

Министерство сельского хозяйства Российской Федерации
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Саратовский государственный аграрный университет
имени Н. И. Вавилова»

Методы исследования в ветеринарной фармакологии и
токсикологии

Краткий курс лекций

для аспирантов направления подготовки
36.06.01 Ветеринария и зоотехния

Саратов 2014

УДК 615
ББК 52.8
Л47

Рецензенты:

Доктор технических наук, профессор кафедры «Микробиология, биотехнология и химия»

ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ»

Л.А. Фоменко

Доктор ветеринарных наук, вед. научный сотрудник лаборатории фармакологии ГНУ «Краснодарский НИВИ» Россельхозакадемии

Е.В. Кузьмина

Л47: краткий курс лекций **Методы исследования в ветеринарной фармакологии и токсикологии** для аспирантов направления подготовки 36.06.01 Ветеринария и зоотехния / Сост. Т. Н. Родионова.

Краткий курс лекций по дисциплине **«Методы исследования в ветеринарной фармакологии и токсикологии»** составлен в соответствии с программой дисциплины и предназначен для аспирантов направления подготовки 36.06.01 Ветеринария и зоотехния. Краткий курс лекций содержит теоретический материал по основным вопросам. **Методы исследования в ветеринарной фармакологии и токсикологии.**

Направлен на формирование у аспирантов знаний и практических навыков методов исследований используемых в области ветеринарной фармакологии и токсикологии. Проведения научных и организационных аспектов доклинических исследований новых лекарственных средств, включая требования к планированию, порядку проведения, а также оформлению и предоставлению результатов.

УДК 615
ББК 52.8

© Т. Н. Родионова
© ФГБОУ ВПО «Саратовский ГАУ», 2014

Введение

Целью доклинических токсикологических исследований фармакологического вещества является установление характера и выраженности его повреждающего действия на организм экспериментальных животных и оценка его безопасности. Общепринятым является разделение токсикологических исследований на изучение общетоксического действия и исследовании специфических видов токсичности, используя методы изучения на аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивную токсичность, мутагенность, канцерогенность. Используются методы доклинического исследования эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения различных заболеваний (центрально и периферической нервной системы, сердечнососудистой, системы органов дыхания). Доклинические методы исследования эффективности химиотерапевтических лекарственных средств, лекарственных средств разных фармакотерапевтических групп.

Лекция 1

Методы исследования безопасности лекарственных средств

1.1 Фармококинетическое изучение новых лекарственных форм, содержащих известное фармакологическое средство

Цели и задачи

Целью исследования фармакокинетики фармакологического средства является количественная характеристика процессов его всасывания, распределения и элиминации (метаболизм и экскреция).

Знание фармакокинетических свойств фармакологического средства позволяет обосновать выбор путей и методов его введения, выявить ткани, в которые оно проникает наиболее интенсивно и/или в которых удерживается наиболее длительно, установить основные пути элиминации фармакологического средства. Фармакокинетические данные необходимы для установления зависимости "концентрация—эффект", которая характеризуется меньшими видовыми различиями, чем зависимость "доза—эффект", и поэтому может быть использована для прогнозирования действия фармакологического средства у человека. Кроме того, по результатам экспериментального изучения фармакокинетики фармакологического средства возможно предсказать концентрацию препарата в крови (плазме) или, по меньшей мере, скорость ее снижения у человека и, таким образом, выбрать ориентировочную схему дозирования, которая может быть затем уточнена в ходе клинических испытаний. Важной задачей изучения фармакокинетики оригинального фармакологического средства является оптимизация выбора его лекарственной формы.

Объект исследования и лабораторные животные

Фармакологические средства

Объектом исследования является любое фармакологическое средство, за исключением гомеопатических, независимо от его эндогенной или экзогенной природы.

Лабораторные животные

Исследования фармакокинетики проводятся на здоровых, бодрствующих или наркотизированных животных одного пола (желательно линейных), масса тела которых отличается от нормального значения для соответствующего возраста не более чем на 10 \%. В качестве экспериментальных моделей применяются крысы, кролики, собаки, обезьяны. В специальных случаях, например при проведении комплексных фармакокинетических и фармакологических или токсикологических исследований, допускается использование мышей, морских свинок и кошек.

Необходимо использовать не менее двух видов животных, один из которых не относится к грызунам.

Биологический материал

Важнейшим элементом фармакокинетического изучения фармакологического средства является исследование динамики изменения его концентрации в крови, поэтому плазма (или сыворотка) крови рассматривается в качестве основного вида биоматериала. В тех случаях, когда фармакологическое средство связывается компонентами плазмы (сыворотки) и/или эритроцитами, соответствующие показатели должны быть оценены при концентрациях фармакологического средства, которые отражают диапазон изменения его уровней в плазме (сыворотке) крови.

Определение концентрации фармакологического средства в крови обязательно и в тех случаях, когда фармакологическое средство предназначено для местного применения, — для того, чтобы оценить его системную доступность или доказать, что оно не достигает системного кровотока. В последнем случае единственным видом биологического материала, в котором требуется определять концентрацию фармакологического средства, является ткань в месте его применения (например, кожа или подлежащие мышцы при накожной аппликации фармакологического средства).

Выбор периферических тканей, в которых следует определять концентрацию фармакологического средства, осуществляется таким образом, чтобы среди объектов исследования оказались ткани, различающиеся по степени васкуляризации. В качестве сильно

васкуляризированных тканей можно использовать, например, сердце или селезенку, умеренно васкуляризированных — ткань мышц, слабо васкуляризированных — сальник, кожу или кости (в каждом случае по одному виду биоматериала). Наряду с этим необходимы данные о концентрации фармакологического средства в зонах его терапевтического действия (например, ткань легкого, если химиотерапевтическое средство предполагается применять при пневмонии, ткань головного мозга, если предполагается лечить менингит, и т. д.) и токсического действия (например, в тканях почек, если фармакологическое средство обладает нефротоксическим действием).

Необходимо также определять концентрацию фармакологического средства в органах, обеспечивающих его элиминацию (печень, почки), а также в экскретатах (моча, желчь, фекалии — в зависимости от их роли в элиминации).

Регламент эксперимента

Пути и методы введения фармакологического средства

Пути введения. Фармакокинетику фармакологического средства необходимо исследовать при тех способах введения, которые предполагается рекомендовать для клинических испытаний. При этом даже в тех случаях, когда фармакологическое средство предполагается применять только вне-сосудистым путем, следует изучать фармакокинетику также при внутривенном введении фармакологического средства, если это позволяет его растворимость. Такие данные необходимы для оценки системных фармакокинетических параметров, а также абсолютной биодоступности препарата (см. раздел 2.5).

Методы введения. Внутривенно фармакологические средства можно вводить в хвостовые вены мышей и крыс, ушные вены морских свинок и кроликов, бедренные вены собак и кошек. При многократном введении фармакологического средства животному допускается замена внутривенного введения на внутрибрюшинное, однако в дни проведения повторного фармакокинетического исследования фармакологическое средство следует ввести тем же способом, что и при однократном введении, т. е. внутривенно (см. раздел 2.5.2).

Внутри фармакологические средства вводятся натошак (животные не получают пищи в течение ночи без ограничений в питьевой воде) с помощью глоточного или дуоденального зонда. Добавление фармакологических средств в пищу или питьевую воду не допускается, поскольку в таких случаях трудно обеспечить точную дозировку.

Внутримышечно фармакологические средства вводятся в бедренную мышцу; подкожно — в заднюю лапку крыс, кошек и собак, в бок (ближе к позвоночнику) морским свинкам, кроликам; накожно — на депилированную поверхность спины или живота крыс, морских свинок, кроликов, собак.

В зависимости от вида лекарственной формы и ее предназначения возможны закапывание растворов или аппликация мазей на слизистую оболочку глаза, инстилляция в переднюю камеру глаза, введение суппозитория, ингаляция паров, газов, аэрозолей, в частности путем помещения животных в затравочные камеры, внесение фармакологических средств в кожные или мышечные карманы, имплантация под кожу, в мышцы или полости и т. д.

Режимы введения фармакологического средства

Фармакокинетика фармакологического средства должна быть изучена при его однократном и многократном введении.

Основными целями фармакокинетического исследования при однократном введении фармакологического средства являются характеристика его фармакокинетического профиля в крови, включая проверку гипотезы линейности, изучение распределения между кровью и периферическими тканями, метаболизма и экскреции — на животных одного вида (предпочтительно на крысах), а также оценка биодоступности при внесосудистом введении лекарственного вещества в готовой лекарственной форме — на животных другого вида (предпочтительно на собаках или кроликах).

Целью фармакокинетического исследования при многократном введении фармакологического средства является выяснение его способности накапливаться в организме и возможностей прогнозирования этих процессов по данным, полученным при однократном введении, — на животных одного вида.

При однократном введении необходимо исследовать фармакокинетику фармакологического средства в крови при использовании не менее трех уровней дозы, отражающих диапазон, в котором у животных данного вида реализуется желаемый эффект фармакологического средства без признаков побочного действия. Это необходимо для проверки гипотезы линейности фармакокинетики (см. раздел 2.5).

При многократном введении достаточно использовать один уровень дозы (желательно близкий к величине ЕД50, установленной при фармакологических или химиотерапевтических исследованиях), если фармакокинетика линейна, но не менее двух разных доз (одна из которых соответствует меньшей, а вторая — большей дозе, в которых фармакологическое средство вводилось однократно), если фармакокинетика нелинейна. Интервал дозирования (как правило, 24 ч) и продолжительность многократного введения должны соответствовать использованным в фармакологических (химиотерапевтических) исследованиях.

Продолжительность эксперимента

Длительность наблюдения за концентрацией фармакологического средства в биоматериале определяется возможностями аналитического метода, однако в любом случае должна быть не менее чем в g раз больше периода полувыведения, как после однократного, так и после многократного введения. То же относится и к фармакологическим средствам в составе лекарственных форм, обеспечивающих пролонгированное высвобождение активного компонента.

Схема отбора проб биоматериала

Схема отбора проб определяется формой кривой "концентрация фармакологического средства — время" — чем сложнее форма, тем чаще требуется отбирать пробы. Вместе с тем схема должна быть достаточно экономной, чтобы число животных, включенных в эксперимент, обеспечивало его компактность и не требовало учета дополнительных факторов (изменения гемодинамики, средней массы тела, возраста и др. в процессе исследования). Число повторностей определения концентрации определяется индивидуальной вариабельностью

фармакокинетического профиля и точностью аналитического метода — чем сильнее вариабельность и ниже точность, тем больше требуется повторных определений. В тех случаях, когда у каждого животного из выборки отбирается только одна проба (одно животное — одна точка), число животных на одну точку должно быть не меньше 8. В тех случаях, когда у каждого животного пробы отбираются в каждой временной точке, число животных должно быть не меньше 6.

Поскольку априори установить оптимальный регламент трудно, целесообразно вначале провести пробные эксперименты на ограниченном числе животных при введении им фармакологического средства в большей из планируемых доз. При этом следует отобрать возможно большее число проб в моменты времени, возрастающие в геометрической прогрессии (например, через 0,25; 0,5; 1; 2; 4; 8 ч и т. д.). Визуальный анализ обычно позволяет выявить на кривой "логарифм концентрации фармакологического средства (или логарифм скорости экскреции) — время" фрагменты, характеризующиеся неодинаковым наклоном. При одномоментном внутривенном введении обычно выявляются 2—3 фазы снижения концентрации фармакологического средства в крови, при внесосудистом введении — наряду с фазами снижения концентрации (их число может быть меньше, чем при внутривенном введении) выявляется фаза предшествующего возрастания концентрации; при использовании лекарственных форм с пролонгированным высвобождением фармакологического средства к уже упомянутым нередко добавляется фаза плато и т. д. Несколько проще обычно выглядят фармакокинетические кривые фармакологических средств в периферических тканях, для которых не характерны резкие перепады концентрации.

В любом случае выбор моментов времени отбора проб должен обеспечивать получение нескольких (не менее трех) точек для каждого фрагмента фармакокинетической кривой. Особое внимание следует обратить на ее конечный участок, наклон которого не только определяет величину основных фармакокинетических параметров, в частности периода полувыведения фармакологического средства, но и позволяет оценить необходимую продолжительность наблюдения за концентрацией (или скоростью экскреции) фармакологического средства для последующего основного эксперимента (см. раздел 2.3.3).

При изучении кинетики экскреции необходимо определять не только концентрацию фармакологического средства в каждой порции

экскрета, но и его объем, поскольку кинетическому анализу подвергаются данные "скорость экскреции (отношение количества фармакологического средства, выделенного за фиксированный промежуток времени, к продолжительности этого промежутка) — время" и/или "кумулятивная экскреция — время".

Для упрощения последующего фармакокинетического анализа следует спланировать эксперимент таким образом, чтобы у каждого животного все пробы были отобраны в одни и те же моменты времени (или в выбранные промежутки времени, если речь идет об экскретах), предусмотренные регламентом.

1.2 Методы количественного определения концентрации фармакологических средств

Для определения концентрации фармакологических средств в биоматериале могут быть использованы различные методы (физико-химические, иммунологические, микробиологические и др.), обеспечивающие возможность уверенного слежения за концентрацией фармакологического средства при выбранных условиях фармакокинетического эксперимента, в частности его длительности, и отвечающие общим требованиям избирательности, точности, воспроизводимости.

В тех случаях, когда в биоматериале наряду с неизменным фармакологическим средством присутствуют продукты его биотрансформации, а суммарная кумулятивная экскреция неизменного фармакологического средства значительно ниже дозы, необходимо количественное определение метаболитов. Вместе с тем детальное изучение кинетики образования и элиминации метаболита(ов) требуется только при условии существенного вклада метаболического превращения фармакологического средства в его элиминацию, особенно когда метаболит обладает биологической активностью.

Если вследствие пресистемной элиминации фармакологического средства оно подвергается метаболическому превращению и не обнаруживается в крови в неизменном состоянии и/или не обладает биологической активностью (пролекарство), необходимо определять концентрацию именно метаболита(ов).

Анализ фармакокинетических данных

Однократное введение фармакологического средства

Гипотеза линейности. Проверка этой гипотезы является важнейшим элементом фармакокинетического анализа, так как позволяет оценить предсказуемость изменений концентрации (C) в ответ на изменение дозы (E) фармакологического средства. Для проверки этой гипотезы следует оценить статистическую достоверность отклонения от нуля свободного члена линейной регрессии площади под кривой "концентрация—время". Гипотеза принимается, если свободный член незначимо отличается от нуля. Кроме того, вывод о линейности фармакокинетики фармакологического средства может быть сделан при условии совмещения кривых "концентрация (C)—время (I)", нормированных относительно дозы (кривые изменения C/E во времени), или при условии, что значения параметров фармакокинетики (см. ниже) не зависят от дозы. Гипотеза линейности проверяется применительно к фармакокинетическим профилям фармакологического средства в крови, однако та же гипотеза может быть проверена и для других видов биоматериала, в котором определяется концентрация фармакологического средства (тест-ткани).

В тех случаях, когда линейность фармакокинетики сохраняется только в ограниченном диапазоне использованных доз, следует указать его пределы.

Системные параметры. При условии линейности для характеристики фармакокинетических свойств фармакологического средства следует использовать параметры, значения которых не зависят от структуры соответствующей математической модели (внемодельные параметры).

Общий клиренс (Cl), отражающий объем тест-ткани, освобождающийся от фармакологического средства в единицу времени, определяется отношением дозы к площади под кривой "концентрация—время" (AUC, в пределах от нуля до бесконечности):

$$Cl = D/AUC.$$

Стационарный объем распределения (V_{gg}) — коэффициент пропорциональности между концентрацией фармакологического

средства в тест-ткани и его количеством в организме, отражающий интенсивность распределения фармакологического средства между тест-тканью и другими тканями, — определяется произведением Cl на среднее время удержания (MRT — среднее время пребывания в организме молекулы фармакологического средства):

$$V_{ss} = Cl \times MRT.$$

Значения Cl и V_{ss} могут быть оценены только по данным $C(t)$, полученным при внутрисосудистом введении фармакологического средства, поскольку в этом случае количество фармакологического средства, поступившее в системный кровоток, равно дозе.

Величина MRT может быть рассчитана по формуле:

$$MRT = AUMC/AUC,$$

где $AUMC$ — площадь под кривой "произведение времени на концентрацию фармакологического средства (tC) — время (t)".

Наряду с параметрами Cl , V_{ss} и MRT следует оценить продолжительность периода полувыведения ($T_{1/2}$) — период времени, в течение которого концентрация фармакологического средства снижается вдвое. Величина $T_{1/2}$ может быть рассчитана по формуле:

$$T_{1/2} = 0,693 A,$$

где t , — показатель экспоненты, характеризующей скорость снижения концентрации препарата на конечном (моноэкспоненциальном) участке фар-макокинетической кривой.

Параметры Cl , V_{ss} и MRT характеризуют фармакокинетический профиль в целом, но не позволяют прогнозировать отдельные значения $C(t)$. Такой прогноз осуществляется с помощью структурных моделей (частевых, стохастических, физиологических). Их использование предусматривает оценку ряда параметров, которые необходимы для математического описания фармакокинетических данных и прогнозирования уровней фармакологического средства, создающихся при его многократном введении (см. раздел 2.5.2).

Характеристика всасывания фармакологического средства и оценка биодоступности. Фармакокинетические профили фармакологического

средства в крови при его внесосудистом введении должны быть охарактеризованы максимальной концентрацией (C_{max}) > временем ее достижения (t_{max}) > параметрами AUC, MRT, $T_i/2$.

Абсолютная степень всасывания (f_a — абсолютная биодоступность) определяется отношением значений AUC при внесосудистом (ev) и внутри-сосудистом (iv) введении лекарственного вещества:

$$f_a = AUC_{ev}/AUC_{iv}.$$

Объективная оценка f_a может быть получена путем использования вместо AUC значений площади в пределах от нуля до момента отбора последней пробы крови (AUQ), если величина AUC_t составляет не менее 80 % от AUC.

Скорость всасывания характеризуется значениями t_{max} и C_{max}/AUC или Q_{max}/AUC_t , а также среднего времени всасывания (MAT), которое определяется разностью:

$$MAT = MRT_{ev} - MRT_{iv}.$$

Подобно описанному выше для случая внутрисосудистого введения фармакологического средства фармакокинетические профили после его внесосудистого введения следует описать математической моделью. Это необходимо не только для прогнозирования значений $C(t)$, но и для уточнения оценок t_{max} > C_{max} и C_{max}/AUC или C_{max}/AUC_t , поскольку момент достижения наибольшего из измеренных значений концентрации и ее величина являются лишь оценками истинных значений t_{max} и C_{max} .

Характеристика распределения фармакологического средства в организме. Данные о распределении фармакологического средства между компонентами крови (плазмы или сыворотки) степенью связывания (f — отношение концентрации связанного вещества к его общей концентрации), если она не зависит от концентрации фармакологического средства, и параметрами уравнения Скэтчарда (константа равновесия и концентрация центров связывания), если f_b зависит от концентрации.

Интенсивность проникновения фармакологического средства в периферические ткани должна быть охарактеризована тканевой доступностью (f_r), определяемой отношением значения AUC в ткани

(AUCr) к соответствующей величине AUC в плазме или сыворотке крови (AUCp):

$$f_t = AUC_t / AUC_p.$$

Целесообразно также оценить кажущийся коэффициент распределения (K_d) фармакологического средства между кровью и тканью, определяемый отношением соответствующих концентраций в конечных (моноэкспоненциальных) фазах фармакокинетических кривых при условии, что их наклон характеризуются близкими значениями B :

$$K_d = C_t / C_p.$$

Длительность присутствия фармакологического средства в периферической ткани выражается значениями периода полувыведения и/или среднего времени удержания ($T_{1/2}$, t и MRT_t).

Итог изучения распределения фармакологического средства в организме — выявление тех тканей, в которые оно интенсивно проникает или в которых длительное время удерживается, что может иметь существенное значение для фармакологических и токсикологических исследований.

Характеристика метаболического превращения фармакологического средства. Фармакокинетические профили метаболита (M) должны быть охарактеризованы соответствующими значениями параметров C_{max} , t_{max} , AUC , MRT , $T_{1/2}$ (C_{max} , $M > t_{max}$, $M > AUC_m$, MRT_m , $T_{1/2m}$). При этом степень превращения фармакологического средства в метаболит может быть выражена отношением AUC_M / AUC .

Характеристика экскреции фармакологического средства. Интенсивность выведения фармакологического средства с экскретом характеризуется экскреторным клиренсом, отражающим скорость освобождения тест-ткани (обычно плазма или сыворотка крови, но не экскрет!) от фармакологического средства в результате экскреции. При исследовании экскреции фармакологического средства с мочой оценивается почечный клиренс (Cl_2), определяемый отношением скорости экскреции к средней концентрации фармакологического средства в крови в соответствующий период времени или отношением кумулятивной экскреции (ME) к AUC фармакологического средства в крови:

$$C_{12} = M_n / AUC.$$

Внепочечный клиренс (Cl_{1G}) фармакологического средства оценивается по разности между общим и почечным клиренсом:

$$Cl_{1G} = Cl - Cl_2.$$

Нелинейная фармакокинетика. Описанный в предыдущих разделах аппарат применим для фармакологического средства, фармакокинетика которых линейна. Если фармакокинетика нелинейна, фармакокинетические свойства могут быть охарактеризованы кажущимся значением $T_{1/2}$, величиной AUC , а при внутрисосудистом введении фармакологического средства значениями C_{max} и t_{max} .

Применительно к лекарственным формам, обеспечивающим пролонгированное поступление фармакологического средства в системный кровоток или длительное высвобождение в месте введения (лекарственные формы, предназначенные для местного применения), необходимо оценивать также минимальную концентрацию C_{min} , которая создается соответственно в крови или в месте действия к концу интервала дозирования (t_{int}). Кроме того, следует рассчитать интегральную среднюю концентрацию (квазистационарная концентрация — C_{N^0}), определяемую отношением AUC в пределах от 0 до t_{int} к t_{int} , и оценить выраженность флуктуации уровней фармакологического средства путем отнесения разности ($C_{p_{max}}$, $C_{p_{min}}$) к C^{\wedge} .

2.5.2. Многократное введение фармакологического средства

Анализ фармакокинетических данных в этом случае может быть менее детальным, чем при однократном введении фармакологического средства. Если фармакокинетика линейна, следует оценить значения Cl , V_d и MRT с использованием стационарных значений AUC и AUC_{st} , рассчитанных в пределах интервала дозирования, и $T_{1/2}$ при внутрисосудистом введении фармакологического средства и t_{max} , $T_{1/2}$, а также стационарные значения $C_{p_{max}} > C_{p_{min}} > C_{ss}$ при e_0 внутрисосудистом введении, а для лекарственных форм пролонгированного действия — отношение $(C_{p_{max}} - C_{p_{min}}) / C_{ss}$.

Результаты фармакокинетического исследования при многократном введении фармакологического средства необходимо сопоставить с

данными его фармакокинетики, полученными после однократного введения. Наряду с сопоставлением значений фармакокинетических параметров следует сравнить фактические уровни фармакологического средства с прогнозированными по параметрам фармакокинетической модели, установленным при его однократном введении. Целью такого сравнения является выявление возможных нарушений в закономерной кумуляции фармакологического средства и оценка предсказуемости C_{ss} по данным, полученным при однократном введении фармакологического средства.

Рекомендация выбора дозы фармакологического средства для I фазы клинических испытаний

В соответствии с общепринятыми представлениями выбор дозы фармакологического средства для I фазы клинических испытаний осуществляется на основе результатов токсикологических экспериментов. Вместе с тем для препаратов, характеризующихся значительным терапевтическим индексом, такая доза может быть оценена по данным фармакодинамики и фармакокинетики фармакологического средства у животных.

Прогнозирование дозы базируется на соотношениях между массой (ω) и поверхностью тела (δ) человека и животного. При этом предполагается, что минимальная эффективная доза, отнесенная к (δ), у человека и животного одинакова.

Соотношение между дозами фармакологического средства у человека (масса тела — 70 000 г) и животных (в скобках — стандартная масса тела в г)

Мышь	Крыса	Морская свинья	Кролик	Кошка	Обезьяна	Собака
(20) 388	(200) 56,0	(400) 31,5	(1500) 14,2	(2000) 13,0	(4000) 6,1	(12 000) 3,1

Примечание, κ (см²) = 11,2 м²/г.

Для соответствующих вычислений целесообразно воспользоваться таблицей.

Для того чтобы оценить дозу фармакологического средства для человека, величину дозы, использованной в опытах на животных, следует умножить на число, содержащееся в соответствующей графе таблицы. Например, если минимальная эффективная доза фармакологического средства для крысы массой 200 г составляет 10 мг, то соответствующая доза для человека массой 70 000 г будет в 56 раз выше, т. е. 560 мг.

По результатам экспериментальных исследований, по крайней мере в тех случаях, когда фармакокинетика фармакологического средства описывается моноэкспонентой, возможно прогнозирование фармакокинетического профиля у человека. При этом предполагается, что внутрисосудистое введение фармакологического средства человеку в дозе, которая в пересчете на единицу поверхности тела эквивалентна использованной в опытах на животных, обеспечивает создание в крови человека такой же начальной концентрации. Дальнейшее снижение уровней фармакологического средства можно прогнозировать с учетом соотношения между значениями $T_{1/2}$ у животных (а) и человека (И):

$$T_{1/2}^{\text{чел}} = (a, / a_{\text{жив}}) \times 0,25 \times T_{1/2, \text{жив}}$$

Знание $T_{1/2}$ позволяет ориентировочно оценить длительность наблюдения за концентрацией лекарственного вещества в крови (см. раздел 2.3) при клиническом исследовании фармакокинетики.

Контрольные вопросы

1. Фармакокинетические исследования оригинальных фармакологических средств.
2. Метод биологической оценки сердечных гликозидов.
3. Стандартные образцы и понятия ЕД.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

8. Уша, Б.В. Фармакология. / Б.В.Уша, В.Н.Жуленко, О.И. Волкова. – М.: КолосС, 2003. – 376 с.
9. Соколов, В.Д. Фармакология. / В.Д. Соколов. - М.: Колос, 2003. – 464 с.
- 10.Соколов, В.Д. Клиническая фармакология. / В.Д. Соколов. - М.: Колос, 2003. – 464 с.
- 11.Каплин, В.Г. Основы экотоксикологии. /В.Г. Каплин.- М.: КолосС, 2006. – 232 с.
- 12.Астахова, А.В. Лекарства. Неблагоприятные побочные реакции и контроль безопасности. / А.В. Астахова. - М.: Эксмо, 2008. – 240 с.
- 13.Леонтьева, И.В. Правовые аспекты фармацевтической деятельности. Методические рекомендации. / И.В.Леонтьева, М.Н. Панфилова - Саратов: СГАУ, 2011 – 40 с.

Лекция 2

Методы исследования безопасности лекарственных средств

2.1 Фармакокинетическое изучение новых лекарственных форм, содержащих известное фармакологическое средство

Основной целью такого исследования является выявление фармакокинетических преимуществ новой лекарственной формы перед существующей. В тех случаях, когда эти преимущества не связаны с качественным изменением фармакокинетического профиля в крови (предотвращение деградации фармакологического средства в желудочно-кишечном тракте, снижение пресистемной элиминации, пролонгация удерживания фармакологического средства в организме, повышения направленности транспорта к месту действия и др.) осуществляется оценка биодоступности фармакологического средства при его введении в новой лекарственной форме (г) и внутрисосудистом введении или также внесосудистом введении в уже выпускаемой стандартной (с) форме. В первом случае оценивается абсолютная, а во втором — относительная биодоступность (степень всасывания, параметр f) фармакологического средства при его введении в оригинальной лекарственной форме соответственно по формуле, приведенной в разделе 2.5, и по формуле:

$$f = AUC_r / AUC_s.$$

При наличии данных фармакокинетики фармакологического средства при внутрисосудистом введении может быть установлена характеристика скорости всасывания препарата — среднее время всасывания (MAT). В любом случае исследования, предусмотренные настоящим разделом, носят сравнительный характер (прямое сравнение в эксперименте).

Объем фармакокинетического изучения новых лекарственных форм, содержащих воспроизведенное фармакологическое средство, соответствует указанному в разделе 4. В тех случаях, когда фармакокинетические свойства новой лекарственной формы качественно отличаются от описанных для уже существующих форм (плато концентрации или ее замедленное снижение после диффузного максимума вместо относительно быстрой элиминации с четко выраженным максимумом), необходимо параллельное изучение фармакокинетики и фармакодинамики, с оценкой эквивалентных уровней фармакологического средства.

Контрольные вопросы:

1. Фармакокинетическое изучение новых лекарственных форм, содержащих известное фармакологическое средство.
2. Метод испытания при введении по кожу.

3. Определение биологической активности гонадотропина хорионического.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 3

Методы исследования безопасности лекарственных средств

3.1 Фармакокинетические исследования воспроизведенных фармакологических средств

Основной целью таких исследований является получение доказательств идентичности фармакокинетических свойств воспроизведенного фармакологического средства или лекарственной формы соответствующему оригиналу. В связи с этим исследование всегда носит сравнительный характер (прямое сравнение с оригиналом или сравнение с соответствующими литературными данными). Результаты такого сравнения имеют решающее значение для судьбы воспроизведенного препарата, поскольку его доклинические испытания помимо фармакокинетических исследований обычно включают только оценку острой токсичности.

Фармакокинетические исследования воспроизведенного фармакологического средства выполняются на одном виде животных с использованием одной дозы, вводимой однократно, и предусматривают определение концентрации только в крови (сыворотке, плазме). В специальных случаях изучения лекарственных форм, предназначенных для местного применения, в качестве биоматериала могут быть использованы ткань или биожидкость, отбираемые в зоне помещения препарата.

Если воспроизведенное фармакологическое средство или лекарственная форма сравнивается с оригинальными непосредственно в фармакокинетическом эксперименте, выбор дозы не имеет принципиального значения — важно, чтобы в обоих случаях она была одинаковой. Если в сравнительных

целях используются литературные данные, доза воспроизведенного фармакологического средства должна точно соответствовать дозе оригинального вещества, использованной в фармакокинетическом изучении на том же виде животных.

Регламент фармакокинетического эксперимента (продолжительность слежения за концентрацией препарата в крови, частота и моменты отбора проб крови), обработка данных не отличаются от описанных в разделах 2.3 и 2.5. Поскольку в этих случаях нет необходимости прогнозировать концентрацию препарата у человека, расчеты, предусмотренные разделом 2.6, не проводятся.

Контрольные вопросы:

1. Фармакокинетические исследования воспроизведенных фармакологических средств.
2. Определение биологической активности антибиотиков.

3. Определение на куриных эмбрионах терапевтической активности препарата.
4. Оценка эмбриотоксической и тератогенной активности препарата.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 4

Методы исследования безопасности лекарственных средств

4.1 Фармакокинетическое изучение воспроизведенных фармакологических средств с целью расширения показаний к их применению

Необходимость в таких исследованиях обычно возникает при решении вопроса о целесообразности применения фармакологических средств и лекарственных форм при беременности, как для лечения матери, так и плода, при инфекциях, локализованных в относительно труднодоступных для проникновения препарата органах и тканях, например в тканях головного мозга и т. д. Поэтому соответствующие фармакокинетические эксперименты носят ограниченный и вместе с тем направленный характер. Так, для препаратов, которые предполагается применять при беременности, оценивается способность фармакологического средства проникать через плацентарный барьер — по фармакокинетическим профилям в крови (сыворотке, плазме) матери и биожидкостях и/или ткани плода. Для препаратов, которые предполагается использовать при инфекциях головного мозга, проникновение лекарственного вещества через гематоэнцефалический барьер и т. д. Подобные исследования выполняются на одном виде животных с использованием двух доз, как при однократном, так и при повторяющемся введении. Выбор доз и схем длительного введения фармакологического средства, а также регламента фармакокинетического эксперимента опирается на принципы, изложенные в разделах 2.2 и 2.3, а анализ фармакокинетических данных — на оценку тканевой доступности и коэффициента распределения препарата (раздел 2.5). Экстраполяция доз фармакологического средства, обеспечивающих, например, безопасные и/или эффективные уровни в ткани плода, эффективные концентрации в головном мозге и др., осуществляется способами, описанными в разделе 2.6.

Контрольные вопросы:

1. Фармакокинетическое изучение воспроизведённых фармакологических средств с целью расширения показаний к их применению.
2. Изучение острой токсичности препаратов.
3. Определение местного раздражающего действия.
4. Изучение аллергенных свойств препаратов.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.: КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8

2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 5

Отчетная документация о фармакокинетическом исследовании

5.1 Протоколирование результатов исследования по безопасности лекарственных средств

В отчете об исследовании фармакокинетики должны быть представлены сведения об использовавшихся лабораторных животных (вид, линия, пол, возраст, масса тела), их содержании до исследования и состоянии в момент проведения исследования (бодрствование или наркоз). При работе с наркотизированными животными должны быть приведены данные о применявшихся для наркоза препаратах, дозах.

Необходимо представить информацию о способах введения препаратов и отбора биоматериала, о подготовке и хранении проб. Важна также информация о стабильности новых фармакологических средств и о максимальных сроках хранения содержащих их образцов биожидкостей.

Следует подробно описать методику определения концентрации препаратов в биологических жидкостях. Охарактеризовать использованные реактивы, дать сведения о применявшихся приборах и оборудовании.

Результаты определения концентрации фармакологического средства желательно представить в графической форме. При этом на график должны быть нанесены средние значения найденных концентраций и границы доверительного интервала. Следует указать методы вычисления параметров фармакокинетики. Если при этом использовалась компьютерная техника, нужно предоставить данные о применявшихся программных средствах.

Контрольные вопросы:

1. Протоколирование результатов исследования по безопасности лекарственных средств.
2. Какие сведения должны быть представлены в отчете?
3. Какие животные могут быть использованы при изучении фармакокинетики препаратов?
4. Способы введения препаратов.
5. Отбор биоматериала, подготовка и хранение проб.
6. Методика определения концентрации препаратов в биологических жидкостях.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 6

Методы исследования общетоксического действия фармакологических веществ

6.1 постановка биопроб. Пробит-анализ

Токсикологические исследования обязательны как для субстанции, так и для всех лекарственных форм фармакологического вещества. При проведении исследования субстанции в полном объеме изучения лекарственной формы вещества может быть сокращено. Если лекарственная форма содержит вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители и т. п.), не разрешенные для применения в медицинской практике, то каждое из этих веществ исследуют отдельно. При комбинации нескольких фармакологических веществ в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают токсичность комбинации в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

При изменении соотношения ингредиентов в комбинированной лекарственной форме или увеличении дозировки, для решения вопроса о необходимости проведения токсикологических исследований следует провести переоценку новой комбинации с точки зрения безопасности ее применения.

Необходимо проведение токсикологических исследований воспроизведенных препаратов (генериков) в следующих случаях:

а) препараты, не имеющие разрешения к медицинскому применению в стране-производителе и отличающиеся по составу лекарственной формы от аналогичных, зарегистрированных в России;

б) препараты, не отличающиеся по составу лекарственной формы, но содержащие ингредиенты нефармакопейного качества, или с изменением состава оболочки;

в) препараты, полученные на основе биотехнологии (в любых случаях). 2. Минимальный объем токсикологических исследований генериков должен включать:

а) сравнительное изучение острой токсичности на грызунах при том способе введения, который указан в инструкции по применению препарата;

б) сравнительное изучение субхронической токсичности на животных (крысы, кролики, собаки или др.) при введении препарата не менее 2 нед, при способе применения, указанном в инструкции, в дозах, вызывающих токсический эффект, с обязательным, гистологическим исследованием внутренних органов и области введения препарата.

Фармакологическое вещество

Характеристика

Для проведения токсикологического изучения необходимо иметь характеристику субстанции (предварительную нормативную

документацию; проект ФС) фармакологического вещества, согласно которой оно идентифицируется, устанавливаются пределы содержания примесей, определяется его стабильность. Дается также характеристика (проект ФСП) лекарственной формы и вспомогательных веществ, использованных при ее получении (растворители, наполнители, стабилизаторы и др.). Если характеристика фармакологического вещества меняется, например в результате модификации способа получения субстанции или лекарственной формы, следует оценить влияние этого изменения в связи с данными, полученными при токсикологическом изучении исходного фармакологического вещества.

Физические свойства

Следует иметь данные о растворимости, гидрофобности или липофильности фармакологического вещества, размере и форме кристаллов. Если по условиям эксперимента субстанции исследуют в виде раствора или взвеси с использованием ингредиентов, не указанных в соответствующих лекарственных формах фармакологического вещества, необходимо привести характеристику этих ингредиентов и данные о стабильности используемого раствора. При исследовании хронической токсичности применение дополнительных растворителей не рекомендуется.

Данные о терапевтической активности

Для проведения токсикологических исследований должны быть представлены данные, характеризующие терапевтическую активность фармакологического вещества в эксперименте на животных, с указанием вида животных, использованных моделей, доз и путей введения. Следует также указать предполагаемые направления клинического изучения фармакологического вещества, рекомендуемые дозы, способы и длительность применения.

Экспериментальные животные

Для токсикологических исследований применяют здоровых половозрелых животных, прошедших карантин не менее 10—14 дней. Необходимо указать питомник, из которого получены животные. Неконтролируемыми питомниками пользоваться не следует.

У животных разных видов токсичность фармакологических веществ может сильно отличаться, поэтому необходимо проводить исследования на нескольких видах животных, причем наряду с грызунами обязательно использовать не грызунов. Из грызунов наиболее удобны для токсикологических экспериментов мыши и крысы. Можно применять также кроликов, морских свинок, собак, а также мини-свинок и обезьян.

Токсикологические исследования можно проводить как на нелинейных, так и на линейных животных. В последнем случае следует указать линию (штамм, линия) животных, поскольку чувствительность к фармакологическому веществу может меняться и внутри вида в зависимости от линии.

Эксперименты проводят на животных обоего пола, учитывая полученные данные отдельно для самок и самцов.

Следует указать возраст животных, так как в зависимости от возраста может измениться фармакокинетика и, в связи с этим, — токсичность фармакологического вещества. Для того чтобы избежать большого разброса в исследуемых показателях, рекомендуется использовать животных одного возраста. Динамика

массы тела животных зависит от многих факторов, в том числе и от исходной величины, поэтому разброс по исходной массе не должен превышать $\pm 10\%$.

Содержание экспериментальных животных должно соответствовать действующим Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев).

Следует учитывать, что чувствительность животных к фармакологическому веществу может изменяться под влиянием ряда внешних факторов (температура, влажность, освещенность и кратность воздухообмена помещения, состав подстилок, загрязненность помещения ксенобиотиками и др.). Существенное действие на чувствительность животных к фармакологическому веществу может оказать состав пищи. Рекомендуется давать животным стандартную диету в соответствии с действующими нормами.

Для питья мелких лабораторных животных целесообразно использовать автопоилки. Кормление следует производить в фиксированное время, так как прием пищи может изменить чувствительность животных к фармакологическому веществу.

Наряду с подопытными животными, получающими исследуемые фармакологические вещества, в аналогичных условиях должны содержаться контрольные животные.

Физиологическое и патологическое состояние животных

Действие фармакологического вещества может изменяться под влиянием ряда физиологических факторов. Кроме факторов, упомянутых выше, при проведении токсикологических исследований необходимо учитывать суточные и сезонные ритмы деятельности организма. В связи с этим рекомендуется вводить фармакологические вещества в фиксированное время суток и указывать время года, когда проводились эксперименты.

Фармакологические вещества, предназначенные для детей, следует дополнительно изучать на новорожденных и неполовозрелых растущих животных (по специальным методическим рекомендациям), а вещества для геронтологической практики дополнительно изучают на старых животных. Учитывая изменение реактивности организма при беременности, фармакологические вещества, специально рекомендованные для беременных женщин, исследуют на животных в разные периоды беременности.

Обязательным является проведение токсикологических исследований на здоровых животных, хотя наличие патологии может изменить чувствительность животных и позволяет в ряде случаев получить дополнительную информацию о токсичности фармакологического вещества. Однако широкое использование животных с искусственными, спонтанными или генетическими заболеваниями в настоящее время не может быть рекомендовано при токсикологических исследованиях, поскольку ценность данных, полученных в таких условиях эксперимента, требует дальнейшего изучения и подтверждения.

. Количество животных, используемых в опыте

Число животных в каждой группе должно быть достаточным для того, чтобы оценить характер и частоту проявления токсических эффектов и позволить подвергнуть результаты опытов статистической обработке. Вместе с тем статистический анализ не должен маскировать случайные биологические наблюдения, даже если они статистически недостоверны.

При комплектовании групп экспериментальных животных для хронического токсикологического эксперимента надо иметь в виду необходимость исследования динамики возможного токсического эффекта исследуемого фармакологического вещества, для чего следует производить поэтапный забой животных в процессе введения препарата и в различные сроки после окончания его введения с целью выявления обратимости наблюдаемой патологии.

6.2 Изучение "острой" токсичности

Общие положения

Острая токсичность — вредное действие препарата, проявляющееся после его однократного применения или повторного введения через короткие (не более 6 ч) интервалы в течение суток.

Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных.

Основные параметры острой токсичности лекарственного средства могут быть вычислены с помощью любых статистических методов, однако предпочтительнее пользоваться методами, позволяющими провести сравнительную оценку исследованных параметров для двух или более фармакологических веществ, например методом Литчфилда и Уилкоксона. Используемый метод должен быть обязательно указан в отчете.

Вид и количество подопытных животных

Острую токсичность следует изучать на нескольких видах животных, причем обязательно использовать тот вид, на котором был показан терапевтический эффект фармакологического вещества и на котором будет исследована токсичность при длительном введении. Обычно используют 2—3 вида грызунов и не грызунов (мыши, крысы, морские свинки, кролики или др.). Группы самцов и самок подопытных животных формируют отдельно. Для мелких грызунов каждая группа должна содержать не менее 5—6 самок и такое же количество самцов.

Количество собак и кроликов в группе может быть 3—5. Общее количество мелких грызунов, использованных в опыте, должно обеспечить возможность вычисления ЛД₅₀. Если из-за низкой токсичности фармакологического вещества нельзя определить ЛД₅₀, следует указать максимальную дозу, которая была введена животным.

Пути введения

У мелких лабораторных животных токсичность фармакологического вещества обычно исследуют при нескольких путях введения, причем обязательно использовать тот путь, при котором была показана терапевтическая активность фармакологического вещества, и путь, который предполагается для клинического изучения. Фармакологические вещества, предназначенные

для системного введения, вводят внутрь и парентерально (внутрибрюшинно, если они не растворимы в воде, внутривенно и подкожно, если они растворимы). Следует учитывать, что при определении токсичности имеют значение концентрация и объем вводимого фармакологического вещества, а при внутривенных инъекциях также скорость введения. Фармакологические вещества, предлагаемые для местного применения, наносят или вводят в соответствующую область согласно способу, предлагаемому для клиники. Кроме того, дополнительно изучают их токсичность при системном применении.

Фармакологические вещества, предлагаемые для приема внутрь, следует вводить через зонд, закладывать на корень языка, исключение могут составить полимеры, которые можно давать с пищей.

Фармакологические вещества, рекомендованные для ингаляции, изучают, помещая мелких лабораторных животных в затравочные камеры, снабженные специальными затравочными устройствами.

Сравнение параметров токсичности при разных путях введения может дать ориентировочные данные о скорости и степени всасывания фармакологического вещества, а сопоставление прямых, отражающих зависимость величины токсического эффекта от дозы, позволяет судить о сходстве или различии в механизмах, вызывающих летальный исход при разных путях введения.

Продолжительность наблюдения и регистрация картины интоксикации

Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности должна составлять не менее 2 нед, причем в первый день после введения животные должны находиться под непрерывным наблюдением.

Регулярно фиксируют общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность и характер двигательной активности, наличие и характер судорог, координации движений, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных движений, ритм сердечных сокращений, состояние волосяного и кожного покрова, окраску слизистых оболочек, размер зрачка, положение хвоста, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания и окраску мочи, потребление корма и воды, изменение

массы тела и другие показатели, которые могут быть использованы для выявления токсического эффекта. Для отдельных фармакологических веществ целесообразно исследовать некоторые гематологические показатели (морфологические, биохимические, свертываемость крови).

Весьма существенной является регистрация сроков развития интоксикации и гибели животных. Целесообразно проводить макроскопическое исследование внутренних органов погибших животных, а в случае отсроченной гибели животных — и микроскопическое исследование (степень кровенаполнения органов, наличие кровоизлияний, изъязвлений слизистых оболочек и др.).

Результаты следует представлять в таблице (табл. 1).

Таблица 1

Вид животных	Пол	Дозы в мг/кг	Число погибших животных	ЛД ₅₀	ЛД ₅₀	ЛД ₅₀ (с доверительными границами)	ЛД ₅₀ <

Контрольные вопросы:

1. Постановка биопроб. Пробит-анализ
2. Определение острой и хронической токсичности.
3. Исследования кумулятивных свойств.
4. Исследование иммунотоксических свойств препаратов.
5. Исследование мутагенных свойств препаратов.
6. Исследование канцерогенных свойств препаратов.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8

6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 7

Исследование иммуотоксического действия фармакологических средств

7.1 Изучение влияния лекарственных средств на напряженность иммунитета

В настоящее время иммуотоксикология как научное направление полноправно присутствует в программах большинства токсикологических исследовательских учреждений.

В отличие от установленных Протоколов доклинического изучения общетоксического действия, методологические и методические проблемы исследования иммуотоксического действия фармакологических средств до настоящего времени остаются предметом поиска и дискуссий во всем мире [20].

В нашей стране был разработан ряд соответствующих методических рекомендаций, регламентирующих изучение влияния на иммунную систему фармакологических и иммунобиологических средств, изучение аллергизирующего и иммуотоксического действия потенциальных лекарственных препаратов [1, 2, 6, 7, 9, 11].

Под иммуотоксическим действием традиционно понимают модифицирующее влияние ксенобиотиков и лекарственных средств на иммуногенез, включая иммуносупрессию и гиперстимуляцию иммунитета, способное привести к снижению резистентности организма к инфекции, повышению риска онкологических заболеваний, развитию аутоиммунной патологии и аллергизации организма [22].

Основная задача доклинического изучения влияния потенциальных лекарственных средств на иммунную систему состоит в том, чтобы в эксперименте на животных доказать или исключить возможность развития иммуотоксического действия, вызванного фармакологическим средством или его метаболитами.

Предложенный подход к оценке иммуотоксического действия фармакологических средств заключается в исследовании ряда интегральных иммунологических функций, позволяющих, с учетом результатов гематологических и морфологических исследований лимфоидных органов, оценить возможный риск при применении нового фармакологического средства.

Общие положения

Обязательному тестированию на иммуотоксичность должны подвергаться новые, оригинальные фармакологические средства, а также известные лекарственные средства, для которых отсутствуют данные об изучении иммуотоксичности, рекомендуемые:

а) для применения длительными повторными курсами;

- б) для применения в детской практике, а также для лечения беременных женщин и при назначении в период лактации;
- в) в качестве профилактических средств и контрацептивов;
- г) для использования без назначения врача среди широких слоев населения.

Рассматривается инд и в ид у а л ь н о вопрос об изучении иммуотоксичности препаратов:

- а) предназначенных для лечения злокачественных новообразований;
 - б) применяемых однократно или коротким не повторяющимся курсом.
- Тестирование не обязательно для фармакологических препаратов, предлагаемых:

- а) для лечения заболеваний, представляющих непосредственную угрозу для жизни;

- б) для иммуномодулирующих средств, безопасность применения которых изучена в рамках исследования специфической активности;

Условия проведения эксперимента

Предварительная оценка иммуотоксичности при однократном введении

Цель данного этапа — выявить возможный иммуотропный потенциал фармакологического средства при однократном введении животным в широком диапазоне доз. Независимо от предполагаемых доз и пути введения препарата в клинической практике оценку иммуотропного потенциала предлагается проводить по схеме, оптимальной для выявления как иммуносупрессивного, так и иммуностимулирующего действия. Оценка проводится в интегральном функциональном тесте: выработка антителообразующих клеток (АОК) при иммунизации мышей Т-зависимым антигеном — эритроцитами барана (ЭБ). Результаты этих исследований позволяют выявить характер действия на иммунную систему и активную дозу фармакологического средства. Эти данные используются для обоснования последующих исследований.

Препарат вводится однократно, внутривенно или внутривентально (экспериментальный аналог внутривенного введения).

Уровень доз — 10-кратная терапевтическая для человека в расчете на единицу массы тела и в дозах, кратных 5 (50-кратная, 250-кратная, 1250-кратная). В случае невозможности использования высшей из предложенных доз используется $1/10$ — $1/50$ ДЦ₅₀.

Препарат вводится в день иммунизации животных (перерыв 1 ч) эритроцитами барана в дозе 2×10^7 .

Оценку реакции производят на 4-е сутки методом локального гемолиза в геле агарозы (приложение 1).

Мыши-гибриды (СВАхС57BL/6)F₁, 6—8-недельного возраста массой 18-20 г.

. Оценка иммунотоксичности при курсовом введении

Целью данного этапа является оценка степени и длительности возможного повреждения иммунной системы при введении препарата по схеме, максимально приближенной к клиническому применению.

Режим введения — индивидуально, согласно предполагаемому для использования в клинике.

Способ введения — согласно предполагаемому в клинике (для внутривенных препаратов можно рекомендовать внутрибрюшинное введение животным).

Уровень доз — как минимум два: 10-кратная терапевтическая и доза на порядок выше нее. В случае невозможности использования высшей из указанных доз, максимальная доза обосновывается индивидуально исходя из специфики препарата.

Сроки наблюдения: оценку состояния иммунной системы проводят по

окончании введения фармакологического средства и в случае выявления изменений какого-либо параметра через 7—21 день с целью определения срока восстановления нарушенной функции.

Экспериментальные животные.

Используются сертифицированные животные: мыши СВА, BALB/c, C57BL/6 и др. с массой тела 18—20 г. Однако в иммунотоксикологических экспериментах предпочтительно использование гибридов первого поколения 6—8-недельного возраста (масса тела 20—22 г). Такой выбор животных обоснован фенотипической стабильностью и большей жизнеспособностью, связанной с их гетерозиготностью. Кроме того, это позволяет снизить вероятность непредсказуемого влияния нового вещества на величину реакции в случае использования высоко- или низкоотвечающих мышей ин-бредных линий. Наиболее доступными в наших условиях являются мыши-гибриды (CBA x C57BL/6)F₁ и (C57BL/6 x DBA)F₁.

Группы формируются с учетом получения статистически достоверных результатов (не менее 10 голов). Разброс в группе по массе тела не должен превышать $\pm 10\%$. Необходимо, чтобы контрольные и опытные животные были одного пола, возраста, получены одновременно из одного питомника, содержались в аналогичных условиях. Условия содержания и питания животных должны соответствовать установленным правилам.

В связи с тем, что действие фармакологического препарата зависит от физиологического состояния животных, изменяющегося под влиянием ряда внешних факторов, рекомендуется все исследования проводить в одно и то же время суток (предпочтительно утром).

Контроль: контрольной группе животных вводится соответствующий растворитель в том же объеме и по той же схеме, что и исследуемый препарат. При длительном введении препарата желательно предусмотреть группу интактных животных (того же возраста и источника) для выявления

возможных изменений в иммунной реактивности, обусловленных факторами, не имеющими отношения к исследуемому веществу (стресс и др.)- Желательно в качестве положительного контроля предусмотреть также использование известных иммуностимулирующих и иммуносупрессирующих действия.

7.2 Обоснование предлагаемых методов и подходов к оценке иммуотоксичности на первом этапе исследования

Luster и соавт. в руководстве "Methods in Immunotoxicology" [19) приводят доказательства высокой прогностической ценности использования комплекса перечисленных методов для оценки риска при изучении иммуотоксического действия.

- Используется один из предложенных или другие адекватные поставленным задачам методы.

Из приведенных выше методов тестирования иммуотоксичности наибольшего внимания, с точки зрения информативности, заслуживает оценка гуморального иммунного ответа, т. е. способность иммунной системы к выработке антител в ответ на инфекционные и неинфекционные антигены. Процесс антителообразования, в котором в кооперативном взаимодействии участвуют все основные клетки иммунной системы (Т-, В-, А-),

Таблица 1. Программа первого этапа оценки иммуотоксического действия фармакологических средств при курсовом введении

Оцениваемая функция	Модельные реакции	Иммунологические тесты *
Гуморальный иммунный ответ	Оценка антителообразования у животных при иммунизации их тест-антигенами	1. Определение антителообразующих клеток к ЭБ в реакции локального гемолиза в геле агарозы (метод Ерне).
Клеточный иммунный ответ	Индукция реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ)	2. Реакции гемагглютинации и гемолиза Реакция ГЗТ к ЭБ или гаптену — тринитробензосульфоновой кислоте (ТНБС)
Активная фагоцитоз	корпускулярному антигену и/или гаптену Оценка фагоцитарной и	1. Фагоцитоз агентов различной природы (ЭБ, тушь, латекс, стафилококк и др.) перитонеальными ма

бактерицидной активности фагоцитирующих клеток разной локализации	крофагами. 2. Хемилюминесценция клеток при фагоцитозе опсонизированного материала. 3. Определение активности фермента 5'-нуклеотидазы
---	---

включает главные этапы иммунного реагирования (фагоцитоз, презентацию антигена, распознавание, активацию, пролиферацию, созревание, синтез специфических антител и т. п.), а также сопровождается каскадом цитокиновых реакций.

В качестве антигена могут быть использованы эритроциты барана (ЭБ). Этот экспериментальный Т-зависимый тест-антиген наиболее полно моделирует различные варианты чужеродного агента (корпускулярный, тимус-зависимый, содержащий множество антигенных детерминант).

Наибольшее число исследователей в нашей стране и за рубежом для оценки гуморального иммунного ответа отдают предпочтение методу определения числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей при иммунизации Т-зависимым антигеном [2, 7, 11, 16, 17]. Именно этот интегральный показатель широко используется многими исследователями на первом этапе тестирования фармакологических средств. Оценка иммунотропного потенциала исследуемого препарата проводится в схеме, оптимальной для выявления как иммуносупрессивного, так и иммуностимулирующего действия (приложение 1).

Анализ результатов собственных исследований и данных литературы позволил выявить высокую степень корреляции между активацией антителообразования и системы фагоцитов и влиянием на резистентность организма к инфекции [4].

Оценку клеточного иммунитета традиционно проводят с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при введении определенных классов антигенов (эритроциты барана, туберкулин, овальбумин и др.). Наиболее информативным представляется использование для сенсибилизации тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС). Механизм индукции гиперчувствительности замедленного типа при введении этого гаптена подобен таковому при развитии контактной аллергии ко многим химическим и лекарственным веществам, образующим комплексы с белками организма. Усиление выраженности данной реакции под влиянием фармакологического средства может характеризовать также и риск изменения аллергостатуса и возможность повышения чувствительности организма к традиционным аллергенам.

Следующим, обязательным тестом первого этапа исследования иммуно-токсичности является оценка фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитов различной локализации: периферической крови, фагоцитирующих клеток перитонеального экссудата. При этом в качестве антигена используются агенты различной природы: тушь, эритроциты барана, латекс, стафилококк и т. п. В настоящее время во многих лабораториях для оценки активности фагоцитов широко используется метод хемилюминесценции клеток при фагоцитозе опсонизированного материала *in vitro*. Доказана также высокая информативность в оценке функциональной активности макрофагов метода определения уровня мембранного фермента 5'-нуклеотидазы [8]. Установлено, что активность препаратов, выявленная в указанном тесте, коррелирует с иммуноадаптивной активностью и способностью изменять резистентность животных к инфекции [4].

При выявлении на первом этапе нарушений в иммунном ответе под влиянием фармакологического средства приступают к исследованиям второго этапа, целью которого является получение дополнительной информации о механизме действия исследуемого вещества, что позволяет с большей степенью вероятности прогнозировать последствия применения в клинике фармакологического средства.

7.3 Обоснование предлагаемых методов и подходов к оценке иммунотоксичности на втором этапе исследования

При выявлении на первом этапе исследований чрезмерной активации отдельных звеньев иммунитета имеется, по крайней мере, два аспекта для прогноза опасности при применении потенциального лекарственного средства, а именно: возможное усиление аллергизации и развитие аутоиммунной патологии.

Требования к оценке аллергизирующих свойств фармакологических средств изложены в специальных методических указаниях [3].

Оценка аутосенсibilизации является сложной задачей вследствие разнообразия и специфичности структур организма, которые могут явиться мишенью конкретной аутоагрессии.

В рамках данных рекомендаций для получения первичной информации о возможности срыва толерантности применяют методы, широко используемые в иммунологических исследованиях.

Для изучения митогенных свойств фармакологического средства и влияния его на пролиферацию лимфоцитов рекомендуется реакция бласт-трансформации лимфоцитов.

При наличии водорастворимой формы исследуемого средства, реакция лимфоцитов на повторный контакт с ним *in vitro* позволяет оценить возможность сенсibilизации организма животных, а добавление препарата в культуру пролиферирующих клеток интактных животных позволяет оценить его прямой митогенный эффект. Достаточно информативным, коррелирующим с сенсibilизирующими свойствами фармакологического сред-

ства, является факт усиления ФГА-индуцированной пролиферации спленоцитов мышей после введения им препарата 15].

В качестве альтернативного метода оценки потенциальной способности фармакологических средств индуцировать аутоиммунные и аллергические реакции широко используется методика определения массы и клеточности подколенного лимфатического узла, так называемый popliteal lymph node assay, PLNA [13]. В журнале "Toxicology" [21] данный тест рекомендуется

Таблица 2. Программа второго этапа оценки иммуотоксического действия фармакологических средств при курсовом введении

Оцениваемая функция	Модельная система	Иммунологические тесты
Митогенные свойства	Прямое митогенное действие лекарственных препаратов на лимфоциты	Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) под влиянием исследуемого препарата <i>in vitro</i>
Поликлональные свойства	Поликлональная активация различных клонов антителообразующих клеток	Определение антителообразующих клеток к различным антигенам в реакции локального гемолиза (ЭБ, ЭБ-ТНВС, ЭК)
Функциональная активность лимфоцитов	Пролиферативная активность лимфоцитов <i>in vitro</i>	Реакция бласттрансформации лимфоцитов (спонтанная и индуцированная Т- и В-мито генами)
Резистентность мышей к экспериментальной инфекции	Заражение животных различными видами микроорганизмов	Учет выживаемости и продолжительности жизни

для прогноза лекарственной аллергии и аутоиммунитета: тестирование 130 соединений с помощью PLNA показало положительную корреляцию с документированным аутоиммунным и аллергическим потенциалом и отсутствие ложноотрицательных результатов.

Кроме указанных иммунологических методов исследования, важную дополнительную информацию о возможном развитии аутоиммунных осложнений могут дать морфологические исследования потенциальных органов — мишеней аутоагрессии (почки, щитовидная железа, миокард и др.).

На втором этапе для уточнения последствий изменений в гуморальном и/или клеточном иммунитете предлагается использовать прямой метод заражения животных патогенными вирусами и бактериями после окончания введения препарата и 2—3 нед спустя. Оценка выживаемости и продолжительности жизни в сравнении с контрольными животными дает прямой ответ на вопрос: приводит ли к развитию вторичного иммунодефицита и срыву антиинфекционного иммунитета вызванное фармакологическим средством нарушение, и как быстро восстанавливается иммунная система. Указанные исследования могут проводиться только в специализированной лаборатории.

Контрольные вопросы:

1. Изучение влияния лекарственных средств на напряженность иммунитета.
2. Оценка клеточного иммунитета.
3. Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитов.
4. Оценка влияния препаратов на гиперчувствительность замедленного типа.
5. Оценка влияния препарата на гуморальный ответ.
6. Оценка активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 8

Изучение репродуктивной токсичности фармакологических веществ

8.1 изучение влияния лекарственных средств на репродуктивную систему самцов и самок

Изучение генеративной функции самок и самцов

Задачей этого этапа исследований является выявление возможного отрицательного действия фармакологического вещества на стадии проге-неза (формирование мужских и женских гамет), нарушений полового поведения и транспорта продуктов зачатия.

Изучению должны подвергаться все новые оригинальные фармакологические вещества. Исключение может быть сделано для веществ с противоопухолевой активностью, если их применение ограничивается только онкологической практикой, и для веществ, рекомендуемых по жизненным показаниям.

Исследуются также вспомогательные вещества, не разрешенные для медицинского применения.

Изучению подлежит субстанция фармакологического вещества. В тех случаях, когда использование субстанции не обеспечивает преимущества перед лекарственной формой в отношении возможности использования широкого диапазона доз и удобства введения препарата экспериментальным животным, целесообразно проводить изучение репродуктивной токсичности лекарственной формы. При комбинации нескольких лекарственных веществ в одной лекарственной форме следует изучить комбинацию в целом только в том случае, если один из компонентов в этом плаце не изучен.

Изучаемое вещество необходимо вводить тем способом, который предусмотрен при клиническом применении. При пероральном способе применения вещество следует вводить зондом. Желательно предусмотреть дополнительную группу животных для выяснения обратимости эффекта в случае его обнаружения.

. Необходимо иметь в виду, что подавление репродуктивной функции при длительном введении некоторых фармакологических веществ может быть обусловлено не только нарушениями гаметогенеза, но и многими другими причинами (изменение эндокринной функции половых желез, гипофиза, надпочечников, поражение гипоталамуса, центров головного мозга и т. п.).

Поэтому, если под влиянием тестируемого вещества возникают нарушения плодовитости животных, необходимо выяснить, зависит ли это от патологии спермато- или оогенеза, либо от других причин, используя существующие методы выявления повреждающего действия фармакологических веществ на спермато- и оогенез. Выбор конкретных методов исследования проводится экспериментатором. Ряд рекомендуемых методов приведен в приложении.

8.2 Изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном периоде развития

Под эмбриотоксическими свойствами понимают способность того или иного вещества оказывать токсическое действие на развивающиеся зародыши. Эмбриотоксичность может проявляться как в повышении уровня эмбриональной смертности (эмбриолетальное действие), так и в виде анатомических, гистологических, цитологических, биохимических, нейрофизиологических отклонений от нормы, проявляющихся до или после рождения (тератогенное действие). Кроме того, эмбрио- и фетотоксичность может проявляться в изменении массы тела, краниокаудального размера плодов, задержке ossификации скелета (общая задержка развития), увеличении перинатальной смертности.

Исследованию на наличие эмбриотоксических свойств должны подвергаться все новые фармакологические вещества, которые могут быть назначены женщинам в период беременности, а также все не использовавшиеся ранее в медицинской практике соединения, которые в качестве вспомогательных веществ включаются в лекарственную форму новых или уже применяемых лекарств. Положения, изложенные в пунктах 1.3 и 1.4, должны соблюдаться и при изучении эмбриотоксического действия.

Изучаемые вещества необходимо вводить тем же способом, который предусмотрен при клиническом применении. При пероральном способе применения вещество следует вводить зондом. По возможности следует избегать внутрибрюшинного введения вещества.

Экспериментальные исследования должны включать изучение состояния плодов к концу антенатального периода развития.

Поскольку чувствительность зародыша к токсическому действию

фармакологических веществ зависит от стадии развития, и при этом зародыши, находящиеся на одной стадии развития, могут различаться в чувствительности к действию различных по структуре веществ, сроки введения вещества беременным самкам должны охватывать весь период беременности.

Дозы тестируемого вещества рассчитывают на единицу массы тела самки. Наиболее целесообразно, с точки зрения последующей интерпретации результатов, — проводить тестирование вещества, используя не менее 2—3 доз (см. п. 2.5).

У всех без исключения млекопитающих часть зародышей погибает до или после имплантации, а у некоторых зародышей спонтанно возникают аномалии развития. Поэтому в лабораториях, проводящих тестирование, необходимо иметь данные по так называемому "обобщенному" контролю: данные, полученные на интактных животных, использовавшихся в качестве контрольных в предыдущих исследованиях, при сохранении стабильных условий их содержания.

Основные опыты проводят на крысах. В случае необходимости получения дополнительной информации используют второй вид животных — кролики, хомяки, мини-свиньи и др. При выборе вида животного необходимо учитывать фармакокинетические параметры и видовую чувствительность изучаемого лекарственного вещества.

ТЕСТИРОВАНИЕ НА КРЫСАХ. Каждая группа крыс как в опыте, так и в контроле должна состоять не менее чем из 15—20 беременных животных. Первым днем беременности считают день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке. В 13 опытах используют виргинных самок линейных, гибридных или рандомбредных животных.

4.9.2. Тестируемое вещество вводят самкам один раз в сутки, желателно в одно и то же время. При отсутствии указаний о выраженной индукции или ингибировании ферментов возможно введение лекарственных веществ с 1-го по 19-й день беременности в 2—3 дозах (п. 2.5). Возможна и следующая схема введения препарата: с 1-го по 6-й (доимплантационный период), с 6-го по 16-й (органогенез), и с 16-го по 19-й дни беременности (фетогенез). В этом случае изучаемое вещество вводят с 6-го по 15-й дни беременности в 2—3 дозах, в остальные сроки можно ограничиться введением одной высшей дозы (при отсутствии эффекта). Если по техническим причинам невозможно ввести вещество в течение указанных сроков (например, при внутривенном введении), экспериментатор может воспользоваться схемой введения, предусматривающей 3- или 4-дневное непрерывное введение вещества, учитывая при этом условия, изложенные в п. 2.5.

Крысам контрольной группы в эти же сроки следует вводить растворители, используемые при приготовлении раствора или суспензии тестируемого вещества. Кроме того, может быть образована группа интактных беременных самок.

В ряде случаев, по усмотрению исследователя, целесообразно использование сравнительного контроля, т. е. животных, которым вводят уже применяемый в клинической практике препарат, близкий к изучаемому по химической структуре или аналогичный по профилю фармакологического действия. Для оценки реактивности экспериментальных животных можно использовать позитивный контроль при введении животным какого-либо эталонного тератогена (салициловокислый натрий, циклофосфамид и др.) в дозе, оказывающей эффект примерно у 50 % зародышей.

Во время эксперимента следует наблюдать за состоянием и поведением беременных самок, регулярно, не реже одного раза в неделю, взве-

шивать животных для выявления возможного токсического действия изучаемого вещества.

Результаты оцениваются после эвтаназии и вскрытия самок. Вскрытие проводят на 20-й день беременности.

Показателями эмбриотоксичности служат: пред- и постимплантационная эмбриональная смертность, морфологические (анатомические) пороки развития, а также общая задержка развития плодов. Предимплантационную смертность определяют по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке; постимплантационную смертность — по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов. При оценке тератогенного действия рекомендуется сначала подсчитать количество плодов с аномалиями, заметными при внешнем осмотре, а затем разделить плоды на 2 группы и у одних плодов исследовать состояние внутренних органов, у других — состояние скелета. Кроме того, плоды взвешивают и определяют их краниокаудальный размер.

При статистической обработке за единицу наблюдения принимают помет, т. е. результаты, полученные при вскрытии одной самки. Сведения о методах статистического анализа, использованных при обработке результатов, должны быть указаны в отчете.

ТЕСТИРОВАНИЕ НА КРОЛИКАХ. Исследования проводят на виргинных самках. Каждая группа (в опыте и контроле) должна состоять не менее чем из 12 беременных крольчих.

Изучаемое вещество рекомендуется вводить с 6-го по 18-й дни беременности (период органогенеза), один раз в сутки, в высшей дозе (п. 2.5).

Группы контрольных животных должны быть такими же, как указано в п. Вопрос о том, использовать субстанцию или лекарственную форму, решается так, как указано в п. 2.3. Результаты оценивают после эвтаназии и вскрытия самок.

Вскрытие проводят на 27—28-й день беременности. Можно прибегать и к хирургическому извлечению плодов у живых крольчих.

4.9.9- Показателями эмбриотоксичности служат те же показатели, что и у крыс (п. 2.9.5). Статистическую обработку результатов проводят так же, как изложено в п. 4.9.6.

Таблица 1. Исследование эмбриотоксического действия (наименование препарата) на (наименование вида животных)

Показатели	Дни введения препарата
Количество беременных самок	
Количество желтых тел	О/О — в числителе — общее количество, — в знаменателе — на одну самку

Количество мест имплантации		O/O
Количество живых плодов		O/O
Количество резорбций		O/O
Количество мертвых плодов		O/O
Предимплантационная гибель		(в%)
Постимплантационная гибель.	Масса плода	(в %) (в г)
Краниокаудальный размер		(п мм)
Внешний осмотр плодов:		
количество обследованных плодов		
из них с аномалиями развития:		

Показатели	Дни введения препарата
абс. % Состояние костной системы: количество обследованных плодов из них с аномалиями развития: абс. % Состояние внутренних органов: количество обследованных плодов	4
абс. %	

Нарушения развития, отмеченные при исследовании плодов (наименование вида животных), полученных от самок, которым вводили (наименование препарата)

Вид нарушения

Группа животных (экспозиция, доза препарата) Количество плодов, имевших данное нарушение

абс.

% к общему количеству обследованных по этой методике

8.3 Изучение антенатального повреждающего действия фармакологических веществ, регистрируемого в постнатальном периоде развития

Целью исследований, проводимых на этом этапе, является выявление нарушений эмбрионального развития, проявляющихся только в постнатальном периоде жизни.

. Исследование проводят на виргинных самках линейных, гибридных или рандомбредных животных. Как в подопытной, так и в контрольной группах должно быть получено потомство не менее чем от 10 самок. Изучаемое вещество вводят самкам 1 раз в сутки с 6-го дня беременности и до родов (период органо- и фетогенеза) в дозе, близкой к максимальной (п. 1.6).

Контрольная группа самок должна получать в эти же сроки растворитель, используемый при введении препарата. Во время введения препарата необходимо регистрировать состояние и поведение самок, динамику массы тела, продолжительность беременности, течение родов. За 3—4 дня до родов беременных самок следует рассадить по одной в клетку и обеспечить их подходящей подстилкой для устройства гнезда. В каждом помете оставляют по 6—8 новорожденных (желательно одинаковое количество самок самцов). На 25—30-й день после рождения крысят отсаживают от матерей.

Исследования следует начинать вскоре после рождения, но не раньше чем через 24 ч, и, по возможности, продолжать до 2-месячного возраста. Оценка включает следующие типы исследований: общие наблюдения за физическим развитием потомства; изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания самкой; изучение двигательного и эмоционального поведения и способности к координации движений у потомства после окончания вскармливания; изучение обучаемости и памяти: выработка условных рефлексов как с положительным, так и с отрицательным подкреплением и сохранение полученных навыков. В

исследованиях 1—3-го типа должны быть обследованы все животные. При формировании групп для исследований 4-го типа от каждого помета можно взять в группу по 2 животных. Программа изучения постнатального развития определяется экспериментатором с учетом фармакологических и токсических свойств изучаемого лекарственного вещества. Примерный перечень тестов указан в приложении. В некоторых случаях он может быть расширен для получения дополнительной информации (изучение влияния на клеточный состав крови, проведение биохимических, патоморфологических исследований, спаривание с последующим изучением потомства F₁, F₂ поколений и др.).

Необходимо иметь в виду, что введение некоторых веществ во время беременности может неблагоприятно влиять на поведение самок, приводя к нарушению лактации, угасанию материнских инстинктов и т. п. В связи с этим может возникать необходимость перекрестного вскармливания потомства.

Для некоторых фармакологических веществ, применяемых во время грудного вскармливания, желателен изучение их влияния на развитие потомства. Исследования проводят при введении вещества самкам с 1-го дня после родов до окончания вскармливания (25-й день). Состояние потомства оценивают, как и при изучении постнатального развития (п. 3.3).

При статистической обработке полученных результатов в качестве независимой переменной используют среднее значение соответствующего показателя для отдельного помета. В связи с этим при формировании групп для отдельных серий испытаний желателен, чтобы соблюдалось равное представительство от каждого помета. При этом необходимо предусмотреть возможность раздельного анализа результатов для самок и самцов. В отчете должны быть представлены сведения об использовавшихся методиках статистического анализа.

Схема отчета о результатах изучения эмбриотоксических свойств и влияния на репродуктивную функцию фармакологического вещества

Представляемый в Фармакологический Государственный комитет Минздрава России отчет должен включать цифровые данные в форме таблиц, содержащих основные сведения, необходимые для суждения о наличии или отсутствии у изучаемого препарата неблагоприятного действия на внутриутробное развитие и процессы репродукции. Форма некоторых таблиц представлена в приложении.

При описании аномалий развития следует руководствоваться общепринятой терминологией. Если трудно описать какую-либо из аномалий развития, следует представить фотографию плода с этой аномалией.

В заключительной части отчета необходимо дать оценку результатам тестирования по следующим направлениям:

- оценка результатов, полученных при изучении влияния препарата на генеративную функцию;
- оценка результатов, полученных при обследовании потомства в конце антенатального периода развития;
- оценка результатов, полученных при обследовании потомства в постнатальном периоде развития.

Общее заключение о наличии или отсутствии повреждающего действия лекарственного средства на репродуктивную функцию и внутриутробное развитие.

Контрольные вопросы:

1. Изучение влияния лекарственных средств на репродуктивную систему самцов и самок.
2. Изучение эмбрио – и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном периоде.
3. Изучение антенатального повреждающего действия, фармакологических веществ в постнатальном периоде.
4. Изучение эмбриотоксических свойств.
5. Основные методики, используемые в экспериментах по изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 9

Исследования фармакологических веществ алергизирующих свойств

9.1 Общие положения

Под алергизирующими свойствами понимают способность того или иного вещества вызывать при введении в организм состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсибилизация), в основе которой лежат различные иммунопатологические механизмы:

1. Анафилактический тип — реакция между фиксированными на клетке антителами (АТ) IgE и специфическим антигеном (АГ) с последующим высвобождением медиаторов из клеток-мишеней (базофильные лейкоциты или тучные клетки). К этому типу реакций относятся анафилактический шок, отек Квинке, крапивница, определенные виды бронхиальной астмы.
2. Цитотоксический тип — реакция АТ (IgM или IgG) с компонентами клеточной оболочки. Разрушение клетки происходит в присутствии комплемента (гемолитическая анемия, агранулоцитоз, лейкопения, тромбоцитопения).
3. Алергические реакции, связанные с образованием иммунных комплексов в крови или тканях и активацией комплемента (феномен Артюса, сывороточная болезнь, увеит, лекарственная лихорадка, алергический васкулит).
4. Клеточный тип — реакция сенсибилизированных лимфоцитов со специфическим АГ. Механизм действия по типу гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (алергические дерматиты).

Механизм, по которому может развиваться алергическая реакция, зависит от многих факторов — природы АГ, дозы, пути введения, кратности и продолжительности введения, наличия адъювантов, подбора животных, физико-химической структуры фармакологического средства, способности соединиться с белками в организме и др. В зависимости от этого алергические реакции развиваются по "немедленному" или "замедленному" типу.

Реакции "немедленного" типа развиваются быстро, в течение нескольких минут (10—20 мин), в их механизме участвует реакция антиген—антитело в тканях и жидких тканевых средах.

Реакции "замедленного" типа — реакции между АГ и сенсибилизированными Т-лимфоцитами с последующим развитием (через 24—48 ч) алергического воспаления. Воспаление обусловлено действием медиаторов, которые высвобождаются из сенсибилизированных лимфоцитов. Реакциям "замедленного" и "немедленного" типов соответствуют разные стадии алергических реакций: иммунологическая, патохимическая, патофизиологическая. При подборе тестов для испытания фармакологических средств на алергизирующее действие необходимо руководствоваться

следующими принципами: информативность, экономичность, воспроизводимость, оптимальное сочетание методов аллергодиагностики *in vivo* и *in vitro*, использование таких методов, которые бы позволяли выявить разные типы аллергических реакций.

9.2 Условия проведения эксперимента

Учет сенсibilизирующих свойств обязателен и проводится после оценки токсичности всех новых фармакологических веществ. Исследованию подлежат субстанции и все лекарственные формы. Особенно тщательной проверке должны быть подвергнуты вещества, содержащие белковые примеси и высокомолекулярные соединения. Если лекарственная форма содержит вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители и т. п.), не разрешенные для применения в медицинской практике и не изученные ранее на этот вид активности, то каждое из этих веществ исследуют отдельно. При комбинации нескольких фармакологических веществ в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают аллергенность комбинации в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

При изменении состава лекарственной формы, технологии ее изготовления или состава вспомогательных веществ необходимо заново испытать новую комбинацию на аллергенность.

При решении вопроса об исследовании неоригинального фармакологического средства следует исходить из наличия достаточно обоснованных литературных сведений экспериментального и ретроспективного характера о способности оригинального лекарственного средства и лекарственного препарата вызывать состояние сенсibilизации и степени ее проявления или отсутствию таковой. В случае наличия этих данных, а также при идентичности по качественному и количественному составу предлагаемой и разрешенной лекарственных форм, можно ограничиться представлением экспертного заключения.

9.3 Контрольный препарат

Изучение сенсibilизирующих свойств нового фармакологического средства, относящегося к известному

фармакологическому классу, проводят в сравнении со стандартным лекарственным средством.

При необходимости изучения неоригинального фармакологического средства исследование, как правило, проводят в сравнении с оригинальными образцами.

Для оценки реактивности экспериментальных животных можно использовать позитивный контроль, т. е. животных, которым вводят какой-либо эталонный аллерген (например, 2,4,6-тринитрофенилсульфоокислота, 2,4,6-тринитрохлорбензол, 2,4-динитрохлорбензол, пикрилсульфоокислота и др.).

9.4 Характеристика фармакологического средства

К моменту испытания необходимо располагать сведениями о физико-химических свойствах фармакологического вещества; составе готовой лекарственной формы; дозах (летальная и эффективная, рекомендуемая для клинических испытаний); признаках интоксикации, специфических для данного вещества; рекомендуемых способах введения; профиле фармакологического действия; показаниях и схемах применения препарата в клинике. Желательно также иметь данные о фармакокинетике фармакологического вещества.

Состав исследуемого фармакологического средства определяется проектами временных фармакопейных статей на субстанцию и лекарственную форму в соответствии с требованиями Минздрава России. Изучаемые образцы должны соответствовать проекту временной фармакопейной статьи.

Растворители и разбавители фармакологических средств

Наиболее распространенными растворителями фармакологических средств являются дистиллированная вода и изотонический раствор натрия хлорида.

При работе с водонерастворимыми веществами возможно использование 1 % этилового спирта, ацетона, 1 % раствора крахмала. При кожных аппликациях применяют ланолин, вазелиновое или растительное масло [8].

9.5 Исследуемые дозы

При исследовании сенсibiliзирующих свойств фармакологических средств наиболее оптимальным является испытание двух уровней доз. Минимальная доза — близкая к рекомендуемой для клинических испытаний терапевтическая доза для данного вида животных (1 ТД), максимальная — на порядок выше рекомендуемой для клинических испытаний — субтоксическая доза для данного вида животных (10 ТД), не выходящая за интервал терапевтической широты действия лекарственного средства.

В случаях, когда реальная терапевтическая доза вещества не известна, для сенсibiliзации животных можно использовать дозы, последовательно на

порядок меньше, чем LD_{50} ($1/10$, $1/100$, $1/1000$ от LD_{50}) при соответствующем способе введения.

Эффект сенсibilизации оценивается как в реакциях *in vivo*, так и в тестах *in vitro*.

При постановке кожных проб рабочую дозу определяют на интактных животных. Разрешающей дозой считается та концентрация фармакологического средства или испытуемого препарата (тест-препарат), которая при внутрикожном введении на тестируемом участке кожи (для растворимых веществ) или нанесении в виде мази (для нерастворимых веществ) не вызывает кожно-раздражающего действия. Реактивность кожи выявляют введением растворителя в том же объеме, что и тест-препарат.

Для оценки свойств тест-препарата в тестах *in vitro* дозы подбирают в опытах с кровью интактных животных, используя несколько разведений аллергена. В этом случае добавление аллергена в рабочей дозе в кровь интактных животных не должно увеличивать спонтанного уровня повреждения клеток крови, в частности, лимфоцитов.

9.6 Экспериментальные животные

Исследования проводят на следующих видах лабораторных животных: морские свинки (масса тела 250—300 г), белые крысы популяции Wislar (масса тела 200—225 г), мыши линии Balb/c, C57Bl/6, CBA (масса тела 18—20 г). В некоторых случаях (в зависимости от задач эксперимента) возможно применение беспородных мышей и кроликов.

Наиболее чувствительным, в видовом отношении, животным является морская свинка. В опытах используются морские свинки-альбиносы или животные, имеющие достаточно большие участки белой кожи. Разброс в экспериментальных группах по исходной массе не должен превышать $\pm 10\%$. Чувствительность самцов и самок к одному и тому же препарату может быть неодинакова, поэтому желательно проведение эксперимента на животных обоих полов. Опыты проводят на молодых, здоровых и половозрелых животных.

Животные должны пройти карантин не менее 10—14 дней. В целях стандартизации перед опытом животных не кормят в течение суток. Животные должны получать стандартную диету, представленную в виде гранулированного корма (оптимальный вариант) или набора натуральных кормов. Число животных в каждой группе должно быть достаточным (не менее 10), чтобы оценить характер, частоту и степень проявления алергизирующих свойств и провести статистическую обработку экспериментальных данных. Вместе с тем при оценке сенсibilизирующего действия необходимо проводить описание индивидуальных реакций, даже если они статистически недостоверны.

Результаты экспериментов обрабатываются методами вариационной статистики по критерию Стьюдента,

9.7 Выявление развития сенсibilизации при различных путях поступления фармакологических средств в организм

Пути введения и способы применения фармакологического средства в эксперименте выбираются соответственно предполагаемым путям введения и способам его применения человеком. Для препаратов, используемых перорально, следует применять внутрижелудочный способ введения. Для некоторых препаратов (ингаляционные анестетики, мази, капли) целесообразно изучение аллергенных свойств в условиях предполагаемого применения (эпикутаный метод, конъюнктивальная проба, ингаляция аэрозоля).

Эпикутанная сенсibilизация

Наиболее разработанным является метод эпикутанной сенсibilизации (см. раздел 3.5). По этому методу получены многочисленные корреляции результатов на лабораторных животных и людях-добровольцах. Однако в каждом отдельном случае могут возникнуть трудности в определении оптимальной схемы эксперимента (число аппликаций, концентрация наносимого на кожу фармакологического средства и др.). Поэтому постановке опытов по эпикутанной сенсibilизации обязательно предшествует изучение раздражающего действия фармакологического средства.

Конъюнктивальная проба

Конъюнктивальная проба является очень чувствительным тестом и в ряде случаев позволяет выявить реакцию животных на аллерген при слабой аллергизации и отрицательных кожных тестах. При наличии хорошей растворимости фармакологического вещества постановка ее обязательна. Описание метода см. в разделе 3.6.

Ингаляционное введение фармакологического средства

Определение сенсibilизирующих свойств фармакологических средств, предназначенных для ингаляционного применения, осуществляется при распылении тест-препарата дозирующими баллончиками или ингаляторами непосредственно в носоглоточную полость на протяжении 4 нед по 5 раз в неделю. Тестирование проводят после 10 ингаляций, а также после месячного воздействия. Для этой цели наиболее адекватным является метод, позволяющий выявить влияние сенсibilизирующих свойств фармакологических средств на чувствительность гладких мышц трахеобронхиальной цепочки в эксперименте на морских свинках..

Пероральное введение фармакологических средств

Морским свинкам в ротовую полость вводят по 1—2 капли водного раствора тест-препарата или взвеси в 1 % крахмальном геле в течение 30 дней. Тестирование сенсibiliзирующих свойств проводят на 10, 15, 30-й дни от начала введения испытуемого препарата.

Для выявления сенсibiliзирующих свойств при данном способе введения фармакологического средства рекомендуется использовать реакции: торможения миграции макрофагов, непрямо́й дегрануляции тучных клеток, кожные пробы.

Методы выявления сенсibiliзации

Единого метода, с помощью которого можно зарегистрировать алергизирующее действие фармакологических средств, не существует. Отсюда следует, что система испытаний потенциальных лекарственных препаратов на алергенность должна включать в себя набор методов алергодиагностики *in vivo* и *in vitro*, из которого в каждом конкретном случае можно выбрать оптимальное сочетание тестов, позволяющих выявлять разные типы гиперчувствительности.

Из специфических методов оценки сенсibiliзирующих свойств фармакологических средств можно рекомендовать следующие технически простые и хорошо воспроизводимые.

I. Тесты in vivo

1. Оценка анафилактогенной активности в реакции общей анафилаксии

2. Кожные тесты:

- а) активная кожная анафилаксия;
- б) пассивная кожная анафилаксия;
- в) реакция гиперчувствительности "замедленного" типа на мышах или морских свинках;
- г) реакция иммунных комплексов;
- д) метод накожных аппликаций.

3. Конъюнктивальная проба.

II. Метод in situ

Метод оценки чувствительности гладких мышц трахеобронхиальной цепочки к исследуемым препаратам в эксперименте на морских свинках.

III. Тесты in vitro

- а) реакция непрямо́й дегрануляции тучных клеток;
- б) реакция торможения миграции макрофагов;
- в) псевдоаллергические реакции (тест Шор).

Возможности выявления сенсibiliзации не ограничиваются предложенными методиками, так как в настоящее время с целью обнаружения алергических свойств разработано и широко применяется множество других

методов исследований, в том числе тесты повреждения и альтерации нейтрофилов, реакция усиления пиронинофилии лейкоцитов, определение магния в сыворотке крови, колориметрический метод определения гистамина в крови и органах животных и т. д.

Следует отметить, что наиболее информативными являются методы, с помощью которых можно определить специфический для данного лекарственного вещества иммуноглобулин Е, патологическая роль которого доказана в развитии наиболее серьезных аллергических осложнений. Из диагностических методов *in vitro* наиболее чувствительными являются радиоиммуносорбентные и иммуноферментные методы. Наиболее оптимальный подбор тестов зависит от направленности фармакологического действия изучаемого препарата.

Выявлению сенсibilизации к фармакологическим средствам может способствовать также и оценка некоторых неспецифических показателей, таких как увеличение абсолютного числа или относительного количества эозинофилов и базофилов, концентрация в сыворотке крови биогенных аминов (гистамин, серотонин и др.), плазматизация и эозинофилия тканей и др. Исходя из длительной апробации перечисленных в этой главе методов в условиях экспериментальной оценки сенсibilизирующих свойств лекарств и учитывая удовлетворительную корреляцию данных аллергодиагностики, полученных в эксперименте, с результатами клинических испытаний на людях, можно рекомендовать их как основные в целях унификации исследования аллергозов и накопления экспериментальных данных.

Эти тесты доступны для серийных исследований. Результаты, полученные с их помощью, хорошо воспроизводимы.

Оценка анафилактической активности

Реакция общей анафилаксии (анафилактический шок)

Морским свинкам вводят исследуемый препарат в эффективной терапевтической дозе (1 группа) и в дозе, в 10 раз ее превышающей (2-я группа): первая инъекция подкожно, две последующие внутримышечно через день в область бедра. Разрешающая инъекция — внутрисердечно или внутривенно на 14—21-й дни после сенсibilизирующей инъекции. Разрешающая доза должна быть равна суммарной сенсibilизирующей дозе. Разрешающая инъекция на 14—21-й дни вводится и контрольной группе животных, которым вводили только растворитель. Учет интенсивности анафилактического шока — в индексах по Weigle [20j].

Активная кожная анафилаксия

При изучении активной кожной анафилаксии сенсibilизация та же, что и при изучении общей анафилактической реакции [17]. На 14—21-й дни на выстриженных участках спины морским свинкам внутривожно вводят

препарат в двукратных разведениях, в концентрациях, не вызывающих кожно-раздражающего действия. Через 20 мин морским свинкам вводят внутривенно по 0,5 мл 1 % раствора синего Эванса. Через 30 мин животных забивают эфиром и определяют размеры синего пятна на внутренней стороне кожи в месте введения препарата (при положительной реакции диаметр пятна не менее 6 мм). В данной серии опытов вводить препарат внутрикожно нужно микрошприцами, при правильном введении образуется так называемая лимонная корочка. Если на месте введения через некоторое время появляется кровь, то необходимо ввести препарат в другое место. Для контроля реактивности кожи обязательно вводить тому же животному на другом выстриженном участке 0,05 мл растворителя (стерильный изотонический раствор натрия хлорида). Для удобства прочтения реакции места введения можно обводить разноцветными фломастерами. Разрешающие инъекции препарата и синего Эванса вводят также контрольным животным, которым в дни сенсibilизации опытных групп вводили только растворитель. У таких животных в месте внутрикожного введения препарата диаметр окрашенного пятна не должен превышать 2—3 мм. Возможно воспроизведение активной кожной анафилаксии и на мышах.

Пассивная кожная анафилаксия

В случае положительной реакции активной кожной анафилаксии (АКА) проводят постановку реакции пассивной кожной анафилаксии (ПКА), во-первых, для идентификации гомоцитотропных антител, во-вторых, для определения их титра [5, 18]. Сенсibilизация подопытных животных осуществляется по той же схеме, что и для общей анафилактической реакции: сыворотку крови подопытного и контрольного животного (в нескольких разведениях) вводят внутрикожно интактной морской свинке-альбиносу. Через 24 ч внутривенно вводят смесь испытуемого препарата в дозе, установленной для реакции АКА, и 0,5 мл 1 % раствора синего Эванса. Через 15 мин учитывают реакцию. Титром антител считают наибольшее разведение, при котором возможно осуществление пассивного переноса. Титры T выражают в \log_2 разведения сыворотки. Большими преимуществами этого метода являются высокая специфичность и возможность получения четкой количественной характеристики процесса, что осуществимо при использовании красителя.

Реакция гиперчувствительности "замедленного" типа на мышах

Известно, что интенсивность реакций гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к химическим соединениям и их длительность зависят от сроков формирования и сочетанного действия различных субпопуляций Т-супрессоров, подавляющих ГЗТ. Поэтому при индукции ГЗТ путем введения мышам химических аллергенов в полном адьюванте Фрейнда (ПАФ), при котором не происходит формирования Т-супрессоров, возможно усиление

кожных аллергических реакций и выявление аллергенных свойств даже слабых химических аллергенов на нелинейных мышах массой 18—20 г. Мышей сенсибилизируют однократно путем внутрикожного введения в основание хвоста 60 мкл эмульсии препарата в ПАФ — дозы, эквивалентной 10 мМ раствору в ПАФ в соотношении 1:1. Для приготовления такой эмульсии используют раствор Хенкса с рН 7,5.

Для выявления сенсибилизации через 5 сут мышам в подушечку задней лапы вводят 40 мкл 10 мМ раствора тест-препарата в растворе Хенкса. Через 6—22—24 ч после тестирования измеряют величину отека с помощью инженерного микрометра МК-0-25. Разница в толщине обеих лапок характеризует величину отека, по которой можно судить об интенсивности реакции ГЗТ [12].

Контрольных животных сенсибилизируют эмульсией ПАФ с раствором Хенкса по той же схеме, что в опыте.

В каждой группе должно быть не менее 10 животных. В том случае, если тест-препарат становится аллергеном в процессе метаболизма, например пенициллин, тестирование проводят максимальной концентрацией вещества, эмульгированного в неполном адьюванте Фрейнда (НАФ). Учет реакции проводят через 48—72 ч.

ПАФ:

1 мл ланолина,
3 мл вазелинового масла,
5 мг убитой прогреванием вакцины БЦЖ,
50 мкл твина-20,
0,5 мл дистиллированной воды.

НАФ:

Те же самые компоненты, за исключением убитой прогреванием вакцины БЦЖ. В качестве метода выбора может быть использована реакция ГЗТ на морских свинках.

Контрольные вопросы:

1. Общие положения по изучению алергизирующих свойств фармакологических веществ. Условия проведения эксперимента.
2. Характеристика исследуемого на алергенность фармакологического средства и экспериментальных животных.
3. Эпикутанная сенсибилизация.
4. Конъюнктивальная проба.
5. Реакция гиперчувствительности «замедленного» типа на мышах.
6. Оценка анафилактической активности.
7. Метод накожных аппликаций.

Список литературы

1. Уша, Б.В. Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8

2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 10

Исследования мутагенных свойств фармакологических веществ

Изучение генетической активности лекарственных средств требует профессиональной подготовки.

Данные методические рекомендации описывают комплексную систему проверки генетической активности новых лекарственных средств, но не являются пособием для освоения методов. Последние в должном объеме можно освоить только в результате стажировки в лабораториях соответствующего профиля.

10.1 Принципы отбора фармакологических средств для испытания на мутагенную активность

Тестированию на мутагенную активность подвергаются новые оригинальные фармакологические средства, созданные химическими, биотехнологическими, генно-инженерными и иными способами, включая полученные из сырья природного происхождения. Новые фиксированные комбинации фармакологических средств, планируемые для широкого клинического применения, при структурном сходстве компонентов комбинации с известными канцерогенами, мутагенами или их метаболитами также подвергаются испытанию. Для анализа структурного сходства используются, во-первых, представительная база данных о мутагенных свойствах широкого круга химических соединений и, во-вторых, специальные компьютерные программы [12, 14].

10.2 Пути введения фармакологического средства, выбор доз, объекты исследования

Пути введения исследуемого фармакологического средства должны соответствовать планируемому способу приема лекарства человеком.

Если предполагается возможность энтерального и парентерального введения, можно использовать внутрибрюшинный, подкожный или внутримышечный способы введения. Фармакологические средства перорального применения изучают при внутрижелудочном пути введения. Изучение мутагенной активности ингаляционных анестетиков, мазей и т. п. проводят в условиях предполагаемого применения (ингаляционное, накожное) и при парентеральном введении.

Исследуемые фармакологические средства растворяют в дистиллированной воде или изотоническом растворе натрия хлорида. Водонерастворимые препараты вводят с Твином-80 или используют растворители (этиловый спирт, диметилсульфоксид в конечной концентрации до 5 %); для перорального введения порошкообразных лекарств можно использовать растительное масло или 1 % водный раствор крахмала.

Оптимальный объем вводимых растворов фармакологических средств и соответствующих растворителей (для контрольных групп животных) должен составлять при пероральном и внутрибрюшинном способах введения не более 0,5 мл и при внутримышечном — не более 0,2 мл.

10.3 Проведение эксперимента

В первой серии испытуемый препарат в дозе, соответствующей суточной терапевтической для человека, и в субтоксической дозе вводят однократно только самцам с фиксацией клеточного материала через 24 ч после введения. Во второй серии испытуемый препарат в дозе, соответствующей суточной терапевтической для человека, вводят самцам и самкам ежедневно на протяжении 4—5 сут. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и/или 24 ч после последнего введения в зависимости от фармакокинетических особенностей испытуемого препарата [10].

К о н т р о л и

В качестве позитивных контролей целесообразно использовать циклофосфамид в дозе 20 мг/кг при однократном внутрибрюшинном введении или любой другой известный агент, заведомо обладающий цитогенетической активностью.

Негативным контролем является используемый растворитель.

Приготовление цитогенетических препаратов

Методика выделения клеток костного мозга и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и ранее опубликованных методических рекомендациях [7, 10]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

Микроскопический анализ

Анализируют 100 метафаз от каждого животного. Анализу подвергаются округлые метафазные пластинки без наложений хромосом с модальным числом 40 — для мышей, 42 — для крыс. Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов) и разрывов по центромере, число клеток с множественными повреждениями и клеток с полной деструкцией хромосом.

10.4 Оценка результатов

Оценку результатов цитогенетического анализа проводят путем сопоставления долей клеток с хромосомными абберациями в контрольной и опытных сериях эксперимента. Сравнение долей клеток с гепами и разры-

вами по центромере следует рассматривать в качестве дополнительных критериев цитогенетической активности исследуемого препарата.

Статистическую обработку проводят согласно общепринятым рекомендациям

Результаты документируются согласно табл. 1.

Доказательством цитогенетической активности исследуемого препарата.

Контрольные вопросы:

1. Как определить мутагенное действие лекарственных веществ
2. Методы тестирования мутагенности фармакологических средств.
3. Тест Эймса.
4. Учет микроядер в клетках млекопитающих.
5. Учет рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций у дрозофилы.
6. Учет соматической рекомбинации у дрозофилы.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 11

Исследования канцерогенных свойств фармакологических веществ и лекарственных средств

11. 1 Принципы отбора ЛС для исследования

Оценка канцерогенной опасности для человека необходима для всех Л С. При этом следует исходить из положения, что Л С подразделяются на:

- принципиально новые, не имеющие химических аналогов;
- вновь синтезируемые в известном химическом ряду;
- воспроизводимые.

Подходы к решению вопроса о тестировании на канцерогенность этих групп ЛС должны быть разные. Однако во всех случаях на ранних стадиях доклинического изучения ЛС необходимо: изучение имеющихся литературных данных (ссылки), оценка предполагаемого способа применения Л С в клинике, сведения о его физико-химических свойствах и составе рекомендуемой лекарственной формы, анализ другой информации. При этом учитываются положения, изложенные ниже в п.п. 1.1, 1.2, 1.3, 1.4.

Результаты изучения излагаются в экспертном заключении, в котором высказывается мнение о необходимости тестирования ЛС на канцерогенность или отсутствие таковой, определяются сроки проведения тестирования в общей программе создания нового ЛС.

При решении вопроса о тестировании ЛС на канцерогенность в хроническом эксперименте необходимо исходить из следующих положений:

1.1. Обязательному тестированию на канцерогенность должны подвергаться вновь синтезируемые ЛС, рекомендуемые:

- в качестве профилактических, лечебно-косметических, репеллентных средств и контрацептивов;
- для применения в течение всей жизни длительными (более 15 дней) повторными курсами;
- для использования без назначения врача среди широких слоев населения;
- для применения в детской практике, а также для лечения беременных женщин и в период лактации.

1.2. Кроме этого, критериями для изучения Л С на канцерогенность могут служить:

- наличие клинико-эпидемиологических данных, указывающих на канцерогенный риск при применении в лечебной практике аналогов;
- наличие цитостатических, алкилирующих, гормоноподобных, рост-стимулирующих свойств;
- данные о положительных реакциях в краткосрочных тестах на мутагенность или способность к ковалентному связыванию с ДНК;
- наличие ограниченных сведений о канцерогенности ЛС или его аналогов для экспериментальных животных в ранее проведенных исследованиях.

1.3. ЛС, вопрос об испытании которых рассматривается в каждом отдельном случае:

- предназначенные для лечения злокачественных новообразований;
- применяемые однократно или краткосрочными неповторяющимися курсами (до 14 дней).

1.4. Тестирование на канцерогенность не обязательно для ЛС, предлагаемых:

- для лечения заболеваний, представляющих непосредственную угрозу для жизни;
- воспроизводимых зарубежных ЛС, если в литературе имеются достаточно обоснованные сведения экспериментального и ретроспективного характера, подтверждающие отсутствие канцерогенных свойств соответствующего аналога.

11. 2 Характеристика ЛС

Физико-химические свойства исследуемого на канцерогенность ЛС и состав готовых лекарственных форм должны соответствовать проектам временных фармакопейных статей на индивидуальное фармакологическое вещество и готовые лекарственные формы.

Оценке подлежит действующее вещество (вещества). Если лекарственная форма содержит вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители, наполнители и т. д.), не имеющие разрешения для применения в медицинской практике, то каждое из них оценивается отдельно. Если ЛС изучено на канцерогенность ранее, то при разработке новой лекарственной формы или при изменении состава вспомогательных веществ уже изученной лекарственной формы необходимо провести экспертизу новой комбинации.

11.3 Экспериментальные животные

При планировании хронического эксперимента на животных рекомендуется исходить из условий, обеспечивающих максимальное проявление канцерогенных свойств испытуемого агента с использованием животных обоего пола. Допустимы отклонения от этой схемы в зависимости от способа применения ЛС в клинике и особенностей его фармако- и токсико-кинетики в организме.

При тестировании на канцерогенность, как правило, используются мыши и крысы. Это могут быть как инбредные, так и неинбредные животные, характеризующиеся сравнительно низкой вариабельностью в частоте спонтанных опухолей. Испытания рекомендуется начинать на молодых (6—8 нед) животных или, при возможности, сразу после того, как они отняты от матери. В исключительных случаях могут быть использованы другие виды животных — хомячки, кролики, собаки, обезьяны. Но при этом необходимо, чтобы одним из двух видов, на которых тестируются ЛС, были крысы или мыши. Так, при оценке гормональных препаратов (например, контрацептивов) тестирование канцерогенности рекомендуется проводить

также на крупных животных — собаках или обезьянах. При этом период наблюдения увеличивается до 7—10 лет. (В этом случае в Фармакологический комитет каждые 2 года представляются этапные промежуточные отчеты о состоянии подопытных животных.)

Условия содержания и рационы питания животных должны находиться в соответствии с общепринятыми в нашей стране рекомендациями.

Контрольные и подопытные животные должны быть одного возраста, получены одновременно из одного питомника. Наличие контрольных групп является обязательным во всех случаях, в том числе при работе на животных с хорошо известной онкологической характеристикой, поскольку частота и спектр спонтанных опухолей могут с течением времени меняться даже у высокоинбредных линий. В каждую подопытную группу следует брать не менее 50 животных каждого пола. Таким образом, на испытание одного вещества при одном пути введения и двух дозах требуется не менее 600 животных (200 мышей и 200 крыс в подопытных группах и 200 животных в контроле).

11.4 Исследуемые дозы

Для изучения канцерогенности ЛС, как правило, используются две дозы.

При выборе дозы ЛС исходят из предпосылки, что наиболее выраженный канцерогенный эффект проявится при использовании максимально переносимой дозы (МПД). В соответствии с международными требованиями, МПД определяют как максимальную дозу, не приводящую к гибели животного от токсического действия и вызывающую в субхроническом эксперименте торможение нарастания массы тела не более чем на 10 % по сравнению с контролем. Наряду с МПД необходимо использовать терапевтическую дозу для человека. Для нетоксичных соединений целесообразно изучить терапевтическую и 10-кратную терапевтическую дозы. Решение о выборе дозы специально обосновывается в протоколе исследования. Определение МПД проводится на каждом виде животных обоего пола, при каждом методе введения.

Определение МПД включает два этапа. На первом этапе проводят исследования токсичности вещества в остром опыте с целью определения ЛД₅₀ и ЛД₆ по методу Литчфилда и Уилкоксона. За динамикой гибели животных ведут наблюдение в течение 14 дней.

На втором этапе определяется МПД в субхроническом опыте. Этот опыт желательно проводить на 6—8-недельных животных обоего пола (при каждом методе введения и на каждом виде животных). В экспериментальную группу входят минимум 3 самца и 3 самки одинаковой массы, 5 групп подопытных животных получают тестируемый препарат в разных дозах, 6-я группа — контрольная. Максимальная доза находится на уровне ЛД₁₆, определенной в остром опыте. Следующие 4 группы получают более низкие дозы, каждая из которых в 1,5 раза ниже предыдущей. В этом режиме вещество вводят подопытным животным в течение 6—8 нед и затем 2 нед

наблюдают за их состоянием. Контрольным животным вводят растворитель. Критериями токсического действия вещества в субхроническом опыте являются гибель животных или торможение нарастания массы тела. Поэтому при проведении опыта следует строго следить за стандартностью корма животных, который должен быть таким же, как в планируемом хроническом исследовании на канцерогенность. Взвешивание животных проводят 1 раз в неделю.

Увеличивать МПД в ходе хронического опыта нельзя.

11.5 Продолжительность опыта

Испытуемое ЛС вводится мышам 18 мес, крысам 24 мес, выживаемость должна составлять не менее 50 %. Забой животных возможен сразу после последнего введения. Наблюдение за животными осуществляется до конца опыта или до гибели животных.

Пути и методы введения

При изучении канцерогенности ЛС, как правило, используются два пути введения.

Выбор метода введения Л С зависит от его физико-химических свойств (агрегатного состояния, растворимости), его фармакокинетики и способа применения.

Желательно, чтобы метод введения ЛС в опытах на животных был максимально приближен к используемому в клинике; в случае нескольких способов применения Л С в клинике тестирование проводится при использовании не менее двух путей введения вещества. Во всех случаях рекомендуется одним из путей введения использовать внутрижелудочный. В тех случаях, когда ЛС используется только внутрижелудочно, достаточно ограничиться одним путем введения.

. Пероральный путь

Частота введения испытуемого вещества должна, по возможности, быть согласована с частотой введения ЛС больным. Однако ежедневное введение, за исключением введения с кормом или питьевой водой, трудновыполнимо. Зондом целесообразно вводить вещество через день. Введение ЛС через желудочный зонд позволяет проводить более точную его дозировку.

В качестве растворителя Л С используют вещества, не оказывающие раздражающего действия, такие как изотонический раствор натрия хлорида, вода, пастеризованное оливковое или подсолнечное масло (необходимо контролировать суточный рацион жиров). Если вещество не растворяется в воде, то готовят взвеси в жидком крахмале, карбоксиметилцеллюлозе. Объем вводимой жидкости не должен превышать для мышей 0,5 мл, для крыс — 2 мл.

Зонд изготавливается из толстой иглы для инъекции. Острие иглы срезается и ее конец сгибается под углом 30 градусов. Во избежание травмы слизистой

оболочки пищевода на отпиленный конец напаяется небольшая олива.
Парентеральные пути введения

При парентеральном пути введения ЛС животным необходимо подобрать щадящий режим. Частота введения при данном способе может зависеть от физико-химических свойств ЛС, а также опасности механических повреждений. Оптимальным вариантом, очевидно, является введение 1—2 раза в неделю.

ЛС инъецируют в виде растворов и суспензии в воде, крахмале, растительном масле, глицерине.

Объем жидкости при подкожном введении в опыте на крысах не должен превышать 1,0 мл, на мышах — 0,2 мл.

При внутримышечном введении крысам вводят до 0,5 мл жидкости, мышам — не более 0,2 мл. Внутривенно крысам можно вводить до 2 мл, мышам — не более 0,5 мл.

. Смазывание кожи

Одним из путей тестирования ЛС, применяемых в клинической практике в виде аппликаций на кожу и слизистые оболочки, является смазывание кожи. Для этих целей рекомендуется использовать мышей гибридов первого поколения (C57B1 X CBA), а также C57B1, CBA. Возможно использование и неинбредных мышей. Помимо мышей, эксперименты со смазыванием кожи можно проводить и на кроликах. На крысах такие опыты проводить не следует вследствие резистентности их кожи к индукции опухолей.

Смазывание кожи следует проводить 2—3 раза в неделю. Исследуемое вещество наносится микропипеткой или пипеткой на кожу межлопаточной области (кроликам — на кожу уха). Дозу вещества рассчитывают, исходя из массы капли и числа капель в 1 мл раствора. Волосы на месте нанесения предварительно выстригают. В ходе опыта по мере отрастания шерсти проводится повторная стрижка.

Внутритрахеальное и внутрибронхиальное введение

Данные способы можно использовать в случаях, когда ингаляция является основным способом введения ЛС в организм человека. Опыты можно проводить на крысах и хомячках. Спонтанные опухоли легких у крыс и хомячков редки. Воспалительные заболевания легочной ткани крыс способны затруднить проведение хронического эксперимента. При проведении опытов на мышах (особенно линии A,BA1B/C, C57B1) следует принимать во внимание возможность появления спонтанных опухолей легких, главным образом аденом, и учитывать их при оценке результатов опытов по тестированию на канцерогенность. Инсталляцию ЛС в легкие можно проводить в виде водных растворов, суспензий, твердых и жидких аэрозолей.

Во всех случаях необходима постановка соответствующих контрольных экспериментов. Вещества следует вводить 1—2 раза в месяц по 0,2—0,5 мл крысам и хомячкам, 0,05—0,1 мл — мышам. Использование ингаляционных

камер возможно только при систематическом объективном контроле концентраций ЛС.

Трансплацентарный метод воздействия

Трансплацентарный метод воздействия ЛС можно использовать, если препарат предполагается к применению для лечения беременных женщин. Испытуемое вещество вводится беременным самкам, начиная со 2—15-го

дня беременности, введение продолжается кормящим самкам на протяжении периода лактации.

11.6 Протоколы эксперимента

На каждое испытуемое ЛС заводится рабочая тетрадь, в которой указываются фамилия экспериментатора, название лаборатории, учреждения и подробные сведения о препарате. Регистрируются также данные о животных и условиях их содержания, сведения о введении испытуемого вещества, в том числе времени суток, и материалы наблюдения за животными.

Взвешивание проводят перед первым введением испытуемого вещества, еженедельно в течение первого месяца, один раз в 2 нед в течение второго месяца, затем ежемесячно и перед вскрытием. Все животные (экспериментальные и контрольные) подвергаются ежедневному осмотру.

11.7 Вскрытие животных и гистологическое исследование

Все павшие или забитые животные должны подвергнуться патологоанатомическому исследованию. Забой животных в ходе опыта производят лишь в тех случаях, когда, по мнению экспериментаторов, подопытное животное не проживет более одних суток. Следует предостеречь против излишнего забоя животных, что может привести к искусственному сокращению продолжительности эксперимента. На каждое павшее (забитое) животное заводят протокол вскрытия.

Полное вскрытие включает взвешивание животных, тщательное наружное исследование и оценку степени разложения. Все органы, независимо от наличия в них видимых макроскопических изменений, фиксируются в 10 % растворе формалина. Для гистологического исследования берут кусочки органов и опухолей. Парные органы на исследование берутся оба. При подозрении на лейкоз (увеличенные печень, селезенка, лимфатические узлы) на исследование берут костный мозг (бедренная кость). Архивный материал (фиксированные органы, блоки, гистологические стекла) должны храниться не менее 3 лет после представления отчета по результатам испытания. Морфологическое изучение должно проводиться специалистом-патологоанатомом, который обладает знаниями в области патологии экспериментальных животных.

11.8 Оценка результатов исследования

Результаты гистологического исследования по всему опыту суммируются в таблице, кроме того, составляются таблицы по выживаемости до забоя и

времени возникновения наружных опухолей и гибели животных с опухолями внутренних органов. При необходимости составляются дополнительные таблицы: например, количество опухолей кожи на одно животное при накожном нанесении, количество аденом легких на одно животное и т. д.

Контрольные вопросы:

1. Как определить канцерогенное свойство лекарственных веществ.
2. Принципы отбора ЛС для исследования на канцерогенность.
3. Какие животные используются при изучении канцерогенных свойств лекарственных препаратов.
4. Что такое максимально переносимая доза?
5. Продолжительность опыта при изучении канцерогенных свойств фармакологических веществ.
6. Пути и методы введения.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 12

Методы доклинического исследования эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний центральной и периферической нервной системы

12.1 Антипсихотические средства (син.: нейролептические средства, нейролептики) представляют собой основную группу психотропных веществ, применяемых для лечения психозов эндогенного и экзогенного происхождения. Уникальным свойством веществ этой группы является наличие антипсихотического действия, т. е. способности устранять бред и галлюцинации.

В настоящее время в группу нейролептиков входят вещества, различающиеся по химическому строению, влиянию на психопатологическую симптоматику и своим побочным эффектам. Несмотря на большое количество существующих препаратов, нейролептики в многих случаях оказываются недостаточно эффективными или вызывают нежелательные побочные эффекты. В связи с этим изыскание новых эффективных избирательно действующих антипсихотических средств остается актуальной задачей современной фармакологии.

Основные принципы и методы скрининга нейролептиков сложились на основе изучения фармакологических свойств так называемых типичных нейролептиков, производных фенотиазина и бутирофенона. Представители этой группы наряду с антипсихотическим эффектом вызывают характерные экстрапирамидные расстройства и ряд других побочных эффектов, к которым относятся, в частности, агранулоцитоз и пролактинемия. Как показывают исследования, поведенческие эффекты нейролептиков связаны, главным образом, с блокадой дофаминовых рецепторов мозга. Нейролептики данной группы в той или иной степени влияют на активность и других нейромедиаторных систем: адренергической, серотонинергической, холинергической.

Несмотря на то что классические (типичные) нейролептики (аминазин, галоперидол и их аналоги) до настоящего времени широко применяются в

клинической психофармакологии, наибольший интерес представляют препараты нового поколения, получившие название атипичных нейролептиков. К ним относятся вещества разного химического строения: дибензазе-пины (клозапин и его аналоги), бензамиды (сульпирид), производные гам-макарболина (карбидин) и некоторые другие. Основным отличием препаратов этой группы является отсутствие или малая выраженность экстрапирамидных расстройств. Особенность механизма действия атипичных нейролептиков определяется избирательным угнетением мезолимбической и мезокортикальной дофаминергических систем мозга при меньшей степени воздействия на нигростриатную систему. Некоторые представители нового

поколения нейролептиков оказывают также угнетающее влияние на серотонинергические системы мозга.

Стратегия поиска антипсихотических веществ строится на ряде основных положений, к которым относятся следующие:

- а) дофаминергическая гипотеза шизофрении предполагает, что в основе антипсихотического эффекта нейролептиков лежит их способность оказывать центральное дофаминергическое действие;
- б) функциональная неоднородность дофаминергических систем мозга (связь nigrostriatной системы с контролем моторных функций, с одной стороны, участие мезолимбической и мезокортикальной систем в опосредовании высших интегративных функций мозга и эмоциональной сферы — с другой);
- в) молекулярная, функциональная и фармакологическая гетерогенность рецепторов основных нейромедиаторных систем мозга, вовлеченных в механизмы действия психотропных веществ (дофаминовые, серотониновые, гистаминовые, ГАМК, глутаматные и другие рецепторы);
- г) моделирование структуры активного центра рецептора и компьютерный дизайн соединений, обладающих высоким сродством к последнему.

Исходя из вышесказанного, принципиальной задачей современной психофармакологии представляется создание избирательных антагонистов дофаминовых/серотониновых рецепторов, обладающих преимущественным действием на мезолимбические и мезокортикальные структуры мозга. Частной задачей является поиск избирательно действующих агонистов/антагонистов пресинаптических рецепторов дофамина и серотонина, ответственных за регуляцию дофамин(серотонин)ергической нейротрансмиссии.

Методология поиска веществ с атипичным профилем нейролептической активности строится на применении экспериментальных методов скрининга *in vitro* и *in vivo*. Это, в первую очередь, методика рад и ол и га н дно го связывания, широкий круг поведенческих методик, биохимические методы оценки состояния нейромедиаторных систем мозга, некоторые специальные методы исследования, в частности нейроэндокринологические.

Идеология и экспериментальные подходы, изложенные выше, легли в основу настоящих методических рекомендаций. При подготовке данной работы частично использованы материалы методических рекомендаций, одобренных Фармкомитетом 28.08.1988 г. С появлением атипичных нейролептиков методология скрининга новых соединений с предполагаемой антипсихотической активностью претерпела существенные изменения.

В экспериментах на животных атипичные нейролептики не вызывают каталепсии и не угнетают стереотипии, вызываемые апоморфином и фенамином. Напротив, сульпирид, клозапин и карбидин способны потенцировать стереотипное поведение. Как показывают исследования, "атипичность" действия этих веществ связана с особенностями их влияния на нейромедиаторные системы мозга. Установлено, что некоторые атипичные

нейролептики избирательно блокируют пресинаптические дофаминовые рецепторы в лимбической системе, другие оказывают м-холиноблокирую-

щее или серотониноблокирующее действие. В связи с этим в настоящее время наряду с тестами, традиционно используемыми для скрининга нейрорептиков, необходимо использовать тесты, позволяющие предсказать нейрорептическую активность у веществ с атипичным действием.

В отличие от типичных нейрорептиков, длительное применение препаратов указанной группы не сопровождается увеличением концентрации пролактина в крови больных. В связи со сказанным в настоящие методические рекомендации включены тесты, позволяющие выявить вещества с атипичным действием. Благодаря широкому развитию методов радиолигандного связывания в настоящее время стало возможным применять их и для скрининга новых соединений. В ряде случаев они с успехом заменяют поведенческие методы скрининга, но отличаются от последних большей производительностью и экономичностью. Использование этих методов является в настоящее время обязательным. Кроме того, в методических рекомендациях дается описание некоторых поведенческих и биохимических методов, рекомендуемых для более полного изучения отдельных сторон действия нейрорептиков, оценки вероятности возникновения экстрапирамидных эффектов, а также для исследования механизма действия нейроэндокринных антипсихотических веществ. Некоторые из этих методов достаточно трудоемки, требуют специального оборудования, в связи с чем могут рассматриваться в качестве дополнительных.

Контрольные вопросы:

1. Изучение снотворной активности фармакологических веществ
2. Изучение антидепрессантной активности лекарственных веществ
3. Изучение препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени.
4. Изучение транквилизирующего действия фармакологических веществ.
5. Изучение противосудорожной активности фармакологических веществ.
6. Изучение местно анестезирующей активности фармакологических веществ.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8

5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.: КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 13

Методы доклинического исследования эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний сердечно - сосудистой системы

Сердечная недостаточность — тяжелое распространенное заболевание, характеризующееся неспособностью сердца обеспечить адекватное кровоснабжение организма и, тем самым, реализовать его метаболические потребности.

В основе этого патологического процесса лежит недостаточное кровоснабжение органов и тканей организма, приводящее к уменьшению доставки к ним кислорода и других субстратов, необходимых для нормального функционирования. Это связано с низким сердечным выбросом и нарушением компенсаторной способности миокарда (систолическая сердечная недостаточность), застоем крови в легких, сердечных венах, а также замедлением элиминации продуктов метаболизма (диастолическая сердечная недостаточность). "Насосная" недостаточность сердца приводит к формированию в организме ряда компенсаторных механизмов, играющих важную роль в патогенезе недостаточности кровообращения. Среди них на первое место выходят такие, как:

- увеличение объема (дилатация) и массы миокарда левого желудочка сердца;
- повышение общего периферического сопротивления вследствие повышения тонуса симпатической нервной системы и увеличения в плазме крови концентрации катехоламинов;
- активация ренин-ангиотензиновой системы и, как следствие этого, задержка натрия и воды в организме.

В настоящее время базисная фармакотерапия сердечной недостаточности направлена на коррекцию основных патофизиологических нарушений, лежащих в основе ее развития:

- восстановление или усиление сниженной насосной функции сердца;
- устранение несоответствия между инотропной функцией сердца и состоянием периферического сосудистого русла, т. е. восстановление физиологического соответствия между пред- и постнагрузкой на миокард;
- удаление из организма избыточного количества внеклеточной жидкости и стабилизация на физиологическом уровне электролитного баланса организма;
- восстановление или улучшение метаболических процессов, протекающих как в самой сердечной мышце, так и в органах-мишенях (печень, почки, легкие, надпочечники и т. д.).

Для реализации этих задач в арсенале современных кардиологов имеется большое количество разнообразных лекарственных средств: ингибиторы АПФ, периферические вазодилататоры, диуретики, однако, несомненно, главенствующая роль в терапии как острой, так и хронической сердечной

недостаточности принадлежит кардиотоническим лекарственным средствам — препаратам, оказывающим положительное инотропное влияние на миокард.

КЛАССИФИКАЦИЯ КАРДИОТОНИЧЕСКИХ СРЕДСТВ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ ДЕЙСТВИЯ

Исторически кардиотонические лекарственные средства, применяемые в клинике для лечения сердечной недостаточности, делятся на две большие группы:

I. Гликозидные, или стероидные, кардиотоники

Стероидные кардиотоники по своим физико-химическим свойствам делятся на полярные — гидрофильные (например, строфантин) и неполярные — липофильные (например, дигоксин, дигитоксин) сердечные глико-зиды. Кроме того, их можно разделить на природные (например, дигоксин), природные модифицированные (например, метилдигоксин) и комбинированные препараты (например, кардиовален).

II. Нестероидные, или негликозидные, кардиотоники

A. Рецепторного типа действия

1. Лекарственные средства, преимущественно стимулирующие (3,-адренореактивные рецепторы сердца:

— арилалкиламины (например, дофамин, добутамин);

— производные дибензоксипина (например, ВМ 10 188);

2. Лекарственные средства, влияющие на специфические неадренергические рецепторные образования сердца и реализующие свои эффекты через активацию цАМФ-зависимых механизмов мембранного транспорта ионов Ca^{++} :

— полипептиды (например, глюкагон).

Б. Нерепепторного типа действия 1. Лекарственные средства, преимущественно блокирующие фосфоди-эстеразу:

— хиназопинпиперидины и фталазинпиперидины (например, буквине-ран, карбазеран);

— производные изохинолина (например, пиперазинилхинолины — ОРС-8212);

— ксантины (например, теofilлин).

2. Лекарственные средства, преимущественно стимулирующие аденилатциклазу:

— лекарственные препараты растительного происхождения, выделенные из растения *Coleus forskohli* (например, форсколин).

3. Лекарственные средства, преимущественно влияющие на внутриклеточный обмен Ca^{++} в кардиомиоцитах:

— пиридины и бипиридины (например, амрион, милрион);

- производные имидазола, бензимидазола, имидазопиразина (например, сульмазол);
- ионофоры ионов Ca^{++} (например, карбоксильные антибиотики);
- агонисты ионов Ca^{++} — активаторы медленных кальциевых каналов (например, производные дигидропиридина — Вау-К-8644).

В. Лекарственные средства, реализующие свой кардиотонический эффект как через рецепторные, так и нерепепторные механизмы (например, репротерол)

Помимо лекарственных средств, обладающих истинной кардиотонической активностью, для лечения сердечной недостаточности применяют достаточно большое количество препаратов, влияние которых на сократительную активность сердечной мышцы является опосредованным через их основные фармакологические эффекты (уменьшение пред- и/или постнагрузки на сердце, вазодилатация, улучшение коронарного кровотока и т. д.). К этим лекарственным средствам можно отнести периферические вазодилататоры, ингибиторы АПФ, α -адреноблокаторы, диуретики, естественные метаболиты и др. Однако следует подчеркнуть, что некоторые естественные метаболиты (например, ss -карнитин, таурин) могут быть отнесены к истинным кардиотоническим средствам.

В настоящее время не вызывает сомнения тот факт, что положительный инотропный эффект различных групп истинных кардиотонических средств связан с их способностью при помощи различных механизмов увеличивать концентрацию свободных ионов кальция в цитоплазме кардиомиоцитов. Кроме того, важную роль в реализации кардиотонического действия препарата может играть повышение сродства сократительных белков кардиомиоцитов к ионам Ca^{++} .

Известны, как минимум, четыре основных пути увеличения концентрации свободных ионов Ca^{++} в цитоплазме кардиомиоцитов.

Первый путь. Этот путь увеличения концентрации в цитоплазме свободных ионов Ca^{++} связан с наличием в мембране кардиомиоцитов $\text{Na}^+/\text{Ca}^{++}$ обменника: увеличение в цитоплазме содержания свободных ионов Na^+ приводит к переносу ионов Ca^{++} из внеклеточной жидкости в цитоплазму в обмен на ионы Na^+ . Другими словами, вызываемое любым путем увеличение концентрации в клетке свободных ионов Na^+ (см. ниже) неизбежно приводит к последующему увеличению концентрации в цитоплазме ионов Ca^{++} и, как следствие этого, реализации положительного инотропного эффекта, выражающегося в укорочении "предвыбросного" периода, удлинении времени выброса (т. е. сокращение становится более эффективным) и увеличении ударного объема сердца. Повышение концентрации Na^+ может происходить следующими путями:

- ингибирование Na^+/K^+ -АТФазы (таким образом действуют сердечные гликозиды): Na^+/K^+ -АТФаза катализирует АТФ-зависимый транспорт ионов Na^+ и K^+ через плазматические мембраны животных клеток. На каждую молекулу гидролизованного АТФ из клетки выводится 3 иона Na^+ и поступает 2 иона K^+ . Фермент является электрогенным насосом, генери-

рующим трансмембранный потенциал. Он состоит из 2 субъединиц: α (115 кД) — каталитическая и β (55 кД) — гликопротеин, — и существует в виде $\alpha\beta$ или $(\alpha-\beta)_2$, α -субъединица аналогична кальциевой АТФазе;

— блокадой трансмембранных K^+ каналов. В этом случае ионы K^+ не выходят из цитоплазмы, вследствие чего концентрация внеклеточного K^+ уменьшается. Это влечет за собой снижение активности $K^+ATPase$ -АТФазы (эффект аналогичен действию сердечных гликозидов), в результате чего в кардиомиоцитах накапливаются ионы Na^+ . Неизменная при этом активность быстрых Na^+ каналов также способствует накоплению ионов Na^+ в клетке;

— активацией быстрых Na^+ каналов;

— увеличением концентрации свободных ионов Na^+ посредством активации Na^+/H^+ обменника. Известно, что Na^+/H^+ обменник активируется при стимуляции саркоплазматического ретикулума. Агонисты специфических рецепторов мембран кардиомиоцитов, стимулируя фосфолипазу С через систему G-белков и стимуляцию рецепторов (например, глюкагоном), могут активировать саркоплазматический ретикулум и, тем самым, стимулировать Na^+/H^+ обмен, что реализуется в усилении сократительной активности миокарда.

Второй путь связан с увеличением входа (потока) ионов Ca^{2+} из внеклеточной жидкости в цитоплазму через медленные потенциалзависимые кальциевые каналы. Медленные кальциевые каналы активируются агонистами и/или при фосфорилировании Ca^{2+} каналов различными протеинкиназами (цАМФ-зависимая протеинкиназа С; Ca^{2+} и диацилглицеринзависимая протеинкиназа С; Ca^{2+} -кальмодулинзависимая протеинкиназа и др.). Влияние протеинкиназ на функциональную активность кардиомиоцитов реализуется при помощи различных вторичных мессенджеров — внутриклеточных "посредников" (цАМФ, диацилглицерин, Ca^{2+} и др.). Концентрация вторичных мессенджеров в цитоплазме изменяется при воздействии на клетку внешних стимулов (первичных мессенджеров — медиаторов, гормонов, агонистов и т. д.).

Передача сигнала от первичных мессенджеров вторичным осуществляется по универсальному принципу: первичные мессенджеры или внеклеточные лиганды активируют специфические сарколеммальные рецепторы, которые, в свою очередь, через систему G-белков передают сигналы на эффекторные ферменты, ответственные за генерацию вторичных мессенджеров. Вследствие этого, как уже говорилось выше, активируются соответствующие протеинкиназы, которые катализируют перенос фосфатных групп с молекул АТФ на белки-мишени, в частности белки Ca^{2+} -зависимых каналов, тем самым переводя их в активное состояние.

Контрольные вопросы:

1. Изучение кардиотонической активности фармакологических веществ
2. Изучение противоишемического действия фармакологических веществ
3. Изучение фармакологических веществ влияющих на гомеостаз.

4. Изучение антиаритмической активности фармакологических средств.
5. Изучение гипотензивной активности фармакологических средств.
6. Изучение гиполипидемического действия фармакологических веществ.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 14

Методы доклинического исследования эффективности лекарственных средств предназначенных для лечения заболевания систем органов дыхания

Кашель, как известно, является наиболее распространенным респираторным симптомом. В норме кашель является защитным механизмом и служит для очищения дыхательных путей от секрета, избыточно накапливающегося в крупных бронхах и трахее, инородных тел и ирри-тантов.

Кашель инициируется химической и механической стимуляцией рецепторов носа, пищевода, гортани, трахеи, крупных бронхов, а также плевры, перикарда и диафрагмы. Среди провоцирующих кашель агентов важнейшими являются курение, воздушные поллютанты (диоксид азота, диоксид серы, озон и др.). Стимул проводится через афферентные волокна п. *vagus* к "кашлевому центру", расположенному в стволе головного мозга. Рефлекторная дуга замыкается эфферентными волокнами п. *vagus* и спинальных нервов С2 и С3, идущих к мышцам диафрагмы, грудной клетки и живота. Кашель возникает при сокращении этих мышц с последующим внезапным открытием голосовой щели.

Патологические состояния дыхательных путей, основным симптомом которых является кашель, хорошо известны. К ним относятся:

1. Обструктивные заболевания дыхательных путей (бронхиальная астма, хронический обструктивный бронхит).
2. Инфекция дыхательных путей (острый бронхит, пневмония).
3. Фарингит, синусит, туберкулез).
4. Интерстициальный фиброз легких.
5. Саркоидоз.
6. Бронхогенные карциномы (у 70—90 % больных с бронхогенной карциномой кашель является ведущим симптомом).
7. Рецидивирующие аспирации у пожилых пациентов и у больных с заболеваниями центральной нервной системы и нарушением глотания.

Кроме того, возможен психогенный кашель, встречающийся при психоэмоциональных расстройствах. *Он* не сопровождается продукцией мокро-

ты, обычно не возникает в ночное время и не поддается влиянию традиционно используемых противокашлевых препаратов.

Сильный приступ кашля, в особенности так называемый сухой кашель, резко увеличивает внутрилегочное давление, что приводит к снижению наполнения кровью правого желудочка сердца; в результате уменьшается ударный объем, могут возникнуть синусовая аритмия и понижение давления в большом круге кровообращения, нарушение газообмена. Сильный приступ кашля или длительный неукротимый кашель может быть источником и ряда других осложнений — от разрыва прямой мышцы живота до перелома ребер и пневмоторакса [Empey, 1980; Irwin, 1981]

Недавние экспериментальные и клинические исследования показали, что в реализации кашлевого рефлекса, кроме центрального механизма, основными

элементами которого являются дельта-опиоидные рецепторы (Kotzer et al., 2000] и серотониновые рецепторы первого типа (5-НТ1А) [Stone et al., 1997], участвует НАНХ-система (неадренергическая нехоли-нергическая система). Ключевую роль в этой системе играют субстанция Р и нейрокинин А. В слизистой оболочке трахеобронхиального дерева человека и других млекопитающих выявлена высокая плотность рецепторов субстанции Р и тахикининов — NK(1), NK(2), NK(3). Получены убедительные доказательства того, что кашлевой рефлекс реализуется через эти рецепторы. Таким образом, длительный, изнуряющий пациента кашель, особенно непродуктивного характера (т. е. без образования слизи), требует определенного терапевтического вмешательства, направленного на подавление приступа кашля и улучшение дренажной функции бронхов.

Современные противокашлевые лекарственные средства подразделяют на 2 группы [Харкевич, 1993]:

1. Средства центрального действия.
2. Средства периферического действия.

К традиционным препаратам 1-й группы относят кодеин, наркотические анальгетики, окселадина цитрат. К широко используемым препаратам 2-й группы принадлежит либексин. Выраженными противокашлевыми свойствами обладают некоторые новые современные лекарственные средства, например весьма перспективный препарат для лечения бронхолегочной патологии — фенспирид (нестероидный противовоспалительный препарат), недавно вошедший в клиническую практику [Laude et al., 1995].

Для поиска и изучения новых фармакологических веществ с потенциальной противокашлевой активностью используют ряд экспериментальных моделей кашля, которые условно можно подразделить на модели кашля с преимущественно центральным механизмом (кашель индуцируется, например, капсаицином) и модели кашля с периферическим механизмом (раздражение ирритантных рецепторов слизистой оболочки трахеи и бронхов).

Контрольные вопросы:

1. Изучение противокашлевых и муколических средств.
2. Изучение фармакологических веществ, предназначенных для лечения бронхиальной астмы.
3. Изучение фармакологических веществ, предназначенных для лечения бронхита.
4. Изучение фармакологических веществ, предназначенных для лечения синусита.
5. Изучение фармакологических веществ, предназначенных для лечения туберкулеза.
6. Экспериментальные модели для изучения противокашлевой активности новых фармакологических веществ.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Лекция 15

Методы доклинического исследования эффективности химиотерапевтических лекарственных средств

Оценка иммуотропной активности фармакологических препаратов

Цель данного раздела методических рекомендации заключается в описании комплекса стандартных методик, с помощью которых можно оценить эффект изучаемого вещества на иммунитет и сделать вывод о возможности его отнесения к группе иммуотропных средств (ИТС). При этом следует идентифицировать то звено иммунитета, на которое в наибольшей степени действует изучаемое вещество.

Для того чтобы отнести тот или иной препарат к разряду ИТС, целесообразно изучить его влияние на гуморальный клеточный иммунитет и систему цитокинов. Задача заключается в количественной оценке эффекта различных доз изучаемого вещества при введении на различных этапах развития иммунного ответа, т. е. должен быть оценен эффект дозы и эффект времени.

Подготовительная работа

Подготовительная работа при проведении опытов *in vivo* заключается в выборе экспериментальных животных, способа введения и доз изучаемого препарата. Для изучения иммуномодулирующей активности препарата наиболее целесообразно использовать мышей линии СВА BALB/с СВ57/В1 и др. массой 18--20 г. Необходимо, чтобы опытную и контрольную группу составляли животные одного возраста, пола, массы, полученные одновременно из одного питомника и содержащиеся в одинаковых условиях. Введение исследуемого препарата в различных экспериментах должно осуществляться в одно и то же время суток. Для получения стабильных и достоверных результатов на каждую дозу следует брать не менее 10 мышей. При проведении опытов *in vitro* в качестве источника материала рекомендуется использовать периферическую кровь здоровых доноров в возрасте от 20 до 50 лет.

Выбор низшей дозы препарата должен исходить из минимальной терапевтической дозы для человека в перерасчете на 1 г массы животного или на площадь тела. Высшая доза препарата должна составлять $1/10$ от LD_{50} . При отсутствии информации о терапевтической дозе для опытов *in vivo* в качестве ориентировочных можно использовать дозы 1000 мкг, 100 мкг и 10 мкг на мышь, для опытов *in vitro* — 10 мкг, 1 мкг и 0,1 мкг на 1 мл питательной среды. Следует подчеркнуть, что эти дозы являются ориентировочными. При изучении нового вещества каждый экспериментатор должен выбирать и обосновывать дозы этого вещества для исследования самостоятельно. Способ введения препарата во всех экспериментах *in vivo* должен быть единообразным. Чаще всего в этих экспериментах используются подкожный, внутривенный или внутривенный путь введения препарата.

Результаты экспериментов с опытной и контрольной группами должны быть обработаны и сравнены статистически с использованием t-критерия Стьюдента. Если вариационный ряд не несет черт нормального распределения, данные должны быть обработаны с помощью непараметрических методов. Результат влияния препарата на иммунитет может быть рассмотрен как положительный только при наличии статистически значимой разницы между контрольной и опытной группами.

15.1 Оценка влияния препарата на неспецифическую резистентность организма

Одной из характерных черт иммуномодуляторов является их способность усиливать неспецифическую резистентность к бактериальным и вирусным инфекциям. Для этого целесообразно использовать в качестве объекта для исследования мышей, а в качестве инфекционных агентов — стафилококк и кишечную палочку — наиболее доступные для лабораторных исследований бактерии.

Для оценки стимуляции неспецифической резистентности изучаемый препарат вводят внутрибрюшинно или подкожно в различных дозах мышам линии СВА или (СВА/С57black)F1. Наиболее часто используются дозы 1000 мкг, 100 мкг, 10 мкг в объеме 0,5 мл физиологического раствора. Контрольные мыши получают 0,5 мл физиологического раствора. Через 48—72 ч одну группу подопытных и контрольных мышей заражают внутрибрюшинно 1—2 DCL Staph. aureus, другую группу E. сой. Наблюдения за животными ведут в течение 10 дней. Опыт можно учитывать только в том случае, если в контрольной группе гибель животных будет составлять не менее 90 %. По данным этого опыта препарат можно рассматривать как ИТС, если он по крайней мере в дозах 100 мкг и 10 мкг обеспечивает 60 % и выше выживание мышей.

При наличии соответствующих условий целесообразно оценить способность препарата повышать неспецифическую резистентность и к вирусным агентам (факультативный опыт). Для этих целей используют вирус гриппа, адаптированный к мышам. Схема и оценка результатов эксперимента такие же, как и с бактериями. Подопытных и контрольных мышей заражают интраназально 1—2 DCL вируса гриппа и гибель мышей изучают в течение 10 дней. Препарат можно рассматривать как ИТС, если хотя бы одна из используемых доз препарата обеспечит 60 % и выше выживание мышей.

15.2. Оценка влияния препарата на фагоцитоз

Для оценки влияния препарата на фагоцитоз используют мышей через 24—48 ч после введения исследуемой дозы препарата. Для изучения фагоцитарной активности нейтрофилов мышам вводят внутрибрюшинно 3—4 мл 2—3 % раствора пептона и через 2 ч их умерщвляют с помощью хлороформа. Животных вскрывают в асептических условиях. Из брюшной полости с

помощью пастеровской пипетки отсасывают жидкость, помещают ее в силиконизированные центрифужные пробирки и центрифугируют в течение 10 мин при 1000 об/мин. Осадок ресуспендируют в среде 199, подсчитывают число клеток в камере Горяева и доводят их до концентрации 1—2 млн/мл по нейтрофилам. К клеткам добавляют равный объем бактерий (чаще всего стафилококк, не содержащий белка А) в соотношении 1:10 и инкубируют при 37 °С в течение 30 мин. Бактерии предварительно должны быть опсонизированы пудовой мышиной сывороткой. Опсонизацию проводят в течение 10 мин при температуре 37 °С с последующим отмыванием. После инкубации готовят по аналогии с кровавым мазок, на предметном стекле фиксируют его метанолом 20 мин и красят краской Романовского— Гимзы в течение 30—40 мин.

Для изучения фагоцитарной активности макрофагов на 3—4-е сутки после введения пептона мышей умерщвляют с помощью хлороформа (нельзя убивать с помощью дислокации шейных позвонков), вскрывают в асептических условиях и вводят внутривенно 3—4 мл среды 199 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки. После легкого массажа брюшной полости жидкость отсасывают с помощью пастеровской пипетки. Полость можно промывать средой 199 несколько раз, объединяя в одну все полученные порции. Далее исследование ведется как и в опытах с нейтрофилами.

Учет результатов осуществляется микроскопически. В мазке при увеличении 90 с иммерсионной системой посчитывают фагоцитарный индекс, процент фагоцитирующих нейтрофилов и фагоцитарное число поглощенных бактерий на 1 нейтрофил.

Для оценки влияния препарата на фагоцитоз *in vitro* берут кровь из кубитальной вены в пробирку с гепарином из расчета 25 единиц на 1 мл, 2 мл исследуемой крови смешивают с 0,8 мл 3 % раствора желатины, приготовленного на среде 199. Ставят в термостат на 20—30 мин при 37 °С. После инкубации в центрифужную пробирку отсасывают надосадочный слой, содержащий все клеточные элементы. Клетки 2 раза отмывают средой 199 при 200 g в течение 10 мин. К осадку после последнего центрифугирования добавляют 1 мл среды 199, и в камере Горяева с применением краски С. И. Задорожного и И. М. Дозморова (0,01 % раствор азур 11 в 0,05 % растворе тритонах X-100) считают число нейтрофилов. Готовят на среде 199 клеточную суспензию, содержащую 2 млн нейтрофилов на 1 мл. Параллельно с этим готовят взвесь *Staph. aureus* (целесообразно использовать штамм стафилококка, не содержащий белка А) в концентрации 20 млн/мл. Стафилококк предварительно должен быть опсонизирован пудовой человеческой сывороткой в течение 20 мин при 37 °С и тщательно отмыт.

При постановке реакции смешивают в 96-луночных круглодонных планшетах 90 мкл клеточной суспензии и 90 мкл стафилококка (соотношение 1:10) и планшеты инкубируют при 37 °С в течение 30 и 60 мин. Для изучения исследуемого препарата к смеси добавляют по 20 мкл этого вещества в соответствующих концентрациях. В контроле к смеси добавляют 20 мкл среды 199. После окончания инкубации планшеты центрифугируют при 200

g 10 мин и из осадка готовят препараты по методике, представленной ранее. Сравнивают по фагоцитарному индексу и фагоцитарному числу способность исследуемого препарата влиять на поглотительную стадию фагоцитоза.

15.3 Оценка влияния препарата на гуморальный иммунный ответ

Оценку влияния препарата на гуморальный иммунный ответ целесообразно изучать путем определения числа антителообразующих клеток (АОК) и титров антител после иммунизации эритроцитами барана мышей, высокоотвечающей (СВА) и низкоотвечающей (С57/BL) линий. Для иммунизации животных следует использовать минимальные дозы (5×10^6) антигена. Число АОК определяют с помощью метода локального гемолиза по Ер-не и Нордину. Для этого клетки селезенки иммунизированных животных совместно с эритроцитами барана и комплементом помещают в агаровый (агарозный) гель. Клетки в условиях *in vitro* продолжают синтезировать антитела, которые лизируют эритроциты. Вокруг этих клеток образуются видимые макроскопически зоны гемолиза. Подсчитывая эти зоны, можно определить, какое число АОК приходится на 10^6 ядросодержащих клеток и на всю селезенку.

При постановке опыта мышей внутрибрюшинно иммунизируют эритроцитами барана в дозе 5×10^8 . При определении числа IgM АОК на 4-е сутки (пик развития IgM-ответа) животных забивают, выделяют селезенку, с помощью стеклянного гомогенизатора готовят клеточную суспензию, фильтруют ее через двойной капроновый фильтр и после счета в камере Горяева доводят концентрацию спленоцитов до 1×10^7 клеток на 1 мл. Готовят смесь, состоящую из 0,7 % агара Dinko на среде Хэнкса клеток селезенки и эритроцитов барана. Для этого к 0,5 мл расплавленного и помещенного в водяную при 45°C агара добавляют 50 мкл суспензии спленоцитов и 10 мкл осадка эритроцитов, трижды отмытых в физиологическом растворе. Смесь выливают в пластиковые чашки Петри диаметром 40 мм и быстрыми круговыми движениями равномерно распределяют агаровую смесь по дну чашки. После застывания агара чашки помещают на 1 ч в термостат при температуре 37°C . После инкубации к чашкам добавляют комплемент 0,5 мл сыворотки морской свинки в разведении 1:10, и снова инкубируют 1 ч в термостате при той же температуре. Учет результатов опыта ведется невооруженным глазом. На красном фоне подсчитывают число зон гемолиза (просветления). Каждая зона соответствует одной IgM АОК.

Для определения числа IgG АОК животных забивают на 6—7-й день — пик развития IgG-ответа. Опыт ведут, как при определении IgM АОК, после подсчета числа этих клеток в чашки Петри вносят 0,5 мл кроличьей антисыворотки против мышинного IgG в соответствующем разведении. Далее инкубируют 1 ч в термостате при 37°C , добавляют комплемент и после инкубации подсчитывают число вновь появившихся зон гемолиза, каждая из которых соответствует одной IgG АОК.

Контрольные вопросы:

1. Изучение иммуностропной активности фармакологических веществ.
2. Изучение противомикробной активности фармакологических веществ.
3. Изучение специфической противовирусной активности фармакологических веществ.
4. Методы изучения противотуберкулезной активности фармакологических веществ.
5. Методы противогрибковой активности фармакологических веществ.
6. Методы антигельминтной активности фармакологических веществ.

Список литературы

1. **Уша, Б.В.** Фармакология / Б.В. Уша, В.Н. Жуленко, О.И. Волкова. - М.:КолосС, 2006. – 376 с. – ISBN 978-5-9532-0052-8
2. **Жуленко, В.Н.** Фармакология / В.Н. Жуленко, Г.И. Горшков. - М.:КолосС, 2008. – 512 с. – ISBN 978-5-9532-0506-1
3. **Рабинович, М.И.** Общая фармакология 2-е изд. / Рабинович М.И. [и др.]. - СПб: Лань, 2006. – 272 с. – ISBN 5-8114-0652-5
4. **Рабинович, М.И.** Несовместимость и побочное действие лекарств, применяемых в ветеринарии / Рабинович М.И. - СПб: КолосС, 2006. – 248 с. – ISBN 5-9532-0259-8
5. **Ващекин, Е.П.** Ветеринарная рецептура. Е.П. Ващекин, К.С. Маловастый. - СПб.: Лань, 2010. – 240 с. – ISBN 978-5-8114-1040-8
6. **Жуленко, В.Н.** Токсикология / В.Н. Жуленко, Г.А. Таланов, Л.А. Смирнов. - М.:КолосС, 2010. – 368 с. – ISBN 978-5-9532-0649-5
7. **Аргунов, М.Н.** Ветеринарная токсикология с основами экологии. / М.Н. Аргунов, В.С. Бузлама. - СПб.: Лань, 2007. – 416 с.- ISBN 978-5-8114-0704-0

Содержание

Введение.....	3
Лекция 1. Методы исследования безопасности лекарственных средств	
1.2 Фармакокинетическое изучение новых лекарственных форм, содержащих известное фармакологическое средство.....	4
1.3 Методы количественного определения концентрации фармакологических средств.....	10
Лекция 2. Методы исследования безопасности лекарственных средств	
2.1 Фармакокинетическое изучение новых лекарственных форм, содержащих известное фармакологическое средство.....	19
Лекция 3. Методы исследования безопасности лекарственных средств	
3.1 Фармакокинетические исследования воспроизведенных фармакологических средств..	21
Лекция 4. Методы исследования безопасности лекарственных средств	
4.1 Фармакокинетическое изучение воспроизведенных фармакологических средств с целью расширения показаний к их применению.....	23
Лекция 5. Отчетная документация о фармакокинетическом исследовании	
5.1 Протоколирование результатов исследования по безопасности лекарственных средств.....	25
Лекция 6. Методы исследования общетоксического действия фармакологических веществ	
6.1 постановка биопроб. Пробит-анализ.....	27
6.2 Изучение "острой" токсичности.....	30
Лекция 7. Исследование иммунотоксического действия фармакологических средств	
7.1 Изучение влияния лекарственных средств на напряженность иммунитета.....	34
7.2 Обоснование предлагаемых методов и подходов к оценке иммунотоксичности на первом этапе исследования.....	37
7.3 Обоснование предлагаемых методов и подходов к оценке иммунотоксичности на втором этапе исследования.....	39
Лекция 8. Изучение репродуктивной токсичности фармакологических веществ	

8.1. изучение влияния лекарственных средств на репродуктивную систему самцов и самок.....	42
8.2 Изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном периоде развития.....	43
8.3 Изучение антенатального повреждающего действия фармакологических веществ, регистрируемого в постнатальном периоде развития.....	47

Лекция 9. Исследования алергизирующих свойств фармакологических веществ

9.1 Общие положения.....	50
9.2 Условия проведения эксперимента.....	51
9.3 Контрольный препарат.....	51
9.4 Характеристика фармакологического средства.....	52
9.5 Исследуемые дозы.....	52
9.6 Экспериментальные животные.....	53
9.7 Выявление развития сенсibilизации при различных путях поступления фармакологических средств в организм.....	54

Лекция 10. Исследования мутагенных свойств фармакологических веществ

10.1 Принципы отбора фармакологических средств для испытания на мутагенную активность.....	60
10.2 Пути введения фармакологического средства, выбор доз, объекты Исследования.....	60
10.3 Проведение эксперимента.....	64
10.4 Оценка результатов.....	61

Лекция 11. Исследования канцерогенных свойств фармакологических веществ и лекарственных средств

11. 1 Принципы отбора ЛС для исследования.....	63
11. 2 Характеристика ЛС.....	64
11.3 Экспериментальные животные.....	64
11.4 Исследуемые дозы.....	65
11.5 Продолжительность опыта.....	66
11.6 Протоколы эксперимента.....	67
11.7 Вскрытие животных и гистологическое исследование.....	68
11.8 Оценка результатов исследования.....	68

Лекция 12. Методы доклинического исследования эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний центральной и периферической нервной системы

12.1 Антипсихотические средства.....	70
--------------------------------------	----

Лекция 13. Методы доклинического исследования эффективности лекарственных средств, предназначенных для лечения заболеваний сердечно - сосудистой системы.....

Лекция 14. Методы доклинического исследования эффективности лекарственных средств предназначенных для лечения заболевания систем органов дыхания.....	79
Лекция 15. Методы доклинического исследования эффективности химиотерапевтических лекарственных средств.....	82
15.1 Оценка влияния препарата на неспецифическую резистентность Организма.....	83
15.2. Оценка влияния препарата на фагоцитоз.....	83
15.3 Оценка влияния препарата на гуморальный иммунный ответ.....	85