



ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Методы изучения специфической токсичности лекарственных препаратов

Медико-биологический факультет

Виды специфической токсичности новых лекарственных препаратов:

- ❑ Аллергизирующие свойства
- ❑ Иммунотоксичность
- ❑ Репродуктивная токсичность
- ❑ Мутагенность
- ❑ Канцерогенные свойства

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

Виды аллергизирующих свойств лекарственных препаратов:

1. анафилактический тип – реакция между фиксированными на клетке антителами и специфическим антигеном с последующим высвобождением медиаторов из клеток мишеней. К этому типу реакций относятся анафилактический шок, отек Квинке, крапивница, отдельные виды бронхиальной астмы.

Виды аллегризирующих свойств лекарственных препаратов:

2. цитотоксический тип – реакция антител с компонентами клеточной оболочки. Разрушение клетки происходит в присутствии комплемента (гемолитическая анемия, агранулоцитоз, лейкопения, тромбоцитопения).

Виды аллергизирующих свойств лекарственных препаратов:

3. аллергические реакции, связанные с образованием иммунных комплексов в крови или тканях и активацией комплемента (феномен Артюса, сывороточная болезнь, уевит, лекарственная лихорадка, аллергический васкулит).

Виды аллегризирующих свойств лекарственных препаратов:

4. клеточный тип – реакция сенсibilизированных лимфоцитов со специфическими антигенами. Механизм действия по типу гиперчувствительности замедленного типа (дерматиты);
5. Прямая стимуляция антителами функции клеток (стимуляция рецептора тиреостимулирующего гормона щитовидной железы при тиреотоксикозе)

Обязательному тестированию подвергаются 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.

Оценка аллегризирующих свойств лекарственных препаратов:

- Исследования проводят на морских свинках, белых крысах Wistar и мышах линии Balb/c. В некоторых случаях (в зависимости от задач эксперимента) возможно применение беспородных мышей, крыс и кроликов. Наиболее чувствительным, в видовом отношении, животным является морская свинка. В исследованиях используются морские свинки-альбиносы или животные, имеющие достаточно большие участки белой кожи.

Исследуемые дозы:

- Наиболее оптимальным является исследование двух уровней доз. Минимальная доза — эффективная доза для данного вида животных (ЭД50), максимальная — на порядок выше рекомендуемой для КИ или субтоксическая доза для данного вида животных (ориентировочно 10 ЭД50), не выходящая за интервал терапевтической широты действия лекарственного вещества.
- В случаях, когда реальная терапевтическая доза вещества не известна, для сенсibilизации животных можно использовать дозы, последовательно на порядок меньше, чем ЛД50 (1/10, 1/100, 1/1000 от ЛД50) при соответствующем способе введения.

Пути введения

- выбираются соответственно предполагаемым путям введения и способам его применения человеком.
- Пероральное введение
- Эпикутанный метод
- Конъюнктивальная проба
- Ингаляционное введение

Методы выявления сенсibilизации

- I. Тесты *in vivo*
- Оценка анафилактической активности в реакции общей анафилаксии (анафилактический шок)
- 2. Кожные тесты.
- 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*
- Реакция непрямо́й дегрануляции тучных клеток или базофильных лейкоцитов.

Изучение иммуотоксических свойств лекарственных препаратов:

Обязательному тестированию подвергаются лекарственные средства применяющиеся:

- длительными повторными курсами;
- в детской практике, беременным, период лактации;
- профилактические и контрацептивы;
- без назначения врача среди широких слоев населения;
- лечение злокачественных новообразований;
- однократно или короткими не повторяющимися курсами;

Виды животных для изучения иммунотоксических свойств лекарственных препаратов:

- Исследования проводят на и мышах линии СВА, Balb/c и C57BL/6. Предпочтительно использование гибридов первого поколения 6–8-недельного возраста (масса тела 20–22 г).

Исследуемые дозы:

- Наиболее оптимальным является исследование двух уровней 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 $1/10$ – $1/20$ ЛД₅₀.

Оценка иммунотоксичности 1 этапа

Гуморальный иммунный ответ - Оценка антителообразования у животных при иммунизации их тест-антигенами

Клеточный иммунный ответ - Индукция реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к корпускулярному антигену и/или гаптену

Активность фагоцитов - Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитирующих клеток раз ной локализации

Оценка иммунотоксичности 2 этапа

Митогенные свойства - прямое митогенное действие лекарственных препаратов на лимфоциты

Поликлональные свойства - поликлональная активация различных клонов антителообразующих клеток

Функциональная активность лимфоцитов - пролиферативная активность лимфоцитов *in vitro*

Резистентность мышей к экспериментальной инфекции

Изучение мутагенных свойств лекарственных препаратов:

- Тестированию на мутагенную активность подвергаются новые оригинальные фармакологические средства, созданные химическими, биотехнологическими, генно-инженерными и иными способами, включая полученные из сырья природного происхождения и фитопрепараты, а также новые фиксированные комбинации фармакологических средств, планируемые для широкого клинического применения.

Методы изучения мутагенных свойств лекарственных препаратов:

- Тест на индукцию генных мутаций (тест Эймса на *Salmonella typhimurium*)
- Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций/соматической рекомбинации у дрозофилы.
- Тест на индукцию хромосомных повреждений *in vivo* (учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих либо учет микроядер в клетках костного мозга или периферической крови млекопитающих)

Оценка мутагенных свойств лекарственных препаратов:

- Учет хромосомных aberrаций или микроядер в клетках костного мозга млекопитающих;
- Учет генных мутаций с использованием в качестве тест-объекта микроорганизмов или дрозофилы;

Изучение репродуктивной токсичности:

- Тестированию подвергаются все новые оригинальные фармакологические средства, При комбинации нескольких фармакологических веществ в одной лекарственной форме (фиксированная комбинация) изучают комбинацию в целом и каждого ингредиента в отдельности, если он не был ранее разрешен для применения в медицинской практике.

Оценка репродуктивной токсичности лекарственных препаратов :

опыты на самцах:

- Половое поведение
- Спермиограмма
- Сперматогенез
- Оплодотворяющая способность

Параметры оценки полового поведения

- Прорецептивное половое поведение: латентный период первого подхода к самке, длительность эмоционального поведения (взаимный груминг, обнюхивание гениталий, облизывание), количество «эмоциональных» подходов.
 - Рецептивное поведение: количество садок (с интрамиссиями и без интрамиссий), количество лордозов .
-

Параметры оценки спермиограммы

- Общее количество сперматозоидов
 - Количество патологических форм
 - Количество неподвижных форм
 - Время подвижности сперматозоидов
 - Кислотная резистентность
 - Осмотическая резистентность
-

Морфометрические параметры оценки сперматогенеза

- Коэффициенты масс тестикул и эпидидимисов
 - Индекс сперматогенеза
 - Общее количество сперматогоний
 - Количество канальцев с 12-й стадией мейоза
 - Количество канальцев со слущенным эпителием
-

Параметры оценки оплодотворяющей способности

- Индекс беременности
 - Количество живых плодов
 - Количество реробций
 - Количество желтых тел
 - Доимплантационная гибель
 - Постимплантационная гибель
 - Возраст плода
-

Оценка репродуктивной токсичности лекарственных препаратов :

опыты на самках:

- Половое поведение
- Эстральный цикл
- Способность к зачатию
- Изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном и постнатальном периодах

Схема введения лекарственных веществ для оценки эмбрио- и фетотоксического действия

- С 1-го по 19-й день беременности
 - С 1-го по 6-й день (доимплантационный период)
 - С 6-го по 16-й (органогенез)
 - С 16-го по 19-й (фетогенез)
-

Параметры оценки эмбрио- и фетотоксического действия в антенетальном периоде

- Индекс беременности
- Количество живых плодов
- Количество реробций
- Доимплантационная гибель
- Постимплантационная гибель
- Масса плода
- краниокаудальный размер плода
- гистологический послойный обзор тканей плодов
- подсчет мест оссификации скелета

Параметры оценки эмбриотоксического действия в постнатальном периоде

- Физическое развитие: размер помета, число особей по полу, размеры и индекс гибели при рождении или в течение первой недели после рождения; прирост массы тела в период наблюдений, отлипание ушной раковины, появление волосяного покрова, прорезывание резцов, открытие глаз, опускание семенников, открытие влагалища.

- скорость созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания: -переворачивание на плоскости, отрицательный геотаксис, избегание обрыва, реакция на акустический стимул, зрачковый рефлекс, обонятельная реакция, мышечная сила.

■ эмоционально-двигательное поведение: переворачивание при свободном падении и открытое поле, в котором фиксируют поведенческие реакции.

■ обучаемость и память у крысят - пассивное избегание с отрицательным болевым подкреплением.

Изучение канцерогенности

- Тестированию подвергаются все фармакологические средства, рекомендуемые в качестве профилактических, контрацептивных, лечебно-косметических;
- для применения в детской практике, а также для лечения беременных женщин и в период лактации;
- для применения в течение всей жизни или длительными повторными курсами;
- гормональные и гормоноподобные вещества;

Изучение канцерогенности

(продолжение)

- для широкого использования при безрецептурном отпуске лекарств;
 - ЛС, полученные биотехнологическими и генно-инженерными методами.
 - ЛС, вопрос об исследовании которых рассматривается в каждом отдельном случае:
 - предназначенные для лечения онкологических заболеваний у детей;
- принимаемые однократно или краткосрочными неповторяющимися курсами.

Оценка канцерогенных свойств лекарственных препаратов:

- Инициация – повреждение ДНК высокореактивными метаболитами канцерогенов приводит к возникновению точковых мутаций, перестановке блоков генов и т.д.
- Промоция – плейотропное действие на клетки, изменение структуры и функции клеточной мембраны, нарушение проницаемости межклеточных контактов, без повреждения ДНК.

Исследование эффективности лекарственных средств для лечения заболеваний центральной и периферической нервной системы:

- Изучение нейролептической активности
- антидепрессивной активности
- транквилизирующего действия
- снотворной активности
- противосудорожной активности
- антипаркинсонической активности
- ноотропной активности
- психоактивных свойств
- препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения
- обезболивающего действия
- препаратов для лечения алкоголизма
- препаратов для лечения наркоманий и токсикоманий
- местноанестезирующей активности

Исследование эффективности лекарственных средств для лечения сердечно-сосудистой системы:

- Изучение кардиотонической активности
 - антиаритмической активности
 - противоишемического действия
 - гипотензивной активности
 - гиполипидемического и антиатеросклеротического действия
 - препаратов, влияющих на гомеостаз
-

Исследование эффективности лекарственных средств для лечения органов дыхания:

- Изучение противокашлевой и муколитической активности
- Для лечения бронхиальной астмы и других обструктивных заболеваний дыхательных путей

Исследование эффективности химиотерапевтических лекарственных средств:

- Изучение иммуностропной активности
- Противомикробной активности
- Специфического противовирусного действия
- Специфической активности индукторов интерферонов
- Противотуберкулезной активности
- Противогрибковой активности
- Антипротозойной активности
- Антигельминтных свойств
- Противоопухолевой активности

Исследование эффективности лекарственных средств разных фармакологических групп:

- Изучение гепатозащитной активности
- Антиоксидантов и хелаторов
- Нестероидные противовоспалительного действия
- Антидоты
- Радиопротекторной активности
- Радиофармацевтической активности
- ЛС, изготавливаемые из природного сырья

Исследования в лаборатории токсикологии лекарственных препаратов.

- Определение острой токсичности (LD_{50} на двух видах животных и разных путях введения).
- Изучение способности к кумуляции (фармакокинетический или токсикологический метод).
- Исследование подострой или хронической токсичности (в трех дозах при путях введения соответственно клиническому применению).
- Определение действия на мужские и женские гонады (гонадотропное действие).
- Выявление трансплацентарных эффектов (эмбриотоксичность, тератогенность, фетотоксичность и действие в постнатальном периоде).
- Исследование мутагенных свойств.
- Определение аллергенности и местнораздражающего действия лекарственного препарата.
- Выявление иммуностропности лекарственного препарата.
- Изучение канцерогенных свойств.