



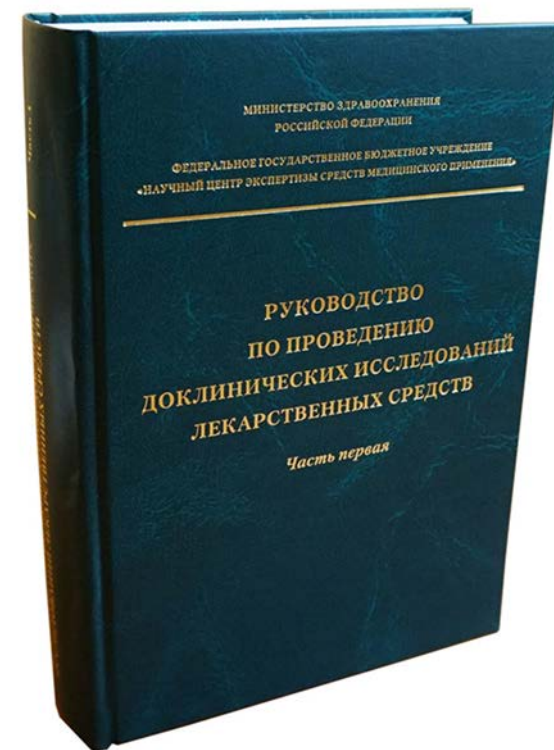
ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Принципы изучения специфической токсичности лекарственных препаратов. Иммунотоксичность

Кафедра фармакологии и биоинформатики

Нормативные правовые акты, регламентирующие доклинические исследования безопасности и эффективности лекарственных средств в Российской Федерации

- ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики»
- ГОСТ 31891-2012 Межгосударственный стандарт «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение Принципов GLP к исследованиям in vitro».
- МЗ РФ Приказ N 199н Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики (от 1 апреля 2016 г.).
- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1-2. Под ред. Миронова А.Н. и др. 2012 г.
- СП 2.2.1.3218-14 « Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».
- «Правила надлежащей лабораторной практики» (Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 No 81).
- «Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 No 78).



Изучение токсичности вещества на животных требуется для:

идентификации и измерения кратковременного и длительного токсического действия лекарственного средства, включая: обратимость токсических эффектов и сферу их распространения в организме.

Изучение острой токсичности

- токсичность при однократном или дробном введении через короткие (не более 3-6 часов) интервалы в течение суток.

Исследование качественного и количественного признаков острых токсических реакций после однократного введения вещества в тех пропорциях и физико-химическом состоянии, в которых вещества содержится в ГЛС.

Два или более видов млекопитающих.

Два способа введения, один из которых идентичный или подобен тому, который рекомендуют для введения человеку, а другой обеспечивает системное действие вещества.

Изучение различных признаков токсичности.

Период наблюдения за животным – 14 суток (но не менее 7 сут.).

Определение хронической токсичности

- токсичность при повторных введениях.

Исследование предназначено для выявления физиологических и/или патологоанатомических изменений, обусловленных повторным введением вещества или комбинации вещества и определения зависимости этих изменений от дозы.

Субхроническая (подострая) токсичность - продолжительность введения 2-12 недель.

Хроническая токсичность (включает в себя повторные введения препарата на протяжении 3-6 мес (до 1 года и более)).

Цель – определение нетоксичного диапазона доз. Кумулятивное действие.

Продолжительность зависит от условий клинического применения.

Если ЛС предназначено для однократного применения – только одно испытание субхронической токсичности (2-4 нед).

Специальные токсикологические исследования

местно-раздражающее,

иммунотоксичность,

репродуктивная токсичность,

эмбриотоксичность,

тератогенность,

гонадотоксичность,

пирогенность,

генотоксичность (мутагенность),

канцерогенность.

- **«Правила регистрации и экспертизы лекарственных средств для медицинского применения» (Решение Совета ЕЭК от 03.11.2016 No 78)**
 - **Фототоксичность**
 - **Эндокринологическая токсичность**
 - **Офтальмотоксичность**

Виды специфической токсичности новых лекарственных препаратов:

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

- **Иммунотоксикология зародилась во второй половине 70-х годов XX столетия. В 1979 г. в «Анналах Нью-Йорской Академии наук» публикуются материалы первого симпозиума, посвященного данному вопросу, а в 1983 г. в журнале «Immunology Today» впервые было формально заявлено о возникновении нового научного направления — иммунотоксикологии — как результата слияния иммунологии и токсикологии**

- Под иммунотоксическим действием традиционно понимают модифицирующее влияние ксенобиотиков и ЛС 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

Изучение иммунотоксических 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;**

Рассматривается индивидуально вопрос об изучении иммунотоксичности препаратов:

- **предназначенных для лечения злокачественных новообразований;**
- **однократно или коротким неповторяющимся курсом.**

Тестирование не обязательно для препаратов, предлагаемых:

- **для лечения заболеваний, представляющих непосредственную угрозу для жизни;**
- **для средств, безопасность применения которых была изучена в рамках исследования специфической активности;**
- **воспроизводимых отечественных и зарубежных ЛС, если в литературе имеются достаточно обоснованные сведения экспериментального и ретроспективного характера, подтверждающие отсутствие иммунотоксических свойств соответствующего аналога.**

Виды животных для изучения иммунотоксических свойств лекарственных препаратов:

-
- **Исследования проводят на 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 иммуотоксичности 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 антителообразования у животных при иммунизации их тест-антигенами**
 - В качестве антигена могут быть использованы эритроциты барана (ЭБ).
 - Этот Т-зависимый тест-антиген наиболее полно моделирует различные варианты чужеродного агента (корпускулярный, тимус-зависимый, содержащий множество антигенных детерминант).
 - Определение антителообразующих клеток к ЭБ в реакции локального гемолиза в геле агарозы (метод Ерне).
 - Для оценки гуморального иммунного ответа метод определения числа антителообразующих клеток (АОК) в селезенке мышей при иммунизации Т-зависимым антигеном. Этот интегральный показатель широко используется на первом этапе тестирования фармакологических средств. Оценка иммуотропного потенциала исследуемого препарата проводится в схеме, оптимальной для выявления как иммуносупрессивного, так и иммуностимулирующего действия
 - Реакции гемагглютинации и гемолиза

■ Индукция реакции гиперчувствительности

- Реакция ГЗТ к ЭБ или гаптену — тринитробензосульфоновой кислоте (ТНБС)
 - Оценку клеточного иммунитета традиционно проводят с использованием реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) при введении определенных 69 классов антигенов (эритроциты барана, туберкулин, овальбумин и др.).
 - Наиболее информативным представляется использование для сенсибилизации тринитробензосульфоновой кислоты (ТНБС). Механизм индукции ГЗТ 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.

- **Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитирующих клеток разной локализации**
 - **Фагоцитоз агентов различной природы (ЭБ, тушь, латекс, стафилококк и др.) перитонеальными макрофагами.**
 - **Хемилюминесценция клеток при фагоцитозе опсонизированного материала *in vitro*.**
 - **Оценка функциональной активности макрофагов методом определения уровня мембранного фермента 5'-нуклеотидазы**
 - **активность препаратов, выявленная в указанном тесте, коррелирует с иммуноадьювантной активностью и способностью изменять резистентность животных к инфекции**

Оценка иммуотоксичности 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**
 - **заражение животных различными видами микроорганизмов**

- **Прямое митогенное действие лекарственных препаратов на лимфоциты**
 - **Реакция бласттрансформации лимфоцитов (РБТЛ) под влиянием исследуемого препарата *in vitro***
 - 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 intactных животных позволяет оценить его прямой митогенный эффект.
 - Достаточно информативным, коррелирующим с сенсibilизирующими свойствами фармакологического средства является факт усиления ФГА-индуцированной пролиферации спленоцитов мышей после введения им препарата.

- **Поликлональная активация различных клонов антителообразующих клеток**
 - Определение антителообразующих клеток к различным антигенам в реакции локального гемолиза
 - ЭБ, ЭБ-ТНБС, ЭК

Функциональная активность лимфоцитов



- ❑ **Пролиферативная активность лимфоцитов in vitro**
 - Реакция бласттрансформации лимфоцитов
 - ❑ спонтанная и индуцированная Т- и В-митогенами

Резистентность мышей к экспериментальной инфекции



■ Заражение животных различными видами микроорганизмов

- 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 недели 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