемости межклеточного вещества, в основе которого находится гиалуроновая кислота.

Лекарственную форму гиалуронидазы - **лидазу** - вводят для размягчения рубцов, появления подвижности в суставах, рассасывания гематом.



8. **Коллагеназу** применяют для ускорения отторжения некротизированных тканей, для очистки трофических язв.



9. **Террилитин** – продукт жизнедеятельности одного из видов плесневых грибов. Обладает протеолитической активностью.

Применяется местно (при гнойных ранах, ожогах и др.) или в виде ингаляций (при заболеваниях легких и дыхательных путей).

10. Ферменты используют и в онкологии, например, для замедления развития лейкозов

Известно, что в лейкозных клетках отсутствует фермент, катализирующий синтез аспарагина. Они получают эту аминокислоту из крови. Внутривенное введение фермента **аспарагиназы**, катализирующего гидролиз аспарагина, снижает его концентрацию в крови, тем самым ограничивает поступление аминокислоты в опухолевые клетки



Реакция гидролиза аспарагина аспарагиназой



Иммобилизованные ферменты

ферменты, связанные с твердым носителем или помещенные в полимерную капсулу.



Для иммобилизации ферментов используют два основных подхода:

1. Химическая модификация фермента.
2. Физическая изоляция фермента в инертном материале.

Преимущества иммобилизованных ферментов:

1. Легко отделяются от реакционной среды, что позволяет использовать фермент повторно. Продукт не загрязнен ферментом.
2. Ферментативный процесс можно осуществлять непрерывно.
3. Повышается стабильность фермента.



Препаративное использование иммобилизованных ферментов в промышленности:

- Получение L-аминокислот с помощью аминокорилазы.
- Получение сиропов с высоким содержанием фруктозы с использованием глюкозоизомеразы.

Вопросы для самоподготовки.

- 1) Применение ферментов в медицинской практике в качестве диагностических и терапевтических средств.
- 2) Требования к ферментам, используемым в энзимодиагностике.
- 3) Диагностика заболеваний с учетом изоформ ЛДГ. Реакция, катализируемая лактатдегидрогеназой.
- 4) Клинико-диагностическое значение креатинкиназы. Реакция, катализируемая ферментом креатинкиназа.
- 5) Энзимодиагностика. Понятие, принципы, основные энзимодиагностические тесты.
- 6) Направления, на которые подразделяется применение ферментов в качестве лекарственных препаратов.
- 7) Применение ферментов в качестве лекарственных средств. (не менее 7 примеров).
- 8) Имобилизованные ферменты. Понятие, преимущества, применение.

Первый Московский государственный медицинский университет
им. И.М.Сеченова (Сеченовский университет)
Кафедра патологии человека ИКМ

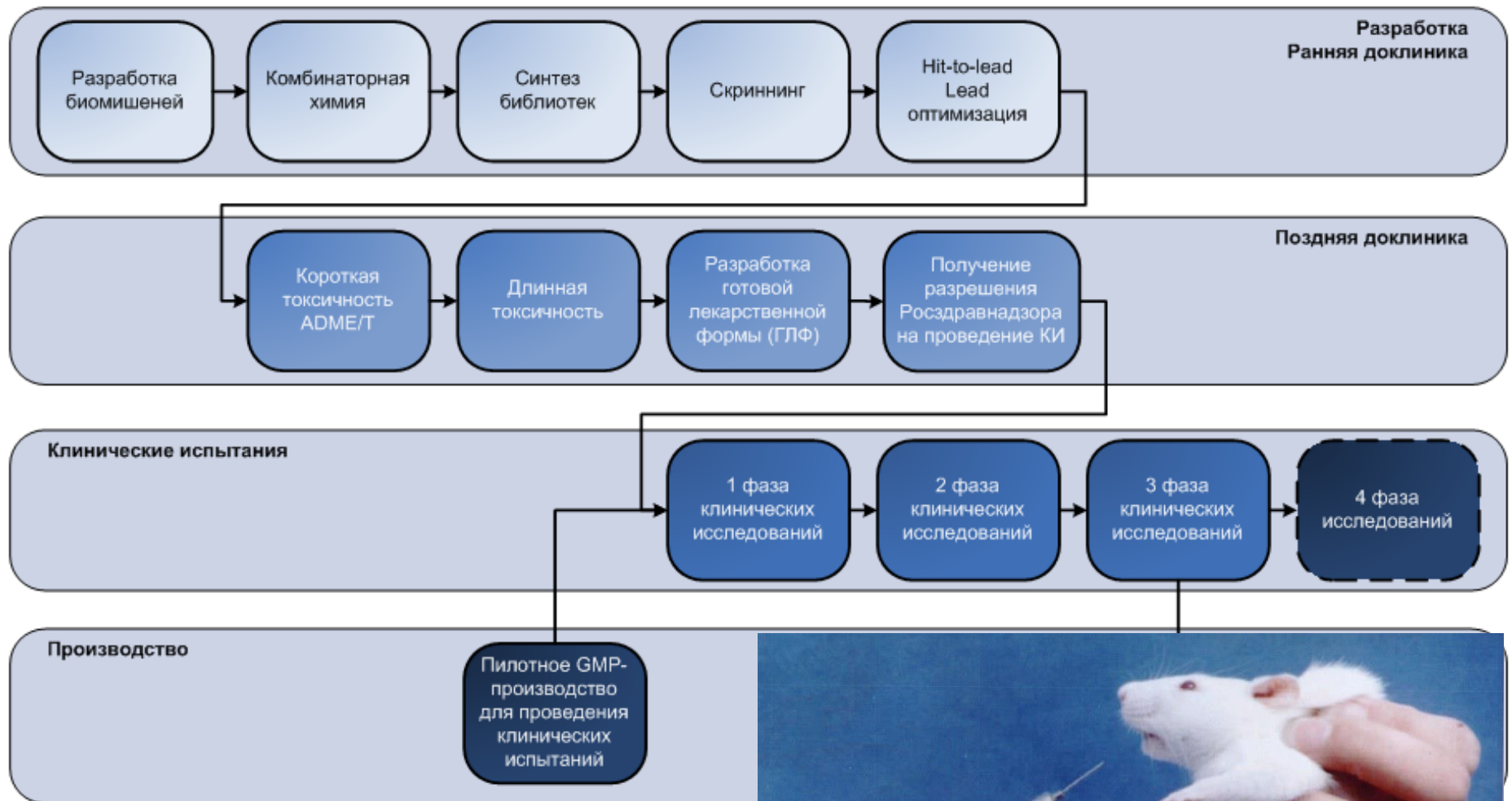
Доклиническое изучение лекарственных средств

Профессор
С.И. Воробьев

Основные термины и понятия

- **Доклиническое исследование лекарственного средства** - биологические, микробиологические, иммунологические, токсикологические, фармакологические, физические, химические и другие исследования лекарственного средства путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства;
- **Протокол клинического исследования лекарственного препарата** - документ, в котором определяются цели, формы организации и методология проведения клинического исследования, статистические методы обработки результатов такого исследования и меры по обеспечению безопасности физических лиц, участвующих в клиническом исследовании лекарственного препарата;

Доклинические исследования



Открытие и разработка нового лекарства⁶



Разработка новых препаратов

Пути открытия новых препаратов

- ЛП из растительных источников
- ЛП химического происхождения
- ЛП из эндогенных веществ животного происхождения
- Метаболиты существующих препаратов
- «Случайные» открытия
- Эмпирическая химия, объединенная с прикладной фармакологией
- Рациональное построение молекулы

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

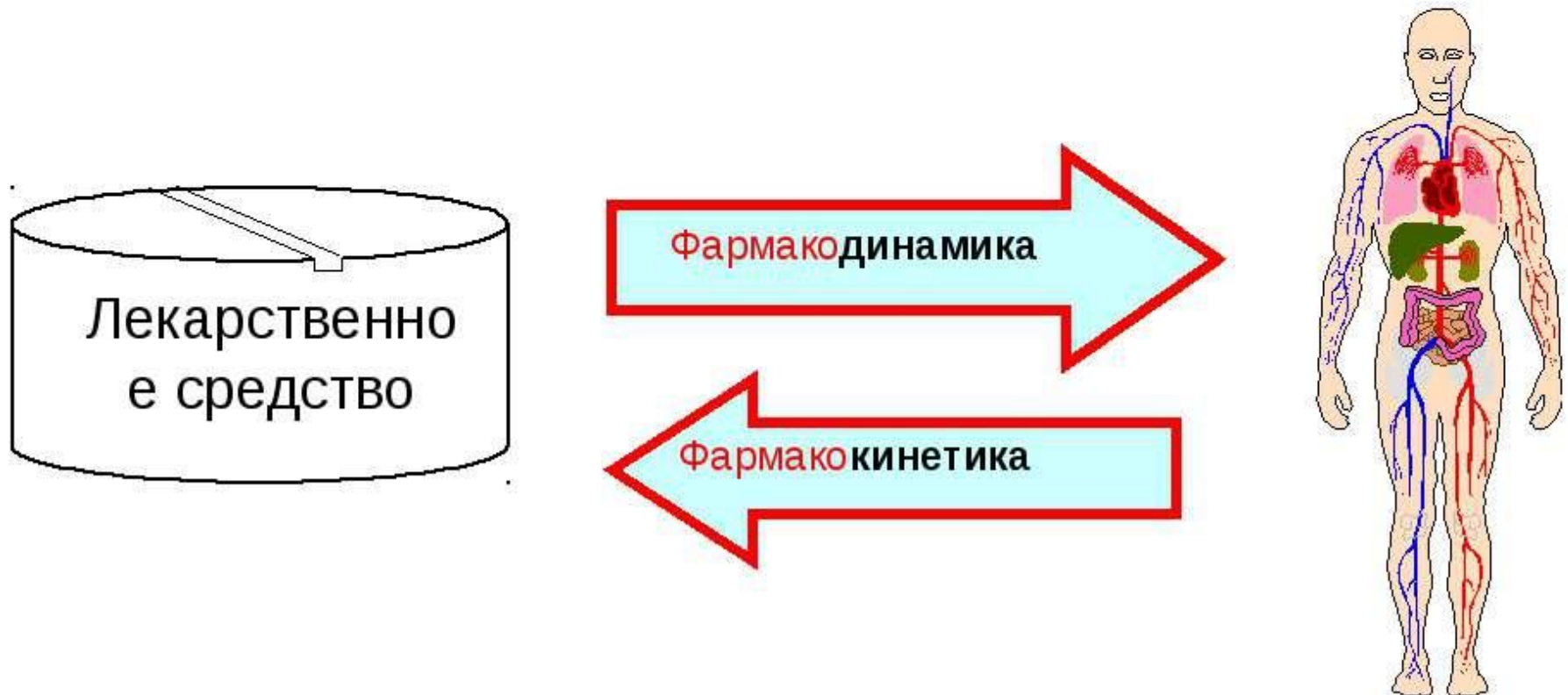
- **Фармакологическая активность** действующего вещества (первичная и вторичная фармакодинамика; фармакология безопасности);
- **Фармакокинетика** (абсорбция, распределение, метаболизм, выведение);
- **Токсикология** – определение потенциального риска при применении человеком.



Фармакология

(греч. *pharmakon* – лекарство, яд; и *logos* – учение)

- наука о взаимодействии
лекарств с биологическими объектами.



I. ПОЛНЫЕ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВКЛЮЧАЮТ:

1. Фармакология:

Первичная фармакодинамика

Вторичная фармакодинамика

Фармакология безопасности

Фармакодинамические взаимодействия

2. Фармакокинетика:

Аналитические методы и отчеты об их валидации

Абсорбция

Распределение

Метаболизм

Экскреция

Фармакокинетические взаимодействия (доклинические)

Другие исследования фармакокинетики

II. ПОЛНЫЕ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВКЛЮЧАЮТ:

3. Токсикология:

Токсичность разовой дозы

Токсичность многократной дозы

Генотоксичность

In vitro, In vivo

Канцерогенность

Долгосрочные исследования

Краткосрочные исследования или исследования средней продолжительности

Дополнительные исследования:

Репродуктивная токсичность и токсичность для потомства

Фертильность и раннее эмбриональное развитие

Эмбриональное развитие

До- и постнатальное развитие

Исследования, при которых детеныши получали лекарственный продукт и/или проводился дальнейший анализ.

Локальная толерантность

III. ПОЛНЫЕ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ВКЛЮЧАЮТ:

4. Дополнительные исследования токсичности:

Антигенность

Иммунотоксичность

Механистические исследования

Зависимость

Метаболиты

Примеси

Другие

Токсичность



- ▶ **Токсичность** - степень проявления вредного действия разнообразных химических соединений и их смесей.
- ▶ Разделяют **острую (акутную)** и **хроническую токсичность**.
- ▶ При острой токсичности «ответ» или «реакцию» получают относительно быстро (в течение 24-96 часов). Острая токсичность не обязательно означает летальный исход.
- ▶ Хроническая токсичность – это токсичность, которая действует в течение длительного периода, обычно в течение $\geq 1/10$ жизненного цикла рассматриваемого организма (длительное воздействие небольших концентраций токсикантов).
- ▶ **Биотестирование** - проведение анализов по определению токсичности с помощью живых организмов (чаще всего крыс)
- ▶ В настоящее время используют разные чувствительные организмы, например *Daphnia magna* (Water Flea, vesikirp), флуоресцирующие бактерии, морские организмы (*Champia parvula* или красный планктон, *Mysidopsis bahia* или *Mysid shrimp* (ракообразные)) и др.

Токсичность химических веществ

Хроническая и острая токсичность

Некоторые химические вещества наносят вред только при получении большой дозы за один раз. **Пример - аммиак**



Некоторые химические вещества в основном известны тем, что оказывают хроническое или долговременное воздействие. **Пример - асбест**



Большинство химических веществ оказывает как острое, так и хроническое воздействие. **Пример — угарный газ**



Острая токсичность -



- токсическое действие вещества, введенного в однократной дозе или в многократных дозах в течение не более 24 ч (не более 6 часов) интервалы в течение суток.
- токсичность исследуют при нескольких путях введения.
- общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности должна составлять не менее 2-х недель, причем в первый День после введения животные должны находиться под непрерывным наблюдением.

Хроническая токсичность

- Получение информации для установления предельно допустимых доз – максимальное кол-во в-ва, которое при продолжительном действии не вызывает каких-либо реакций, нарушающих уравнивание организма с внешней средой. Не приносит вреда индивидууму, подвергающемуся действию в-ва, и его будущим потомкам.

Понятие о токсических и летальных дозах

Минимальная токсическая доза - это уже гораздо большее количество яда, вызывающее отравление с комплексом характерных патологических сдвигов в организме, но без смертельного исхода. (Чем сильнее яд, тем ближе величины минимально действующей и минимально токсической доз).

Летальная (смертельная) доза - это количество яда, которое приводит человека (или животное) к гибели при отсутствии лечения. Летальные дозы определяются в результате опытов на животных.

В экспериментальной токсикологии чаще всего пользуются средней летальной дозой (DL50) или концентрацией яда (CL50), при которых погибает 50% подопытных животных.

Если же наблюдается 100%-ная их гибель, то такая доза или концентрация обозначается как абсолютная летальная (DL100 и CL100).

Параметры токсичности:

Параметры (критерии) токсикометрии, которые определяются непосредственно в эксперименте, называются экспериментальными, или первичными. В качестве экспериментальных параметров используются следующие.

CL₅₀ – концентрация средняя смертельная – вызывает гибель 50 % подопытных животных (мыши, крысы) при ингаляционном воздействии в течение соответственно 2 и 4 ч и последующем 14-дневном сроке наблюдения (мг/м³, мг/л).

DL₅₀ – доза средняя смертельная – вызывает гибель 50 % подопытных животных при однократном введении в желудок, брюшную полость с последующим 14-дневным сроком наблюдения (мг/кг).

DL₀ (CL₀) – доза (концентрация) максимально переносимая – наибольшее количество вредного вещества, введение которого в организм не вызывает гибели животных.

DL₁₀₀ (CL₁₀₀) – доза (концентрация) абсолютно смертельная – наименьшее количество вредного вещества, вызывающее гибель 100 % подопытных животных.

Параметры токсичности:

$\text{Lim}_{ac\ int}$ – порог острого интегрального действия – минимальная доза (концентрация), вызывающая изменения биологических показателей на уровне целостного организма, которые выходят за пределы приспособительных физиологических реакций.

$\text{Lim}_{ac\ sp}$ – порог острого избирательного (специфического) действия – минимальная доза (концентрация), вызывающая изменения биологических функций отдельных органов и систем организма, которые выходят за пределы приспособительных физиологических реакций.

$\text{Lim}_{ch\ int}$ – порог общетоксического хронического действия – минимальная доза (концентрация) вещества, при воздействии которой в течение 4ч по пять раз в неделю на протяжении не менее 4 месяцев возникают изменения, выходящие за пределы физиологических приспособительных реакций, или скрытая патология.

$\text{Lim}_{ch\ sp}$ – порог отдаленных эффектов – минимальная доза (концентрация) вещества, вызывающая изменения биологических функций отдельных органов и систем организма, которые выходят за пределы приспособительных физиологических реакций в условиях хронического воздействия.

Порог хронического действия служит наиболее важным параметром токсикометрии, позволяющим обосновать гигиенический регламент. Наиболее статистически значимы в характеристике токсичности ядов по смертельному эффекту CL_{50} и DL_{50} . Степень токсичности – величина, обратная средней смертельной дозе (концентрации).

Исследование острой токсичности

Острая токсичность - воздействие, вызывающее тяжелое отравление и гибель при однократном введении. Параметрами острой токсичности является ДЛ50 или ЛК50 (летальная концентрация), т. е. дозы или концентрации вещества, вызывающие гибель 50 % животных наблюдаемой группы.

Животные: мыши массой не более 20 г; крысы массой от 140 до 160 г; морские свинки массой от 250 до 350 г; кролики массой от 2,0 до 2,5 кг, животные других видов.

Формирование групп животных, получающих разные дозы испытуемого препарата и препарата сравнения, проводят методом случайной выборки (единица выборки - животное).

При внутривенной инъекции объем вводимого препарата на 1 кг массы животного не должен превышать: для мышей - 25 мл, для крыс и морских свинок - 15 мл, для кроликов - 10 мл.

Максимальные объемы должны вводиться мышам в течение 5 сек, крысам и морским свинкам в течение 10 сек, кроликам - в течение 20 сек.

За животными наблюдают не менее 7 сут. после введения препарата.

Величину ЛД50 рассчитывают по результатам наблюдений через 30 мин, 24 ч и через 7 сут. и выражают в массовых, объемных или других единицах на 1 кг массы животного.

Материал для проведения гистологического исследования забирают от животных, которым испытуемый препарат был введен внутривенно, а также методом, предлагаемым для практики, в максимально переносимой дозе (МПД), не вызывающей гибели животных. Допускается проведение гистологического исследования органов одного вида животных, оказавшегося более чувствительным к токсическому воздействию препарата, и использование одной серии препарата, ЛД50 которой была наименьшей. Взятие материала осуществляют через 24 ч, 4 сут. и 7 сут. не менее чем от 5 животных на каждый срок, а также от всех животных, павших в течение наблюдения.

Исследование хронической токсичности

Хроническая токсичность - воздействие, вызывающее патологические изменения в результате длительного поступления вещества в организм. Хронические отравления - отравления, которые развиваются после систематического и длительного воздействия пороговых доз.

Животные: мыши массой не более 20 г; крысы массой от 140 до 160 г; морские свинки массой от 250 до 350 г; кролики массой от 2,0 до 2,5 кг, животные других видов.

Формирование групп животных, получающих разные дозы испытуемого препарата и препарата сравнения, проводят методом случайной выборки (единица выборки - животное).

Препарат вводят не менее, чем 20 животным один раз в сутки в оптимальной иммунизирующей (эффективной) дозе для данного вида животного или в дозе, эквивалентной предлагаемой для человека, при пересчете на 1 кг массы или площадь поверхности тела. Если препарат в течение 1 мес. предполагается применять человеку от 1 до 3-х раз, количество однократных ежедневных инъекций должно быть не менее 10, а более 3-х - не менее 20; перерыв в курсе введения не допускается.

Наблюдение за животными проводят в течение периода введения препарата и последующих 7 сут. При этом ежедневно регистрируют массу животных, а также возможные клинические симптомы интоксикации. Не менее 5 животных забивают на следующие сутки после последнего введения препарата и не менее 5 в день окончания наблюдения, и их органы подвергают гистологическому исследованию. Гистологическому исследованию подвергают также органы всех животных, павших в течение периода наблюдения.

Исследование хронической токсичности

По окончании эксперимента по хронической токсичности животные умерщвляются и производится патолого-анатомическое исследование внутренних органов животных.

На основании полученных данных делаются выводы:

- вызывают ли вводимые пороговые дозы исследуемого вещества патологические изменения в организме при хроническом воздействии;
- выявляются потенциальные органы мишени, т. е. органы, которые наиболее подвергаются вредному влиянию исследуемого вещества, и поражение которых может служить причиной гибели животных;
- определяются возможные механизмы токсического влияния вещества (гепатотоксическое, нефротоксическое действие, угнетение кроветворения и т. д.).

Подострая (субхроническая) токсичность

- - совокупность функциональных и/или морфологических нарушений органов и систем подопытного животного после повторного введения.
- Дозы = $1/5 - 1/20$ ЛД₅₀.
- Продолжительность опыта в зависимости от продолжительности жизни животных данного вида = $1/30$ СПЖ. Продолжительность введения 2-12 недель.

Исследование субхронической токсичности

Различают хроническую и субхроническую токсичность. При исследовании хронической и субхронической токсичности экспериментальные животные подвергаются длительному (субхроническая токсичность - до 1 месяца; хроническая токсичность - до 1 года) воздействию пороговых доз исследуемого вещества - внутрижелудочно, накожно или ингаляционно (в специальных камерах; в этом случае затравка животных ведется по 4 ч в день 5 раз в неделю).

Изучаемые концентрации могут быть рассчитаны по основным физико-химическим свойствам, а еще лучше - по токсикометрическим параметрам, полученным в краткосрочных опытах. Обычно испытывается не менее 2-3 концентраций, обязательно устанавливается пороговая и недействующая. Как правило, при этом используются белые беспородные половозрелые крысы- самцы.

Сравнение ЛД₅₀ при исследовании хронической (А-
время наблюдения 14 сут) и острой (В-время
наблюдения 24 ч) токсичности индометацина

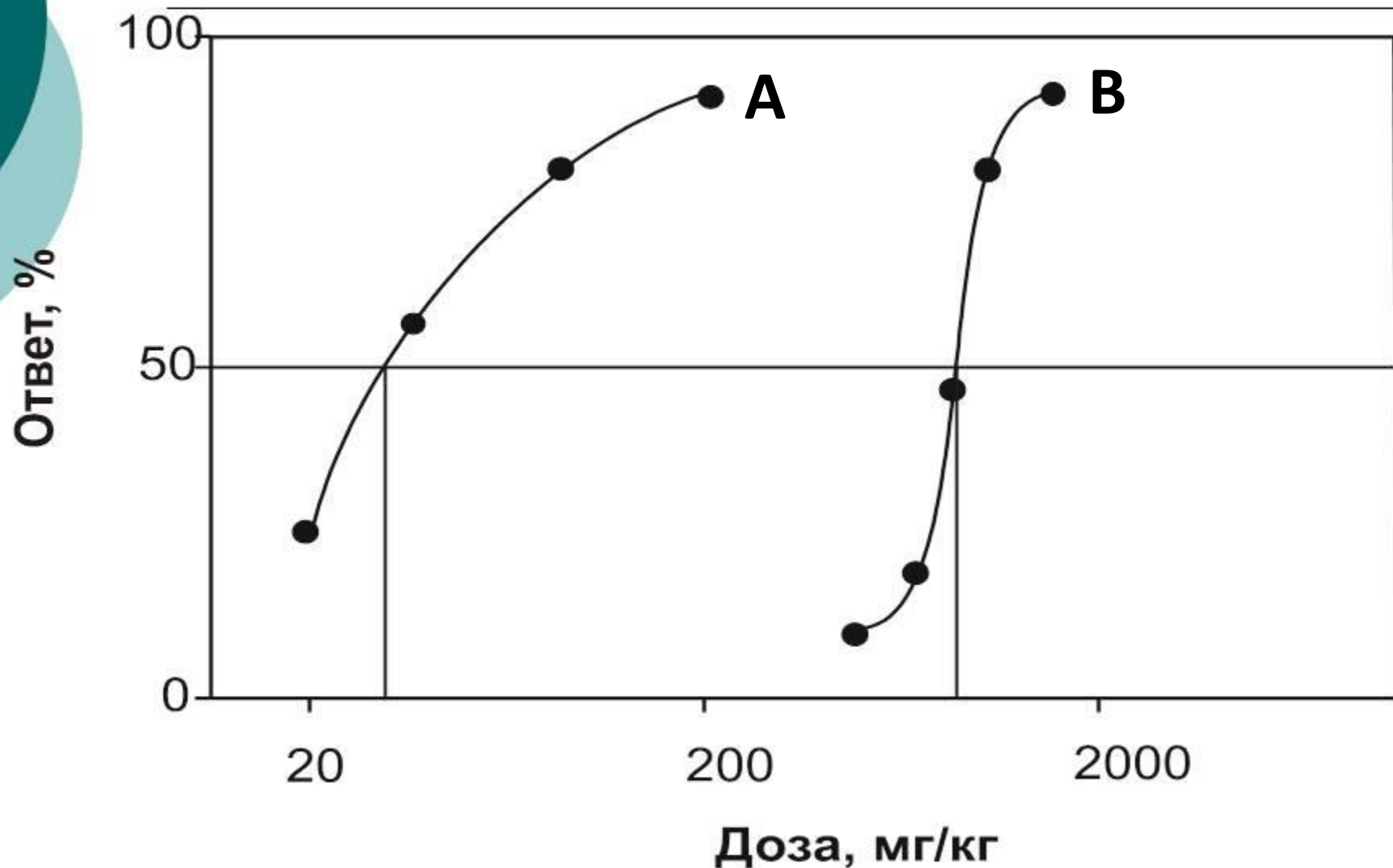


СХЕМА РЕГИСТРАЦИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ



ВИДЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

- 75 видов доклинических исследований
- 128 стандартных протоколов

ОБЩЕТОКСИКОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

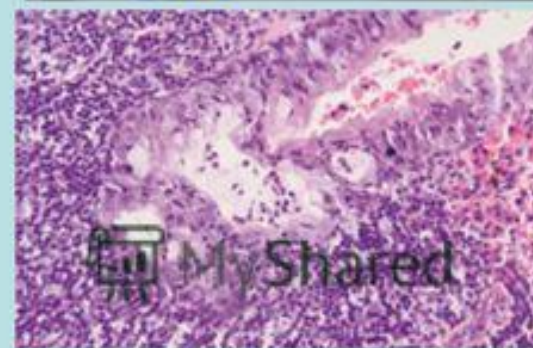
1. Оценка цитотоксического действия (MTT-тест) фармакологических веществ (ФВ)
2. Острая токсичность ФВ
3. Исследование токсичности ФВ с целью выявления пороговых доз (DRF-протокол)
4. Изучение подострой (субхронической) токсичности ФВ
5. Изучение острой токсичности ФВ для наружного применения
6. Исследование хронической накожной токсичности (21 день) ФВ для наружного применения
7. Исследование хронической токсичности на неполовозрелых особях
8. Исследование хронической токсичности (1, 3, 6 и 9 мес.), кумулятивное действие на половозрелых особях
9. Исследование хронической токсичности ФВ на кроликах с оценкой местно-раздражающего действия

ВИДЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ



R. ДЫХАТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА

1. Изучение активности ФВ на модели аллергического воспаления и гиперреактивности дыхательных путей у морских свинок
2. Исследование активности ФВ на модели острого риносинусита
3. Исследование активности ФВ на моделях химически-индуцированного плеврита
4. Исследование активности ФВ на моделях химически-индуцированного бронхита
5. Исследование активности ФВ на модели ХОБЛ, индуцированной сигаретным дымом
6. Исследование активности ФВ на модели LPS-индуцированного острого респираторного дистресс-синдрома
7. Исследование активности ФВ на моделях химически-индуцированной пневмонии
8. Исследование активности ФВ на модели экспериментального тонзиллита



ВИДЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

М. КОСТНО-МЫШЕЧНАЯ СИСТЕМА

Изучение противовоспалительных фармакологических веществ

1. Изучение противовоспалительной активности ФВ на модели хронического (адьювантный артрит) воспаления у крыс-самок линии Wistar
2. Оценка противовоспалительной активности ФВ на модели подострого воспаления: формалиновый артрит у крысы
3. Оценка противовоспалительной активности ФВ на модели воспаления: каррагениновый воздушный мешочек у крыс
4. Оценка противовоспалительной активности ФВ на модели воспаления: Каррагенин-индуцированный отек лапы крысы
5. Оценка влияния ФВ на энзиматическую активность циклооксигеназы-1/-2
6. Оценка влияния ФВ на энзиматическую активность 5-липооксигеназы
7. Оценка влияния ФВ на продукцию про- и противовоспалительных цитокинов (ИЛ-1, ИЛ-6, ИЛ-8, ФНО- α , ИЛ-10) в культуре клеток и у крыс
8. Оценка влияния ФВ на внутриклеточный сигналинг (активацию MAP-киназ p38, JNK1/2, ERK1/2) в культуре клеток
9. Оценка влияния ФВ на активацию транскрипционных факторов (NF- κ B и др.) в культуре клеток

Оценка активности ФВ на модели экспериментального остеопороза у самок крыс линии Wistar



ВИДЫ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Репродуктивная токсичность

1. Исследование влияния на генеративную функцию ФВ
2. Исследование эмбрио- и фетотоксического влияния ФВ, регистрируемого в антенатальный период, с оценкой тератогенного действия
3. Исследование антенатального повреждающего действия ФВ, регистрируемого в постнатальный период



Доклинические исследования токсичности лекарственных средств

Таблица 1 - Токсичность триазавирина при однократном введении белым крысам

Способ введения	LD50 (мг/кг)	LD100 (мг/кг)
Внутрибрюшинно	1320 (950 - 1840)	2520
Перорально	>9000	не установлена

Таблица 2 - Токсичность триазавирина при однократном введении белым мышам

Способ введения	Параметры кривой дозы – эффект (мг/кг)					
	ЛД01	ЛД05	ЛД16	ЛД50 и доверительные интервалы (P=0,05)	ЛД84	ЛД100
Внутрибрюшинно	860	1050	1270	1690 (1500 – 1920)	2250	2660
Перорально	2940	3900	5120	7710 (6710 – 8930)	11710	13000

Таблица 3 -Степени токсичности (по Hodge и Sterner)

Степень токсичности	Термин	ЛД ₅₀ , однократно per os, крысы (мг/кг)	ЛД ₅₀ , однократно i/v*(в/б), крысы (мг/кг)
1	Чрезвычайно токсично	<1	<0,1
2	Высокотоксично	1-50	0.1-50
3	Умеренно токсично	50-500	5-50
4	Малотоксично	500-5000	50-500
5	Практически нетоксично	5000-15000	500-1500
6	Относительно безвредно	>15000	>1500

Сравнение острой и хронической токсичности
рубоксила и других антрациклиновых антибиотиков

Препарат	ЛД ₅₀ , мг/кг			
	острая		хроническая	
	в/б	в/в	в/б	в/в
Рубоксил	49	90	9,6	51
Адриамицин	9,6	10-13		
Рубомицин	5,5	26	0,74	8,3
Аклациномицин	24	35,6		
Рубидазон	20	4,4		

Таблица 5

Острая токсичность и пирогенность лекарственных субстанций ФС *in vivo*.

ФС	Острая токсичность		Пирогенность, для дозы 1,75 мг/кг
	LD ₁₀ мг/кг	LD ₅₀ мг/кг	
«Радахлорин»	119	147	Апирогенен
«Фотохлорин II»	92	153	Апирогенен

Таблица 2 Средне-смертельные дозы ядов для некоторых домашних животных

Действующее вещество	Средне-смертельные дозы (мг/кг)							Источник (NN)
	крыса	мышь	кролик	собака	кошка	свинья	домашн. птицы	
Дифенацин	1,4-3,3	-	35	5-15	5-15	-	-	2, 13, 14, 15
Зоокумарин	14-200	-	800	20-50	5-50	1-5	1000	2, 5, 9, 13, 23, 26, 35, 40
Этилфенацин	3-7	250	-	-	-	>250	>250	20
Фосфид цинка	25-150	60-80	-	20-60	20-60	60-80	20-60	12, 19, 23, 35

**Доклинические исследования
токсичности лекарственных средств
по данным клеточного теста**

Оценка токсичности с помощью клеточного теста

Культура лимфоидных клеток человека линии Raji является пролиферирующей. В процессе митотического цикла проявляется активность всех типов ферментов, присущих этим клеткам. Если испытываемый материал содержит агент, который нарушает работу хотя бы одного фермента, то это должно отразиться на размножении клеток и будет выявлено при их подсчете, что позволяет математически выразить степень токсичности материалов.

Источником клеток Raji является человек. Следует отметить, что этот тип клеток относится к клеткам крови, которая первой из тканей вступает в контакт с лекарством и испытывает на себе наиболее высокие концентрации содержащихся в ней компонентов.

Рост клеток Raji не требует создания условий для их адгезии и распластывания на подложке, поскольку они относятся к так называемым «контактнoзависимым клеткам».

Оценки токсичности перфторуглеродной эмульсии типа Перфторана и его компонентов по данным клеточного теста

Вид испытуемого материала	Количество образцов	Процент прироста клеток Raji
Контроль (стекло)	10	100 ± 7
ПФД (очищенный)	20	105 ± 8
ПФМЦП (очищенный)	35	102 ± 7
Проксанол -268 (очищ.)	20	95 ± 7
препарат Перфторан	20	95 ± 8

Вывод: токсичность Перфторана зависит в большей степени от токсичности ПАВ, чем ПФОС

Зависимость токсичности перфторуглеродной эмульсии типа Перфторан от входящих в неё компонентов

Партия эмульсии	Клеточный тест процент прироста клеток Raji		
	ПФОС	ПАВ	эмульсии на данных компонентах
эмульсия А	100 ± 7	23 ± 4	20 ± 5
эмульсия Б	100 ± 7	87 ± 7	90 ± 8

Вывод: токсичность эмульсии зависит в большей степени от токсичности ПАВ, чем ПФОС

Зависимость токсичности перфторуглеродной эмульсии типа Перфторан от входящих в неё компонентов (перфторсоединений)

Исследуемые соединения	Содержание примесей (вес. %)	Процент прироста клеток Raji в среде с ПФОС
1. Контроль (рост на стекле)	-	$100 \pm 7 \%$
2. ПФД технический	0,026 %	$75 \pm 6 \%$
3. ПФД очищенный	0,0026 %	$105 \pm 8 \%$
4. ПФМЦП очищенный	нет данных	$102 \pm 7 \%$
5. ПФОБ очищенный	нет данных	$85 \pm 5 \%$

Вывод: очистка ПФОС снижает токсичность, зависящая от содержание недофторированных примесей

Зависимость токсичности эмульгатора - ПАВ от степени очистки и концентрации

Исследуемые эмульгаторы ПАВ	Клеточный тест процент прироста клеток Raji	
	Технический ПАВ	Очищенный ПАВ
0,1%	62,0	100
0,5%	10,0	91
1,0%	1,3	80
1,5%	1,0	75

Вывод: токсичность эмульгатора - ПАВ зависит от степени очистки и концентрации ПАВ

Зависимость токсичности перфторуглеродной эмульсии типа Перфторан от концентрации ионов фтора в эмульсии

Концентрация F ⁻ (г-ион/л)	Рост клеток Raji в среде	Время перфузии сердца на эмульсии ПФОС с разным F ⁻
Контроль	100 ± 8*	5,7 ± 0,2** час
5 · 10 ⁻³	нет роста	5 - 10 мин. (мин)
2,5 · 10 ⁻³	12 ± 4	45 - 60 мин.
5 · 10 ⁻⁴	60 ± 7	3-4 час
2,5-5,0 · 10 ⁻⁵	100 ± 8	10-11 час (макс)

где *) культивирование на контрольной среде без ионов фтора;

**) перфузия на контрольном растворе Кребса-Гензелейта.

Изучение токсичности компонентов американской перфторуглеродной эмульсии II поколения Оксигент AF0104

СОСТАВЫ	Концентрация среда/состав	Прирост клеток в среде с исследуемым составом (%)
Контроль (рост клеток на стекле)	-	100 ± 7
эмульсия Перфторан (Россия)	10/1	50 - 95
эмульсия Оксигент AF0104 (США)	10/1	полное подавление роста клеток
ПФОБ (США) до очистки	-	16
ПФОБ (США) после очистки	-	44

Вывод: токсичность эмульсии Оксигент зависит в большей степени от токсичности ПФОБ, чем ПАВ. Очистка ПФОБ уменьшает токсичность эмульсии Оксигент.

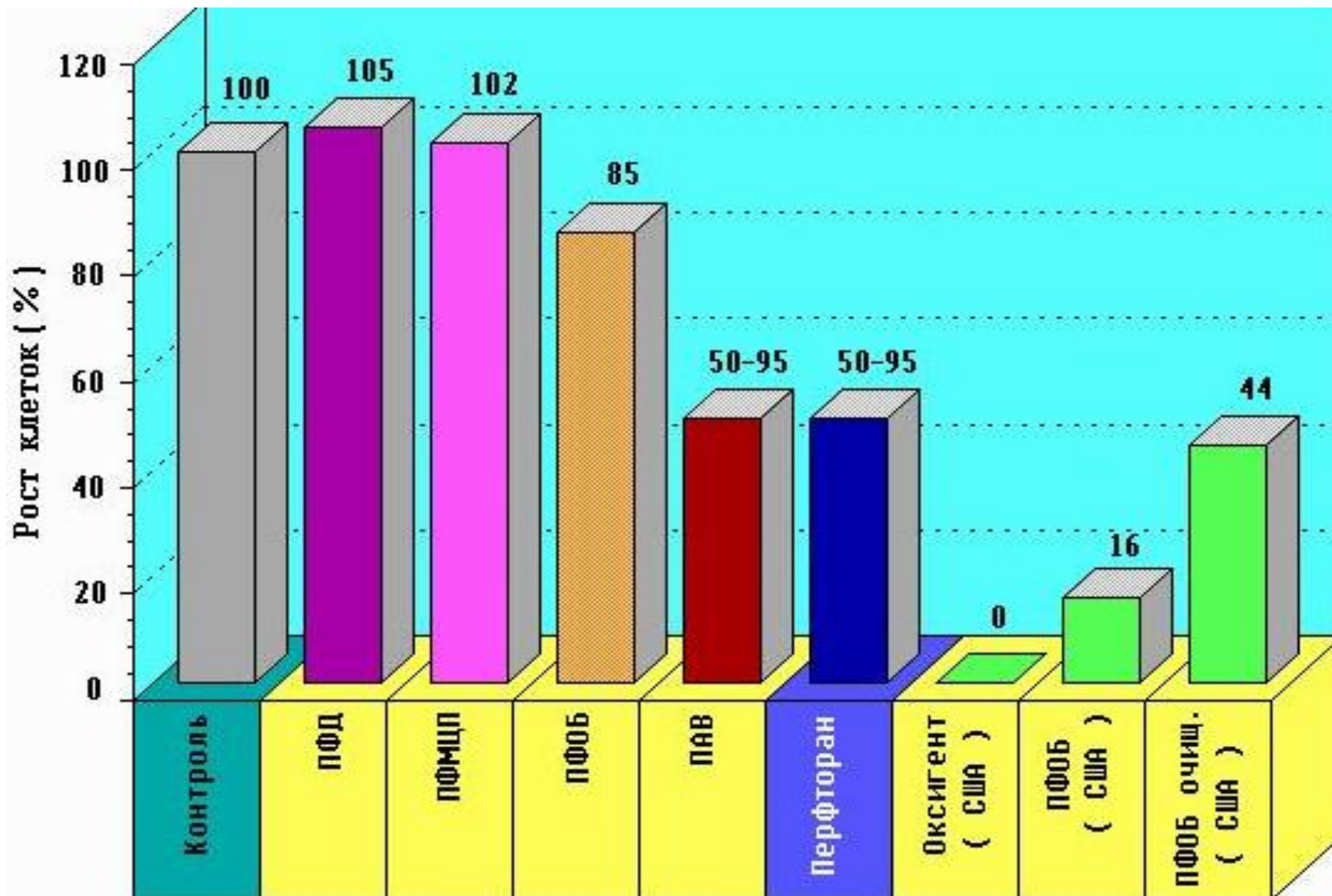
**Доклинические исследования
токсичности лекарственных средств
от химического состава входящих
компонентов**

Зависимость токсичности перфторуглеродной эмульсии типа Перфторан от молекулярной массы применяемых эмульгаторов - ПАВ

Эмульгатор-ПАВ	Молекулярная масса (Д)	Содержание реакционных групп (М/М)	Содержание ПОПР (гидрофобного) блока (%)	Токсичность ЛД ₅₀ мыши (г/кг)
П-168 №38	5700	0,24	19,0	24,0
П-268 №35	7200	0,48	19,5	15,0
П-268 №1	8000	0,20	19,0	14,2
Плюроник-F-68 "Serva"	8300	0,20	21,0	9,4

Вывод: чем выше молекулярная масса ПАВ, тем больше его гидрофобный блок ПОПР, тем более ПАВ токсичен

Изучение токсичности и эффективности компонентов американского и российского перфтор-препаратов



**Доклинические исследования
токсичности лекарственных
средств от размера частиц
активного вещества**

Корреляция острой токсичности и максимального диаметра частиц японской перфторуглеродной эмульсии Флюозол-43 [Mitsuno T. 1981]

Образцы эмульсий	Количество частиц диаметром более 0,4 мкм (%)	Доза острой ЛД50 токсичности (г/кг)
1	<u>25</u>	<u>11,5</u> высокая
2	10	12,3
3	3	27,0
4	0	28,1
5	0	<u>30,3</u> низкая

Имеется корреляция между размером частиц и токсичностью эмульсий, обнаружено, что острая токсичность возрастает с увеличением количества частиц размером 0,4 мкм, при том что размер эритроцита больше частицы в 20 раз.

Зависимость токсичности перфторуглеродной эмульсии типа Перфторан от среднего размера частиц эмульсии

Средний размер частиц	Амплитуда сердечных сокращений изолированного сердца кролика (%)			
	исход	1 час	3 час	5 час
150 – 200 нм	100	72	40	26
<u>70 – 100 нм</u>	100	116	118	<u>108</u>
30 – 50 нм	100	93	78	68

Вывод: токсичность перфторуглеродной эмульсии зависит от среднего размера частиц

ФАРМАКОКИНЕТИКА (выведение) на примере перфторуглеродного кровезаменителя Перфторан

Период полувыведения перфторуглеродного кровезаменителя Перфторан из кровеносного русла человека составляет 22-24 часа.

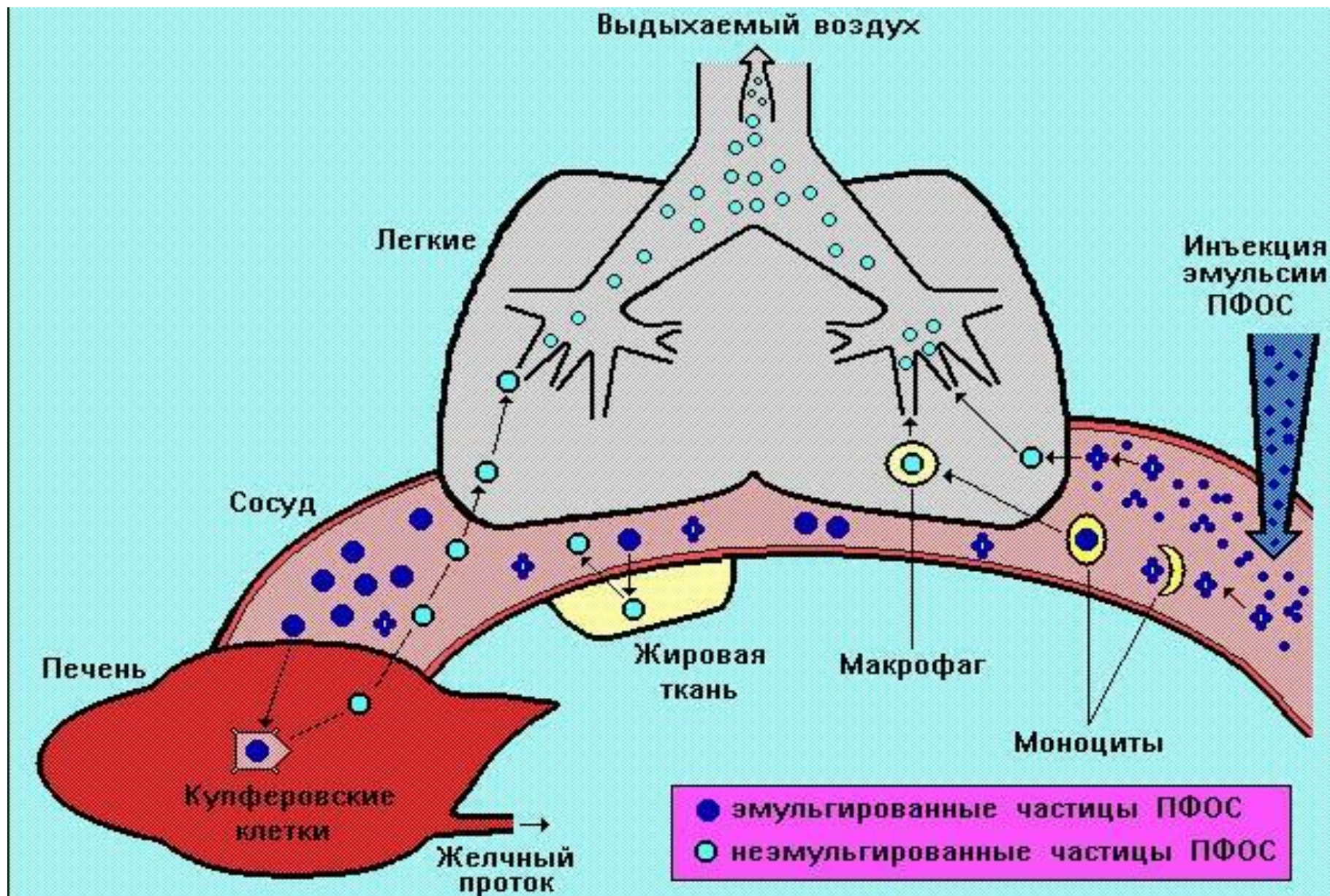
Эмульгатор перфторорганических соединений (ПФОС) – проксанол-268 выводится с мочой в течение 1-2 суток.

Перфторорганические соединения (перфторуглероды) выводятся через легкие и кожу, в меньшей степени – с желчью.

Частицы эмульсии перфторуглеродов временно аккумулируются в макрофагах печени, селезенки, костного мозга.

Период полувыведения перфторуглеродов после замещения у крыс 65 % ОЦК препаратом Перфторан составляет: для перфтордекалина 14 дней (полное выведение 1 месяц), для перфторметилциклогексилпиперидина 90 дней (полное выведение 18-24 месяца).

Схема ВЫВЕДЕНИЯ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНЫХ КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ



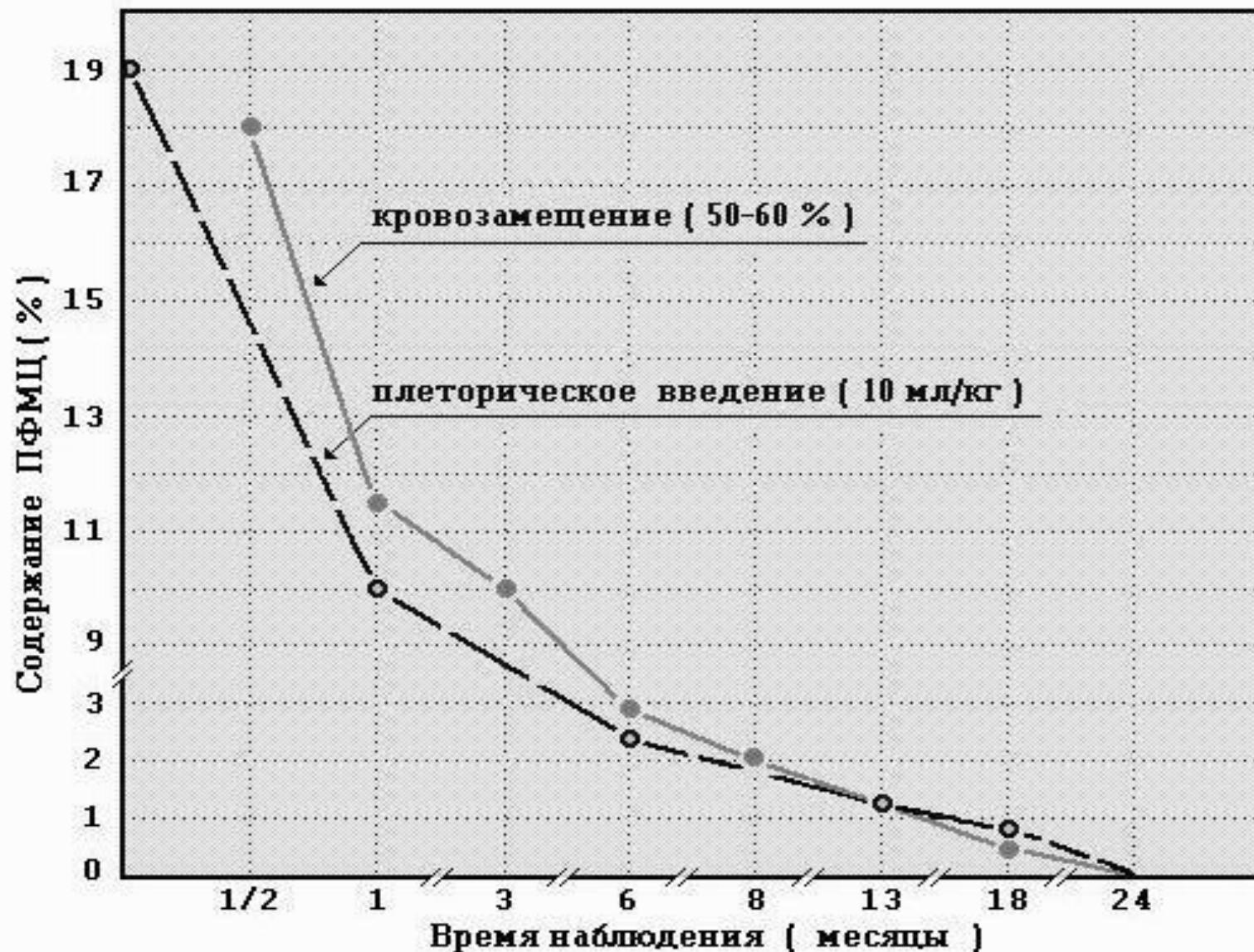
ВЫВЕДЕНИЕ ИЗ ОРГАНИЗМА ПЕРФТОРУГЛЕРОДНЫХ КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ типа Перфторан (ПФД/ПФМЦП)

Содержание ПФМЦП в органах крысы после 50 - 60% кровезамещения Перфторан

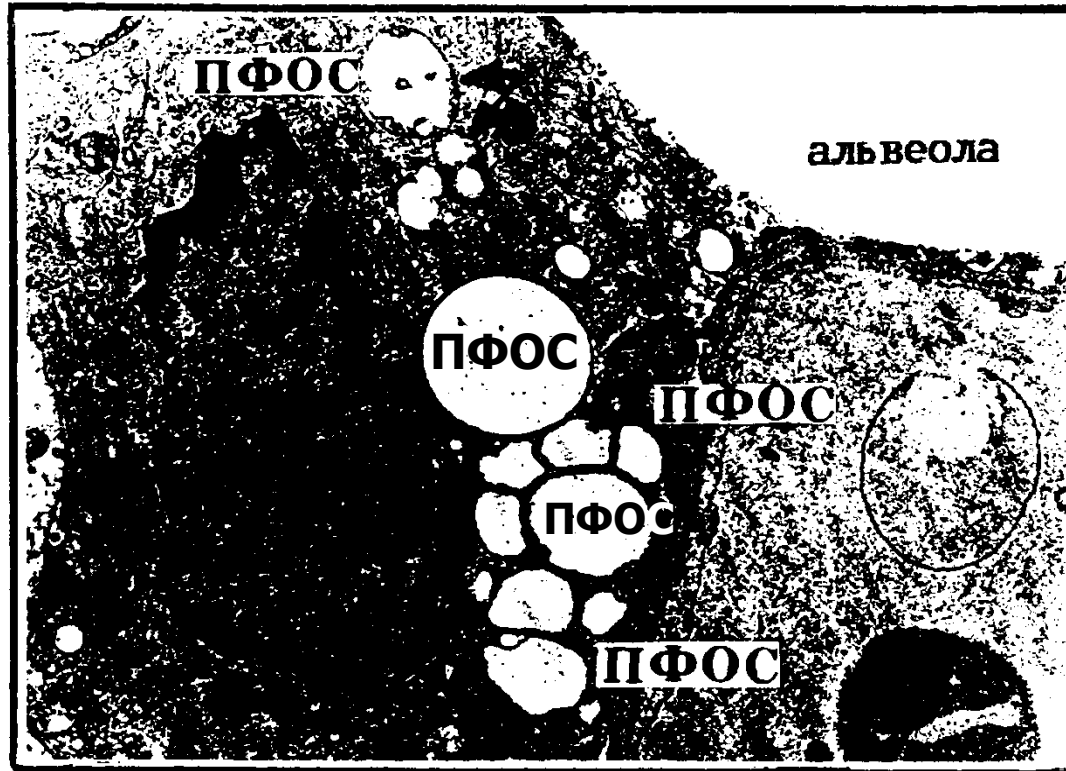
Органы	Содержание ПФМЦП мг/г в органах					
	14 дни	1 мес.	6 мес.	13 мес.	18 мес.	24 мес.
Печень	6,7	3,42	1,22	0,14	след.*	нет
Селезенка	1,4	6,40	3,90	0,14	след.	нет
Костный мозг	9,8	след.	след.	нет	нет	нет
Лимфоузлы	нет	0,48	след.	нет	нет	Нет

ВЫВЕДЕНИЕ ПЕРФТОРУГЛЕРОДНОГО КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЯ

Перфторан из органов крысы после кровезамещения (50-60%) и плеторического введения (10 мл/кг)



Выведение перфторсоединений (ПФОС) происходит через лёгкие, на фото видны участки с крупным скоплением ПФОС у границы с альвеолой. Интенсивный фагоцитоз частиц эмульсии ПФОС, как чужеродных частиц, осуществляется клетками ретикуло-эндотелиальной системы легких, преимущественно альвеолярными макрофагами. Захват частиц ПФОС фагоцитами приводит к образованию многочисленных фагосом, которые в дальнейшем перемещаются в апикальную часть альвеолярных макрофагов, граничащую с альвеолярными просветами, с последующим выбросом в них фагосом путем экзоцитоза.



Весь процесс выведения ПФОС из организма связан с гранулематозной реакцией. Процесс гранулематоза, способствующий выведению ПФОС, в дальнейшем не приводит к формированию в органах склероза или гиалиноза.

**Доклинические исследования,
на примере, перфторуглеродных
кровезаменителей**

Выдержки из заключения по изучению канцерогенности

Опыты проведены на белых беспородных мышах и крысах обоего пола. В эксперименте использовано 680 крыс (7 групп) и 890 мышей (9 групп). Наблюдения за животными составили для крыс в среднем 150 недель, для мышей - 132 недели. Использовано три пути введения препарата - подкожный, внутрибрюшинный и внутривенный (включая и кровезамещение).

Оценка возможной канцерогенности кровезаменителя Перфторан проводилась с учетом следующих параметров: эффективное число, латентный период и частота развития опухолей, вероятность возникновения опухолей, мультицентричность опухолевого роста (коэффициент множественности).

Сопоставление контрольных и опытных групп мышей, находившихся в эксперименте, не выявило достоверных различий в частоте опухолей между указанными группами. Отсутствие достоверных различий по исследованным показателям между контрольными и опытными группами крыс и мышей, дает основание для заключения об отсутствии канцерогенного действия Перфторана.

Выдержки из заключения по изучению эмбриотоксичности

Проведенные исследования показали, что перфторуглеродный кровезаменитель Перфторан при определенных условиях введения (ежедневное введение в дозе 25 мл/кг в течение 5-10 дней, т.е. общая доза составляет 125-250 мл/кг) оказывает эмбриотоксическое действие на нелинейных крыс.

Эмбриотоксический эффект Перфторана при его однократном введении будет проявляться в большей дозе, чем максимальная терапевтическая (25 мл/кг), испытанная в настоящих исследованиях.

Однако, можно полагать, что величина дозы, которая будет оказывать тератогенный эффект при однократном введении, вряд ли будет более, чем в 5-6 раз превышать дозу 25 мл/кг (т.е. общая доза однократного введения, составляющая тератогенный эффект, будет составлять 125-150 мл/кг).

Применение Перфторана во время беременности может быть допустимо только по витальным показаниям со стороны матери, и врач обязан учитывать, что существует риск нарушения развития плода.

Количество побочных реакций у пациентов на введение различных перфторуглеродных кровезаменителей

Японский «Fluosol -DA 20%» реакции >> 30% Снят с испытаний в 1994 г.	Американский «Oxygent» AF0104 реакции ~ 30% Остановлены испытания III фазы
Российский «Перфторан» реакции ~ 15-20% Применяется клинически с 1996 г.	Российская «Фторэмульсия III» реакции ~ <u>6 -10%</u> Прошёл I фазу клин.-х испытаний

**Федеральный закон РФ
от 12 апреля 2010 г. N 61-ФЗ
"Об обращении лекарственных средств"**

Статья 11

**Доклиническое исследование лекарственного
средства для медицинского применения**

**2. Доклиническое исследование лекарственного
средства для медицинского применения проводится
в соответствии с правилами лабораторной практики,
утвержденными уполномоченным федеральным
органом исполнительной власти**

Содержание животных

Акклиматизация и отбор животных для исследования

Карантинные мероприятия:

- входной контроль лабораторных животных при получении из питомников (клинический осмотр, экспресс-диагностика антропозоонозов);
- изоляция поступивших партий животных для прохождения карантина согласно ветеринарным требованиям;
- кормовая, физиологическая и психологическая адаптация лабораторных животных находящихся в карантине.



Shared

Экспериментальные условия работы с животными



- на каждое животное ветеринарный врач ведет карты клинического осмотра;
- идентификация лабораторных животных осуществляется нанесением маркера (для мышей и крыс) или при помощи микрочипирования (морские свинки, кролики);
- рандомизация лабораторных животных происходит методом модифицированной блочной рандомизации, для независимого распределения животных в экспериментальные группы
- для каждого исследования организуется заседание биоэтической комиссии с привлечением независимых экспертов;
- сохранение конфиденциальности проводимых экспериментов обеспечивается путем использования внутренней кодировки.



ФАРМАКОКИНЕТИКА



Вторичный фармакологический эффект

- 
- Доклинические и клинические исследования эффективности и безопасности лекарственных средств (ЛС) являются важнейшими этапами их разработки.
 - В 60-годы в Великобритании было официально признано, что ни один фармакологически эффективный препарат не может быть совершенно лишен риска и что не все риски могут быть распознаны до выхода препарата на рынок.
 - В России государственный контроль эффективности и безопасности ЛС осуществляется в рамках процедур предрегистрационной экспертизы и пострегистрационной экспертизы.

Приказ Минздравсоцразвития от 23-го августа 2010 года №708н «Об утверждении Правил лабораторной практики»

Пункт 6. Доклинические исследования проводятся по утвержденному плану с ведением **протокола**

В **протоколе** фиксируются действия, связанные с выполнением процедур, осуществляемые в соответствии с утвержденным планом

Пункт 13. Ответственный исполнитель организует и контролирует:

а) проведение исследования в соответствии с утвержденным планом

б) выбор соисполнителей в соответствии с протоколом доклинического исследования

в) оформление протокола доклинического исследования, изменений к нему

1-й раздел Руководства:

**Правила доклинических исследований
безопасности эффективности
фармакологических веществ
(Правила качественной лабораторной
практики в РФ - GLP или ПДИ)**

Составители - Т.А.Гуськова, Б.И.Любимов,
Е.В.Арзамасцев и др.

Подготовлены с учетом требований:

ГОСТ Р 51000.3-96 "Общие требования к
испытательным лабораториям",
ГОСТ Р 51000.4-96 «Общие требования к
аккредитации испытательных лабораторий»,
и соответствуют Правилам GLP.

НЕКЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ (доклинические, экспериментальные)

**Фармакологические и токсикологические
испытания биологически активных веществ на
моделях *in vitro* и *in vivo***

- цель фармакологических исследований – определение терапевтической эффективности исследуемого продукта (будущего ЛВ), его влияния на основные системы организма, установление возможных побочных эффектов, связанных с фармакологической активностью
- при токсикологических исследованиях устанавливается характер и выраженность возможного повреждающего воздействия на организм экспериментальных животных



Как проверяется эффективность и безопасность новых препаратов

Доклинический этап



In vitro

Изучение нового препарата в лаборатории

In vivo



I фаза

II фаза

III фаза

IV фаза

Научное исследование с участием людей проводится для оценки эффективности и безопасности лекарственного препарата. Заказчик исследования — как правило, фармацевтическая компания. Исследователи — врачи. Участники исследования — здоровые добровольцы, пациенты. Место проведения исследования — клиника.

In vitro / В пробирках

Изучение фармакологических свойств лекарства.

I фаза / 20 — 80 человек

Оценивается безопасность лекарственного препарата, определяются распространенные побочные эффекты, характер усвоения и выведения препарата из организма. Обычно в исследованиях принимают участие здоровые добровольцы.

III фаза / 1000 человек*

Эффективность препарата при определенном заболевании проверяют на большей популяции, чтобы выявить редко возникающие побочные эффекты, получить больше информации о безопасности лекарства. Изучаются различные дозировки препарата, а также взаимодействие с другими лекарственными средствами.

* Среднее число пациентов. Обычно в ней участвует от нескольких сотен до 3000 человек.

In vivo / Испытания на лабораторных животных

Проверка препарата на токсичность и оценка возможности дальнейших исследований с участием людей.

II фаза / 100 — 300 человек

Оценивается эффективность лекарства. Одна группа пациентов с определенным заболеванием получает исследуемый препарат, вторая — плацебо (препарат-пустышка) или другое лекарственное средство. Результаты лечения сравниваются, продолжается изучение безопасности лекарства.

IV фаза / Постмаркетинговые исследования

Сбор и изучение информации о безопасности, эффективности и оптимальном применении препарата после того, как лекарство было одобрено уполномоченным органом и попало на прилавки аптек. В России государственная регистрация новых препаратов находится в ведении Министерства здравоохранения РФ, а контроль качества зарегистрированных лекарств осуществляет Росздравнадзор.

Какие бывают виды клинических исследований?



Сравнительные исследования

Новый, экспериментальный препарат сравнивается с уже существующими, стандартными способами лечения.



Слепые исследования

Считается, что наиболее достоверные результаты можно получить, если ни врач, ни пациенты не знают, какой препарат (новый или стандартный) принимает группа.



Открытые исследования

В этом случае и врач, и пациенты знают, какой препарат назначен.



Плацебо-контролируемые исследования

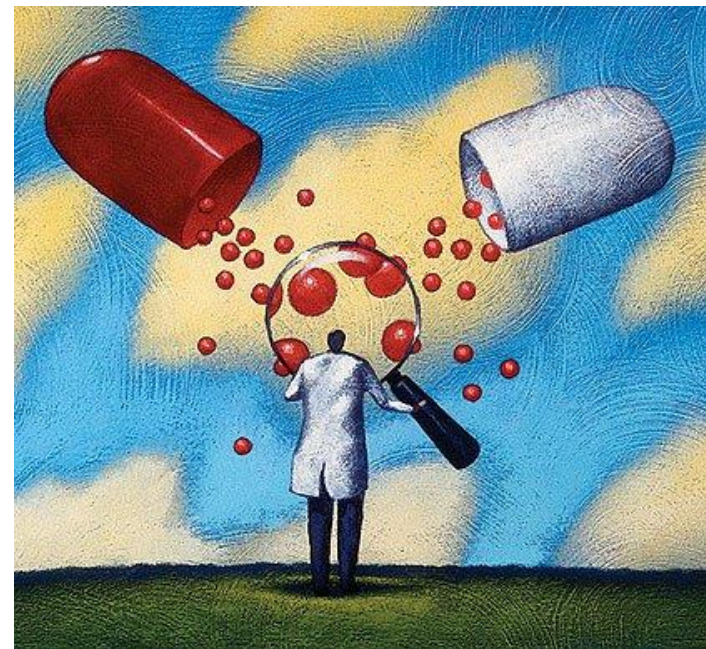
Чтобы исключить влияние субъективных факторов на результат лечения при исследовании нового лекарства, его действие могут оценивать в сравнении с плацебо.



Рандомизация

Метод случайного отбора для распределения участников исследования по группам лечения. Компьютерная программа определяет, кто из пациентов будет получать исследуемое лекарство, а кто — стандартный препарат или плацебо.

Доклинические исследования



ЛЕКАРСТВА ДЛЯ ЖИЗНИ
www.ldzh.ru

Источники информации для этого материала:

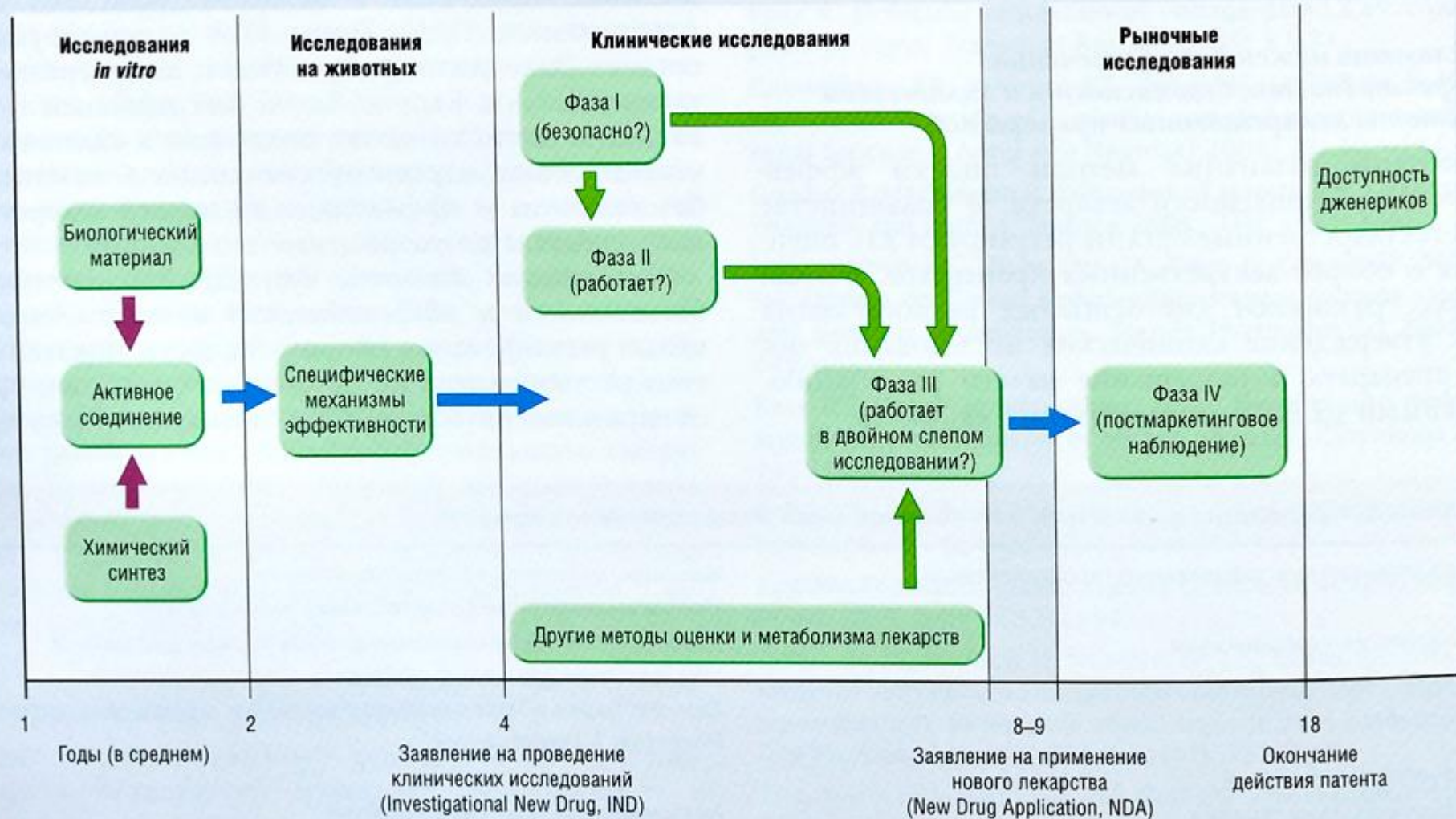
www.fda.gov

/ U.S. Food and Drug Administration

www.acto-russia.org

/ Ассоциация организаций по клиническим исследованиям

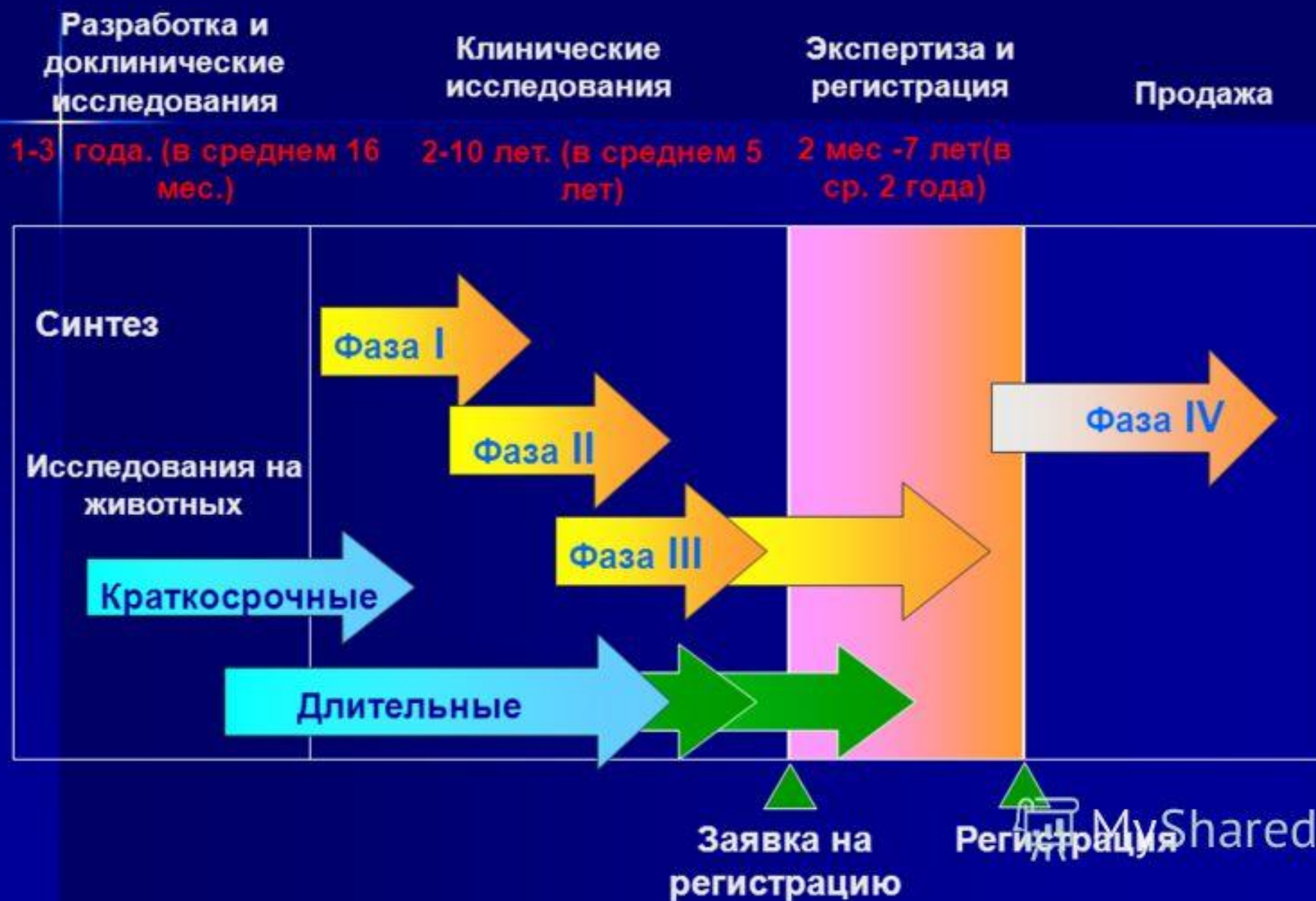
Этапы внедрения лекарственного средства



Этапы разработки нового лекарственного средства

Этап	Содержание и актуальность этапа	
	Оригинального ЛС	Генерического ЛС
1. Разработка нового препарата	Генерация научных идей и их обоснование	Не проводится
2. Создание нового препарата	Направленный синтез или скрининг биологично-активных веществ или модификация известных молекул и субстанций	Не проводится
3. Доклиническое изучение нового препарата	Разработка технологии и методов контроля, обоснование состава ЛС, виды лекарственной формы, технологии производства, торговой марки, упаковки	Разработка технологии и методов контроля; Биофармацевтические упрощенные доклинические исследования
4. Клиническое изучение нового препарата	Проведение экспертизы материалов и образцов препарата, определение эффективности и безвредности	Ограниченные клинические исследования или доказательство биоэквивалентности ЛС
5. Развертывание коммерческого производства	Коммерческое производство, маркетинг и сбыт: • определение потребности; • формирование спроса; • стимулирование сбыта	Коммерческое производство, маркетинг и сбыт • определение потребности; • формирование спроса; • стимулирование сбыта

Внедрение нового лекарственного средства



Основные этапы создания лекарственных препаратов:

- Создание биологически активной субстанции (экстракт из растений или животных тканей, биотехнологический или химический синтез, использование природных минералов)
- Фармакологические исследования (фармакодинамические, фармакокинетические и токсикологические исследования)
- Экспертиза документов о доклинических исследованиях в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения»)
- Клинические испытания (1-4 фазы)
- Экспертиза документов о клинических испытаниях в Федеральной службе по надзору в сфере здравоохранения и социального развития (ФГУ «Научный центр экспертизы средств медицинского применения») Приказ МЗ и РФ и внесение в государственный реестр лекарственных средств
- Внедрение в медицинскую практику (организация производства и использование в лечебных учреждениях)

Жизненный цикл лекарственного препарата



Токсичность

- (от греч. toxikon-яд), способность вещества вызывать нарушения физиологических функций организма, в результате чего возникают симптомы интоксикаций (заболевания), а при тяжелых поражениях гибель.

Тест-параметры токсичности

За критерий токсичности принимается достоверное количественное изменение тест-параметра, на основании которого делается вывод о токсичности вещества, воды или почвы.

Среди тест-параметров наиболее часто используются смертность, выживаемость, плодовитость, подавление ферментативной активности и другие функции тест-организмов.

Тест-реакция – это изменение какого-либо морфологического, биохимического, поведенческого или функционального показателя у тест-объекта под воздействием токсических веществ, содержащихся в исследуемой среде.

Степень токсичности вещества

- характеризуется величиной токсической **дозы** - количеством вещества, отнесенным к единице массы животного или человека, вызывающим определенный токсический эффект.
- Чем меньше токсическая доза, тем выше токсичность вещества.

2. Понятие о токсических и летальных дозах

Понятие токсичности (ядовитости) означает меру несовместимости вещества с жизнью и определяется величиной, обратной DL_{50} (CL_{50}), т.е. . в естественных условиях возможность возникновения отравления зависит не только от токсичности, но и от других факторов, объединенных термином «опасность ядовитого (отравляющего) вещества». К ним относятся зона острого токсического действия вещества, летучесть и стойкость химического вещества, его водо-и жирорастворимость.

Разделяют острую и хроническую токсичность веществ, определяя, таким образом, их действие на организм и опасность для человека.

В защите растений в основном используются пестициды, обладающие острой токсичностью, которая обеспечивает быстрый эффект в отношении вредных организмов. В специальных случаях, когда применение больших количеств пестицидов представляет опасность для полезных организмов и человека, используют их хроническую токсичность, вводя в состав приманок малые доли отравляющих веществ и обновляя эти приманки каждый день в течение недели (например, применение антикоагулянтов крови – родентицидов).

Основные характеристики оригинального ЛС

- Длительность разработки (10-15 лет) на основании отбора действующего вещества из значительного количества молекул
- Фармакологический эффект
- Токсичность
- Мутагенность
- Тератогенность

Проверены в доклинических исследованиях на животных;

прохождение всех фаз клинических исследований в соответствии со стандартами GCP

Лекарственные средства (ЛС) -

вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий.

- К лекарственным средствам относятся: фармацевтические субстанции и лекарственные препараты;

- *Лекарственные препараты (ЛП)* - лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности

- *Зарегистрировано в России более 18000 ЛП*

- ❑ Неорганические ЛС - химиопрепараты
- ❑ Органические ЛС – биологические препараты



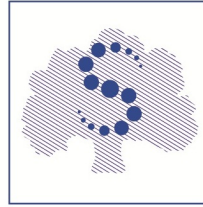
MyShared

Фрагмент папируса Эберса
с 877 рецептами лекарств

Что мы ожидаем от лекарства ?

- Безопасность (не навреди!)
 - Эффективность
 - Предсказуемость побочных эффектов
 - Удобство в применении
 - Доступность
 - Пациент должен быть доволен, а доктор спокоен!
- Уверенность в лекарственном средстве в любой клинической ситуации!

Что такое биологическое ЛС, что такое биоаналог, что можно ожидать от нового препарата?



СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ

Кафедра организации и технологии иммунобиологических препаратов
Институт трансляционной медицины и биотехнологии

Основы работы с лабораторными животными

Лекция 2

Илья Гордейчук, к.м.н.

Москва, 2020

Темы лекций

1	Основы этичного обращения с лабораторными животными. Принципы 3R. Нормативные акты, регламентирующие работу с лабораторными животными
2	Биология лабораторных животных. Влияние свойств модели на результаты эксперимента. Стресс и адаптация
3	Принципы содержания лабораторных животных в условиях научного эксперимента. Особенности содержания различных видов лабораторных животных
4	Дизайн эксперимента. Статистические методики оценки необходимого и достаточного количества животных, используемых в научном эксперименте
5	Экспериментальные манипуляции с лабораторными животными. Подготовка животного к эксперименту. Анестезия и аналгезия при использовании лабораторных животных. Хирургические вмешательства
6	Документальное сопровождение работ с лабораторными животными. Этический комитет. Классификация манипуляций, производимых с лабораторными животными. Принцип гуманного завершения эксперимента

Структура Лекции №2

1	Этология — дисциплина, изучающая поведение животных
2	Стресс как фактор снижения достоверности научных исследований
3	Контроль как способ снижения уровня стресса
4	Факторы, определяющие оптимальные условия содержания лабораторных животных
5	Биологические особенности наиболее часто используемых лабораторных животных

Этология

полевая дисциплина зоологии, изучающая генетически обусловленное поведение (инстинкты) животных, в том числе людей

Каскады поведенческих реакций у животных в естественной среде обитания



**Какому из ЭТИХ ЖИВОТНЫХ
выгодно скрывать боль?**



Семь основных моделей поведения, наблюдаемых у животных в естественной среде

1. Поиск (поиск пищи, исследование окружения)
2. Игра (игровое взаимодействие с окружением)
3. Страсть (сексуальное поведение)
4. Забота (забота о потомстве, других членах группы)
5. Тоска (отделение от группы,)
6. Страх (бегство)
7. Ярость (атака)

Стимулы, с которыми сталкиваются лабораторные животные

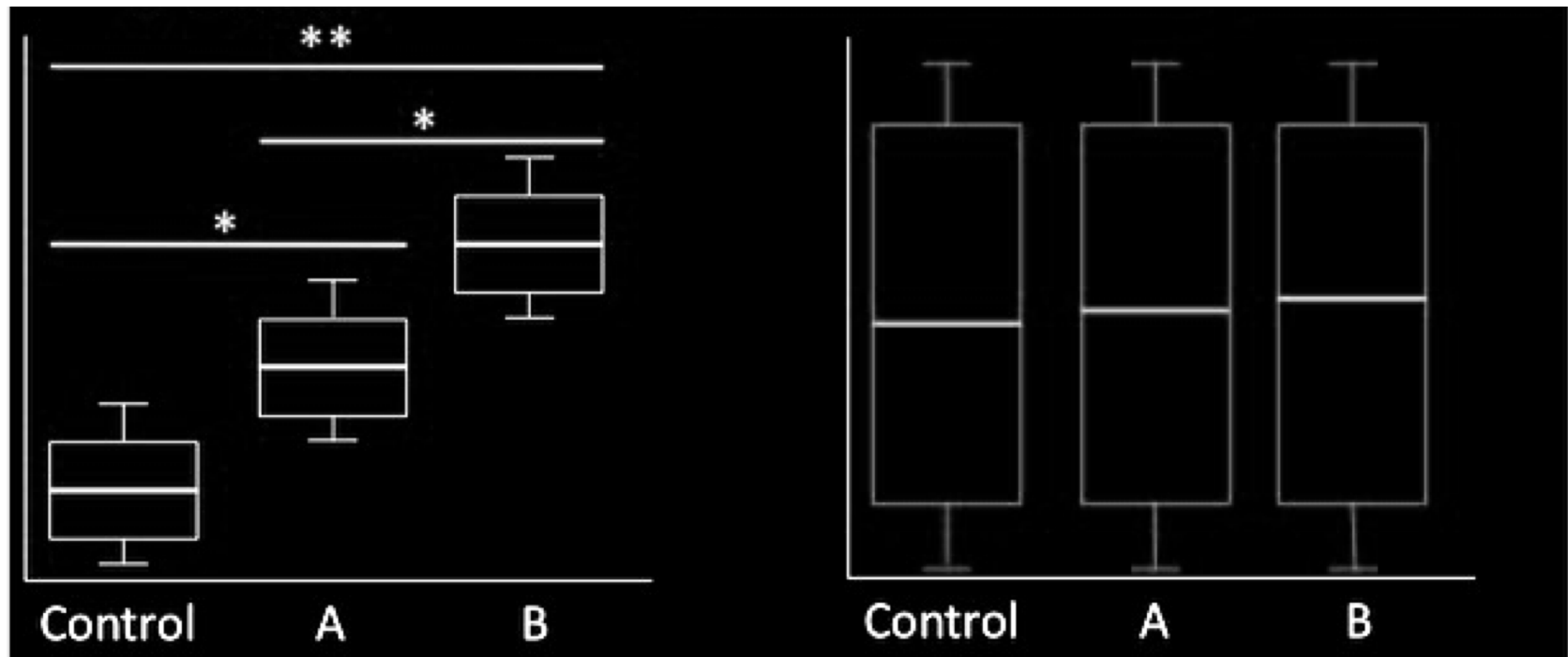


Моделей поведения, стимулируемые у животных в естественной среде

1. Поиск (поиск пищи, исследование окружения)
2. Игра (игровое взаимодействие с окружением)
3. Страсть (сексуальное поведение)
4. Забота (забота о потомстве, других членах группы)
5. Тоска (звуковые сигналы, соответствующие отделени)
6. Страх (бегство)
7. Ярость (атака)

Стресс у лабораторных животных

Результаты нарушения функции эндокринных желез (ГГН-ось)



Норма

Боль/Стресс

Признаки высокого уровня стресса у животных, содержащихся в неволе



- Агрессия
- Стереотипии
- Апатия
- Приобретенная беспомощность

Обогащение условий содержания животных



В чем ключевое различие между этими клетками для животного?

Контроль

ключевое понятие для управления стрессом,
который испытывают лабораторные животные

Три ключевых фактора обеспечения благополучия лабораторных животных

1. Естественная социализация
2. Наличие убежища
3. Наличие занятия (поиск)

Адаптация лабораторных животных

- Период акклиматизации после доставки в лабораторию (5–15 дней для грызунов, 20–30 дней для кроликов)
- Постепенное привыкание к экспериментальным процедурам и персоналу (персонал должен быть обучен методикам обращения с данным конкретным видом)
- Минимальная вариабельность условий содержания животных в ходе эксперимента и вне его

**Зачем нам знать биологию животных,
которых мы используем в лаборатории?**

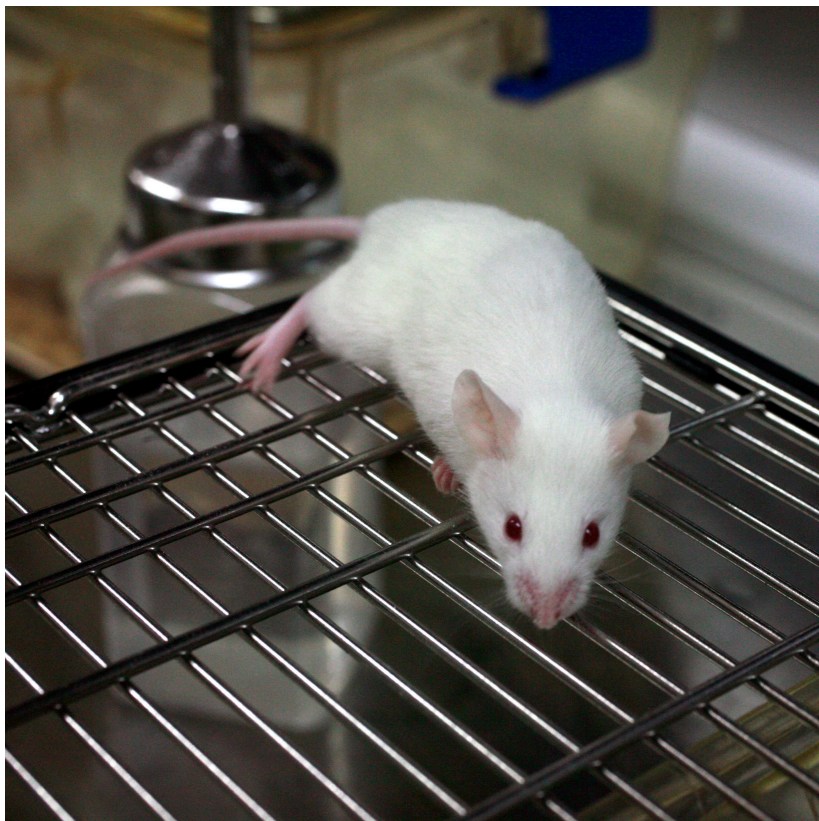
Физиологические различия между видами

- Режим терморегуляции (экзотермы и эндотермы)
- Скорость метаболизма (ккал/сутки; ккал/сутки/кг)
- Режим сна и бодрствования (дневные, ночные)
- Особенности сенсорных систем (зрение, слух, вибрации)
- Основа рациона в естественных условиях проживания

Различия социальных взаимодействий внутри групп

- Естественный состав социальных групп (хомяки, суслики, мыши и т.д.)
- Естественные условия проживания (ареал)
- Агрессия между представителями вида (взаимодействия внутри групп)
- Естественное поведение при стрессе (остановка, бегство)
- Естественный поведенческий репертуар (особенности поиска пищи)

Домовая мышь (*Mus musculus*)



- Эндотермическое всеядное животное, живущее в лесах, кустарниках, культивируемых полях и амбарах или домах, близких к людям
- Период наибольшей активности — сумерки и ночь
- Типичное всеядное животное — в дикой природе питаются семенами, корнями и другими растительными продуктами, а также небольшими насекомыми, личинками и пауками
- Верхние резцы желтого или оранжевого цвета из-за повышенного содержания железа

Состав групп домовых мышей в естественных условиях

- При проживании рядом с людьми формируют колонии с ограниченной территорией. Доминантные самцы формируют группы с несколькими самками и молодняком
- Доминантные самцы из разных групп как правило не нарушают территорию друг друга. Одновременное использование территории наблюдается редко
- При помещении двух и более неродственных самцов в закрытое пространство ведут себя агрессивно, однако данный вариант все равно более предпочтителен, чем одиночное содержание
- Самки при совместном содержании также соблюдают некоторую иерархию, но гораздо менее агрессивны, чем самцы
- Агрессия в семейных группах наблюдается редко. Подросший молодняк, особенно самки, могут оставаться рядом с родителями

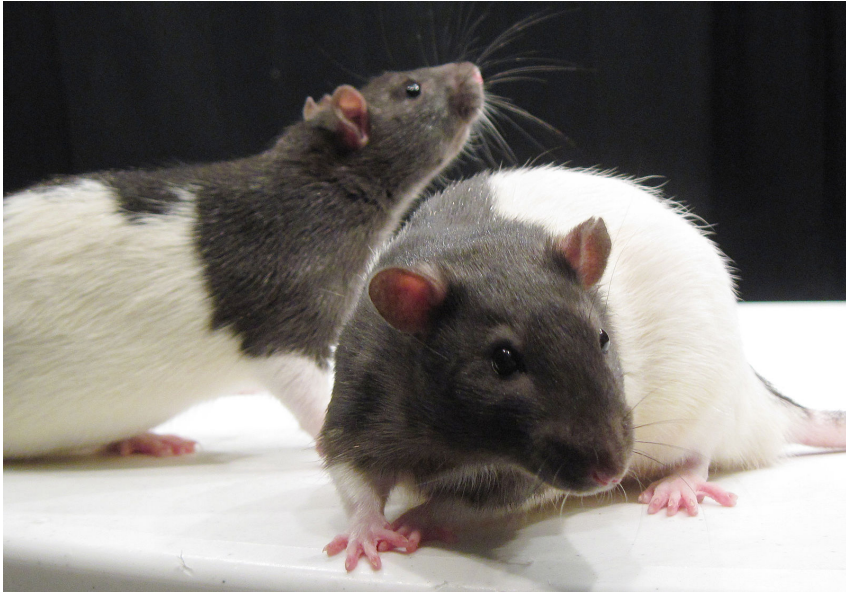
Естественные условия проживания домовых мышей

- Строят сложную состоящую из окружающих материалов сеть «тоннелей» с несколькими камерами для гнездования и хранения пищи и 3–4 выходами
- Строят гнезда из ткани, бумаги или других мягких материалов, выстилая их изнутри еще более тонким измельченным материалом
- Хорошо прыгают и плавают, однако редко отдаляются от своей системы тоннелей более, чем на 15 метров
- Обычно передвигаются на четырех лапах, однако едят и осматривают территорию стоя на задних лапах при поддержке хвоста
- В норме при перемещении основание хвоста используется для баланса и располагается вертикально, однако в условиях стресса хвост опущен
- В естественных условиях на мышей охотятся крысы, кошки, лисицы, ласки, хорьки, мангусты, змеи, ястребы и т.д.
- Естественное поведение для преодоления стресса — скрытность и быстрое перемещение

Характерное поведение домовых мышей

- В покое: уши направлены вперед, глаза широко раскрыты, тело расслаблено
- Комфорт и возбуждение: уход за собой или зевота
- Исследование территории: тело вытянуто, живот прижат к полу, шея вытянута, глаза, уши и усики направлены в сторону стимула
- Злость или испуг: уши повернуты назад, жесткое тело поза с опорой на задние лапы
- Доминирование или ухаживание: залезание на других особей
- Агрессия: быстрое перемещение хвоста, прикусывание хвостов других мышей
- Подчинение: после агрессивных действий со стороны других особей — вертикальное положение тела, голова поднята, передние лапы вытянуты, виден живот

Серая крыса (*Rattus norvegicus*)



- Эндотермическое всеядное животное, живущее как в дикой природе, так и в человеческих поселениях
- Период наибольшей активности — закат и ночь
- Предпочитает сырые и темные условия проживания
- Верхние резцы желтого или оранжевого цвета из-за повышенного содержания железа
- Обладают ярко выраженными способностями к коммуникации на ультразвуковых частотах: сигналы между родственниками, сигналы опасности, смех и т.д.

Состав групп серых крыс в естественных условиях

- Новые группы создаются когда пара строит новое гнездо на ранее незанятой территории
- Как правило проживают крупными группами с доминантными самцами
- Крысы обычно ухаживают друг за другом, спят вместе и играют
- Для индивидуальных особей крайне важно взаимодействие с группой, в частности игры. Как молодые, так и взрослые животные много дерутся в игровой форме, не причиняя вреда друг другу
- Игровые драки отличаются от настоящих тем, что в ходе игр крысы атакуют шею соперника напрямую, тогда как в драках за территорию в основном нападают со спины

Естественные условия проживания серых крыс

- В отсутствие людей часто поселяются в районах вблизи воды, таких как берега рек, однако в настоящее время в большинстве случаев обитают в искусственных средах, например канализационных системах
- В городах молодые крысы и самки большую часть времени роют норы, содержащие гнезда, и при условии доступа к пище не удаляются от них далее чем на 20 метров. Взрослые самцы в основном передвигаются свободно, за ночь преодолевая большие расстояния
- Норы обычно состоят из зон хранения продуктов питания, терморегулируемых гнезд, а также запасных выходов
- Рацион в естественных условиях состоит из семян, корней, побегов, мелких позвоночных и беспозвоночных
- Поведение, связанное с поиском пищи, часто изменяется в зависимости от популяции и окружающей среды, а также доступности источника пищи
- Обучение внутри групп происходит посредством запахов и играет важную роль в питательных привычках. Новорожденные крысы после окончания вскармливания молоком предпочитают есть пищу, которой питалась мать

Характерное поведение серых крыс

- В покое: уши направлены вперед, глаза широко раскрыты, тело расслаблено
- Комфорт и возбуждение: уход за собой или зевота
- Исследование территории: тело вытянуто, живот прижат к полу, шея вытянута, глаза, уши и усики направлены в сторону стимула
- Злость или испуг: уши повернуты назад, жесткое тело
- Доминирование или ухаживание: залезание на других особей
- Возбуждение: хвост напряжен и поднят вертикально вверх
- Фокусировка зрения: перемещение головы вперед и назад

Европейский кролик (*Oryctolagus cuniculus*)



- Эндотермическое строго травоядное животное, наиболее активное на рассвете и закате
- В отличие от мышей и крыс, цвет зубов кроликов — белый. За передними резцами, срезающими траву, расположены жесткие моляры. В отсутствие стирания зубов они могут вырастать со скоростью до 10 мм в месяц, мешая кроликам принимать пищу
- Несмотря на наличие весьма сильной мышечной системы, имеют тонкие хрупкие кости, которые легко ломаются при неправильном обращении
- Толстый мех делает кроликов крайне чувствительными к перегреву

Взаимодействия внутри групп кроликов в естественных условиях

- Имеют пахучие железы, расположенные под подбородком и вокруг анального отверстия, используемые для обозначения своей территории и содержащие информацию о поле, сексуальном статусе и т. д.
- Для общения используют множество звуков: от визгов, хрюкания, рычания, фыркания и шипения до крика в условиях сильной боли или страха
- Несмотря на относительно небольшое расстояние между членами одной группы, кролики мало общаются и имеют отдельные норы, которые они защищают и отмечают с помощью помета

Естественные условия проживания кроликов

- В течение дня обычно остаются в норах, выходя на поиски пищи на рассвете и в сумерках
- Доминантные самцы обычно монополизируют доступ к нескольким самкам женщин. Самцы активно защищают свою территорию, сражаясь до тяжелой травмы или даже смерти.
- В драках кролики используют мощные задние лапы для ударов, а также царапают противников передними лапами и кусаются. Кроме того, они могут выпускать в противника струю мочи, усиливая агрессию
- В естественных условиях кролики часто становятся добычей лис, волков, хорьков, змей и хищных птиц. Естественная реакция на стресс — бегство в нору
- Содержание кроликов требует как визуального контакта с другими кроликами, так и индивидуального места для сна

Характерное поведение кроликов

- В покое: тихий фыркающий звук; возможно облизывание другого кролика или руки персонала, поза расслабленная, свернувшись или лежа на боку с закрытыми или полуоткрытыми глазами
- Исследование территории: стойка на задних ногах, обнюхивание окружения
- Уход за собой: вычесывание и выкусывание клочков шерсти, не вызывающее облысения
- Пометка территории: натирание поверхностей подбородком
- Защита территории: уплощенные уши, шипящие звуки, попытка укусить, удары об пол задними ногами
- Напряжение и страх: поза лежа на животе, уши опущены, глаза широко открыты в направлении опасности
- Острая боль: громкие крики
- Отсутствие материала для строительства гнезда: повторяющиеся попытки скрести пол

Морская свинка (*Cavia porcellus*)



- Эндотермическое строго травоядное животное, наиболее активное на рассвете и закате
- В отличие от мышей и крыс, цвет зубов морских свинок в норме белый. Как и у других грызунов, зубы морских свинок растут всю жизнь и требуют стирания для нормальной работы пищеварительной системы

Состав групп морских свинок в естественных условиях

- Крайне социальные животные живущие группами по 5–10 особей и предпочитающие низкую плотность популяции. Обычно группа состоит из одного самца, нескольких самок и их потомства. Весьма территориальны. Самцы морских свинок устанавливают социальную иерархию, в которой доминирует один альфа-самец. Самцы чрезвычайно агрессивны, когда сражаются за территорию или самок
- Общаются с помощью различных звуков, включая как шорох, мурлыканье, крик, а также щебетание похожее на птичье. Плохо переносят изоляцию
- Имеют две различные защитные модели поведения (при внезапном шуме или движении): либо остаются неподвижными до исчезновения опасности, либо, если опасность угрожает группе, разбегаются в рассыпную

Естественные условия проживания кроликов

- В течение дня обычно остаются в норах, выходя на поиски пищи на рассвете и в сумерках
- Используют для жилья норы других животных
- Никогда не запасают пищу

Характерное поведение морских свинок

- В покое: потягивание и зевота
- Игра: подпрыгивания и и перевороты часто наблюдаются у молодых животных, однако при многократных повторениях могут быть признаками стереотипии
- Напряжение и страх: перемещение по периметру клетки в поисках дополнительного убежища
- Страх: лежат неподвижно, притворяясь мертвыми, до исчезновения опасности

www.arkive.org



Спасибо за внимание!