



ВОЛГОГРАДСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ
МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ

Методы изучения специфической токсичности лекарственных препаратов. Мутагенность. Канцерогенные свойства.

Кафедра фармакологии и биоинформатики

Профессор В.А.Косолапов



Виды специфической токсичности новых лекарственных препаратов:

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



Изучение мутагенности



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**

Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса)



- Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* является бактериальной тест-системой для учета мутаций к прототрофности по гистидину при действии химических соединений и/или их метаболитов, индуцирующих мутации типа замены оснований или сдвига рамки считывания в геноме этого организма.
- Мутагены, индуцирующие замены пар оснований — агенты, вызывающие мутации типа замены пар оснований в молекуле ДНК. В данном тесте эти мутации могут происходить или в сайте исходной мутации, или в другом сайте хромосомы.
- Мутагены, индуцирующие мутации типа сдвига рамки считывания — агенты, вызывающие вставку или делецию одной или нескольких пар оснований в молекуле ДНК.

Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса)



- **Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метаболической активации или без метаболической активации.**
 - **В качестве тестерных организмов используются штаммы *Salmonella typhimurium*. Минимальный набор состоит из штаммов TA 97, TA 98 и TA 100. При необходимости могут использоваться и другие виды и штаммы микроорганизмов.**
 - **Каждый штамм должен быть проверен на ауксотрофность по гистидину, чувствительность к кристаллическому фиолетовому и устойчивость к ампициллину. Тестерные штаммы должны иметь уровень спонтанных ревертантов в пределах ожидаемого на основании литературных данных.**
 - **Для исследования могут быть использованы готовые тестовые наборы (киты), разработанные в соответствии с требованиями настоящих указаний.**

Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса)



- После инкубации в течение определенного периода времени подсчитывается количество ревертантных колоний у разных тестерных штаммов в сравнении с количеством спонтанных ревертантов в вариантах негативного контроля (необработанные культуры или культуры, обработанные растворителем).
- Если тестируемое соединение и/или его метаболиты обладают мутагенной активностью, то они будут индуцировать обратные мутации от ауксотрофности к прототрофности по гистидину у гистидинзависимых штаммов *Salmonella typhimurium*



Изучение канцерогенности

Изучение канцерогенности



- **Краткосрочные скрининговые тесты (КСТ)**
- **Исследование индукции опухолей на млекопитающих**

- **Вопрос о возможности перехода к КИ фармакологических средств (ФС) с точки зрения его канцерогенной безопасности может решаться на основании краткосрочных скрининговых тестов (КСТ), а не после получения результатов 2–3-летних экспериментов по индукции опухолей у животных, которые в случае недостаточной эффективности ФС в клинике могут оказаться излишними.**
- **При отрицательных результатах в КСТ дополнительная оценка потенциальной канцерогенности на млекопитающих традиционным методом необходима для лекарств, имеющих структурное сходство с известными канцерогенами или при получении неопределенных или противоречивых результатов. Новые фиксированные комбинации фармакологических средств, планируемые для широкого клинического применения, при структурном сходстве любого из компонентов комбинации с известными канцерогенами, мутагенами или их метаболитами также подвергаются исследованию на млекопитающих.**

- **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.

- Тесты на выявление генных мутаций
 - тест Эймса (*Salmonella*/микросомы) с использованием экзогенной активации препаратов фракцией S9 печени крыс;
 - Равнозначными тестами являются: индукция рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций или индукция соматических мутаций на дрозофиле.
- Цитогенетические тесты
 - индукция хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*;
 - индукция микроядер в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*.

Минимальная батарея КСТ

- Тесты на повреждения ДНК:
 - тест по учету повреждений ДНК (ДНК-комет) методом щелочного электрофореза *in vitro* и *in vivo*
 - Допустимо использование репарационного теста на *E. coli* или индукцию SOS-ответа бактериальной клетки, тестов на индукцию внепланового синтеза ДНК в клетках млекопитающих или выявление повреждений ДНК методом флуорометрии или щелочной элюции.
- Тесты на промоторную активность:
 - ГФРТ-тест на нарушение метаболической кооперации в смешанной культуре соматических клеток млекопитающих
 - ГФРТ -фермент гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза
 - Прямые экспресс-тесты, регистрирующие опухолеобразующий потенциал тестируемых веществ:
 - тест на трансформацию клеток в культуре или индукцию опухолей у гидробионтов.

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 канцерогенности на млекопитающих

- Следует использовать минимум два вида экспериментальных животных – крыс и мышей (не менее 50 голов каждого пола в получающих ЛС и контрольных группах).
- Для полноценности исследования и с целью оценки доза–эффектной зависимости, которая является важным дополнительным критерием наличия канцерогенной активности, необходимо использовать не менее трех (3) доз ЛС, не считая контрольной группы, где доза принимается за нулевую (0).
- За максимальную — следует брать МПД, каждая последующая должна быть ниже предыдущей дозы не менее чем в 2 раза. Одна из доз должна соответствовать терапевтической. При возможности число доз следует увеличить.

Исследование канцерогенности на млекопитающих

- Тестируемое ЛС вводится крысам в течение 24 месяцев, мышам — 18 месяцев. По истечении стандартного срока оставшиеся в живых животные могут быть подвергнуты эвтаназии сразу, через 3 месяца или оставлены на дожитие (по решению экспериментатора). Если к этому сроку выжило более 50% животных, введение вещества следует продолжить до их гибели.
- ЛС признается обладающим канцерогенными свойствами, если даже в одной из получавших ЛС групп имеется статистически значимое превышение частоты опухолей (в том числе спонтанных) по сравнению с их количеством в контрольной (в том же самом эксперименте). Возможно в качестве дополнения использование «исторического» контроля.