

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
И СОЦИАЛЬНОГО РАЗВИТИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР ЭКСПЕРТИЗЫ СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ»

**РУКОВОДСТВО
ПО ПРОВЕДЕНИЮ
ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Часть первая

Москва
2012

РЕДАКЦИОННАЯ КОЛЛЕГИЯ:

доктор медицинских наук МИРОНОВ А.Н. — председатель,

профессор БУНЯТЯН Н.Д., к.б.н. ВАСИЛЬЕВ А.Н., д.м.н. ВЕРСТАКОВА О.Л., профессор ЖУРАВЛЕВА М.В., член-корр. РАМН ЛЕПАХИН В.К., доцент КОРОБОВ Н.В., профессор МЕРКУЛОВ В.А., доцент ОРЕХОВ С.Н., к.ф.н. САКАЕВА И.В., профессор УТЕШЕВ Д.Б., профессор ЯВОРСКИЙ А.Н.

РЕДАКЦИОННЫЙ СОВЕТ:

академик РАН и РАМН СЕРЕДЕНИН С.Б., академик РАН и РАМН ХАИТОВ Р.М., академик РАМН АНОХИНА И.П., академик РАМН АРЧАКОВ А.И., академик РАМН БЫКОВ В.А., академик РАМН ГИНЦБУРГ А.Л., академик РАМН ДЫГАЙ А.М., академик РАМН ЗВЕРЕВ В.В., академик РАМН ЕГОРОВ А.М., академик РАМН ЕРШОВ Ф.И., академик РАМН ИГНАТОВ Ю.Д., академик РАМН КУБАНОВА А.А., академик РАМН КУКЕС В. Г., академик РАМН ПЕТРОВ В.И., академик РАМН СЕРГИЕВ В.П., академик РАМН СЕРГИЕНКО В.И., академик РАМН СОФРОНОВ Г.А., академик РАМН СПАСОВ А.А., академик РАМН ФИСЕНКО В.П., академик РАМН ЧЕХОНИН В.П., академик РАМН ЧИССОВ В.И., член-корр. РАМН ГУСЬКОВА Т.А., член-корр. РАМН ДУРНЕВ А.Д., член-корр. РАМН ГАЛЕНКО-ЯРОШЕВСКИЙ П.А., член-корр. РАМН КАРКИЩЕНКО Н.Н., член-корр. РАМН ТЮРЕНКОВ И.Н., член-корр. РАМН ШИМАНОВСКИЙ Н.Л., профессор АРЗАМАСЦЕВ Е.В., профессор ЗВАРТАУ Э.Э., профессор МЕДВЕДЕВ О.С., к.ф.н. САКАЕВ М.Р., профессор СВИСТУНОВ А.А.

Рецензенты:

профессор МУЛЯР А.Г.
профессор ЧИЧЕНКОВ О.Н.

Р 00 Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. — М.: Гриф и К, 2012. — 944 с.

Рекомендовано Ученым советом ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздравсоцразвития России
22 декабря 2011 г., протокол № 6

Настоящий документ не может быть полностью или частично воспроизведен, тиражирован и распространен в качестве официального издания без разрешения ФГБУ «НЦЭСМП» Минздравсоцразвития России

ОГЛАВЛЕНИЕ

Предисловие	6
Нормативные правовые акты, регламентирующие доклинические исследования безопасности и эффективности лекарственных средств в Российской Федерации	8
Федеральный закон Российской Федерации об обращении лекарственных средств (ст. 4, 11)	8
Перечень нормативных правовых актов	8

Раздел I. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Глава 1. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств	13
Дополнение 1. Особенности изучения общетоксического действия лекарственных средств и средств медицинского назначения, содержащих наночастицы	25
Дополнение 2. Особенности оценки токсичности воспроизведенных лекарственных средств	35
Дополнение 3. Особенности токсикологического изучения лекарственных средств природного происхождения	37
Дополнение 4. Методические рекомендации по изучению общетоксического действия лекарственных средств, предлагаемых для педиатрической практики	41
Глава 2. Методические рекомендации по оценке алергизирующих свойств лекарственных средств	51
Глава 3. Методические рекомендации по оценке иммунотоксического действия лекарственных средств	64
Глава 4. Методические рекомендации по изучению репродуктивной токсичности лекарственных средств	80
Глава 5. Методические рекомендации по оценке мутагенных свойств лекарственных средств	94
Глава 6. Методические рекомендации по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях	115
Глава 7. Методические рекомендации по оценке канцерогенности лекарственных средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах	129
Глава 8. Методические рекомендации по доклиническому исследованию канцерогенных свойств лекарственных средств в хронических исследованиях на животных	163
Глава 9. Методические рекомендации по доклиническому изучению безопасности лекарственных средств, полученных на основе биотехнологий	168
Глава 10. Методические рекомендации по доклинической оценке безопасности взаимодействия лекарственных средств	177
Глава 11. Методические рекомендации по доклиническому изучению безопасности вспомогательных веществ в лекарственных препаратах	188

Раздел II. ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Глава 12. Методические рекомендации по изучению анальгетической активности лекарственных средств	197
Глава 13. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с противопаркинсонической активностью	219
Глава 14. Методические рекомендации по доклиническому изучению противосудорожной активности лекарственных средств	235

Глава 15. Методические рекомендации по изучению нейролептической активности лекарственных средств	251
Глава 16. Методические рекомендации по доклиническому изучению транквилизирующего (анксиолитического) действия лекарственных средств	264
Глава 17. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия	276
Глава 18. Методические рекомендации по доклиническому изучению аддиктивного потенциала лекарственных средств	297
Глава 19. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств для лечения алкоголизма	310
Глава 20. Методические рекомендации по изучению местноанестезирующей активности лекарственных средств	334
Глава 21. Методические рекомендации по изучению гипотензивной активности лекарственных средств	363
Глава 22. Методические рекомендации по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств	375
Глава 23. Методические рекомендации по доклиническому изучению антиаритмических лекарственных средств	385
Глава 24. Методические рекомендации по изучению противоишемического (антиангинального) действия лекарственных средств	417
Глава 25. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на эндотелий кровеносных сосудов	434
Глава 26. Методические рекомендации по изучению гиполипидемического и антисклеротического действия лекарственных средств	445
Глава 27. Методические рекомендации по изучению лекарственных средств, влияющих на гемостаз	453
Глава 28. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени	478
Глава 29. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для лечения бронхиальной астмы и хронической обструктивной болезни легких	486
Глава 30. Методические рекомендации по доклиническому изучению противокашлевых и муколитических лекарственных средств	502
Глава 31. Методические рекомендации по доклиническому изучению противомикробной активности лекарственных средств	509
Глава 32. Методические рекомендации по доклиническому изучению специфической противовирусной активности лекарственных средств	525
Глава 33. Методические рекомендации по изучению специфической активности индукторов интерферонов	550
Глава 34. Методические рекомендации по изучению противотуберкулезной активности лекарственных средств	566
Глава 35. Методические рекомендации по изучению противогрибковой активности лекарственных средств	576
Глава 36. Методические рекомендации по изучению антипротозойной активности лекарственных средств	585
Глава 37. Методические рекомендации по доклиническому изучению антигельминтной активности лекарственных средств	603
Глава 38. Методические рекомендации по доклиническому изучению иммуностропной активности лекарственных средств	624
Глава 39. Методические рекомендации по доклиническому изучению противоопухолевой активности лекарственных средств	640
Глава 40. Методические рекомендации по изучению фотоиндуцированных противоопухолевых свойств лекарственных средств	655
Глава 41. Методические рекомендации по доклиническому изучению пероральных лекарственных средств для лечения сахарного диабета	670
Глава 42. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств для коррекции сахарного диабета, ожирения и метаболического синдрома	685

Глава 43. Методические рекомендации по определению специфической фармакологической активности стероидных гормонов и их антагонистов.....	700
Глава 44. Методические рекомендации по изучению гепатопротективной активности лекарственных средств	710
Глава 45. Методические рекомендации по изучению противорвотной активности лекарственных средств.....	719
Глава 46. Методические рекомендации по доклиническому изучению простатотропной активности лекарственных средств.....	725
Глава 47. Методические рекомендации по доклиническому изучению дерматотропных лекарственных средств.....	738
Глава 48. Методические рекомендации по доклиническому изучению нестероидных противовоспалительных лекарственных средств	746
Глава 49. Методические рекомендации по изучению гемостимулирующей активности лекарственных средств	759
Глава 50. Методические рекомендации по доклиническому изучению антиоксидантной активности лекарственных средств.....	767
Глава 51. Методические рекомендации по изучению специфической активности лекарственных средств для регенеративной медицины	776
Глава 52. Методические рекомендации по доклиническому изучению активности лекарственных средств, повышающих физическую работоспособность	788
Глава 53. Методические рекомендации по доклиническому изучению эффективности и безопасности лекарственных средств и их комбинаций, обладающих свойствами антидотов	798
Глава 54. Методические рекомендации по доклиническому изучению кровезаменителей — переносчиков кислорода.....	812
Глава 55. Методические рекомендации по доклиническому изучению противошоковых (гемодинамических) кровезаменителей направленного и полифункционального действия	818
Глава 56. Методические рекомендации по доклиническому изучению лекарственных средств, разрабатываемых на основе природного сырья.....	827
Дополнение 1. Рекомендуемый объем изучения фармакологической активности и токсикологических свойств лекарственных средств природного происхождения в зависимости от инновационности	832
Дополнение 2. Особенности доклинического изучения новой лекарственной формы, разрабатываемой из лекарственного растительного сырья, — сырье растительное порошок в фильтр-пакетах	836

Раздел III. ОБЩИЕ МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ОЦЕНКЕ ОТНОШЕНИЯ ОЖИДАЕМОЙ ПОЛЬЗЫ К ВОЗМОЖНОМУ РИСКУ ПРИМЕНЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Глава 57. Методические рекомендации по проведению доклинических исследований фармакокинетики лекарственных средств.....	843
Глава 58. Методические рекомендации по определению безопасной дозы лекарственного препарата для проведения I-фазы клинических исследований у взрослых волонтеров.....	854
Глава 59. Методические рекомендации по разработке плана доклинических исследований лекарственных средств.....	866
Глава 60. Рациональный выбор наименований лекарственных средств (Методические рекомендации)	872
Глава 61. Методические рекомендации по статистической обработке результатов доклинических исследований лекарственных средств	889

ПРЕДИСЛОВИЕ

Стремление к сохранению здоровья населения, увеличению продолжительности жизни и улучшению ее качества является основным вектором развития биологии, медицины и системы здравоохранения в развитых странах. Наличие современных доступных лекарственных препаратов является основой лечения и профилактики подавляющего большинства болезней современного человека и показателем социального и экономического развития общества. Создание и внедрение новых высокоэффективных лекарственных средств является приоритетной задачей ученых, технологов, врачей и государственных органов здравоохранения.

Достижения современной науки позволяют разрабатывать и использовать для получения новых лекарственных препаратов самые передовые технологии. Однако успешное внедрение в клиническую практику новых методов лекарственного лечения предполагает наличие доказанной в соответствии с современными требованиями высокой степени эффективности и безопасности применения новых лекарств. Для этого должен выполняться определенный порядок проведения научных исследований на различных уровнях, важнейшим из которых является оценка специфической фармакологической активности и безопасности на этапе доклинических экспериментальных исследований. Целью доклинических исследований является получение научными методами оценок и доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственных средств (№ 61-ФЗ от 12 апреля 2010 г., статья 11).

Результаты доклинических исследований лекарственных средств необходимо представлять с целью регистрации или проведения клинических исследований лекарственного препарата в РФ (№ 61-ФЗ от 12 апреля 2010 г., статья 18, часть 3, пункт 9 и статья 20, часть 1).

Необходимый объем доклинических исследований:

1. Воспроизведенные ЛС:

Общетоксические свойства:

острая и подострая (субхроническая) токсичность, местнораздражающее действие в сравнении с зарегистрированным аналогом.

2. Оригинальные ЛС:

2.1. Общетоксические свойства:

острая и подострая (субхроническая) токсичность, хроническая токсичность, местнораздражающее действие.

2.2. Специфические виды токсичности:

мутагенность;

репродуктивная токсичность;

канцерогенное действие;

аллергизирующее действие;

иммунотоксическое действие.

2.3. Фармакологическая безопасность.

2.4. Специфическая фармакологическая активность.

2.5. Фармакокинетические исследования.

В создании настоящего «Руководства по проведению доклинических исследований лекарственных средств» приняли участие ведущие специалисты Российской Федерации, работающие в разных областях теоретической и практической медицины.

Настоящее издание разработано в соответствии с проводимой в Российской Федерации политикой в сфере обращения лекарственных средств, направленной на обеспечение

населения эффективными и безопасными, в первую очередь отечественными лекарственными средствами, созданными на основе современных достижений биологии, медицины и фармацевтических технологий. Рекомендации, вошедшие в настоящее издание, являются важным этапом повышения качества доклинических исследований в нашей стране и, кроме этого, будут способствовать созданию условий, необходимых для продвижения отечественных лекарственных препаратов за рубежи нашей страны.

*Генеральный директор
ФГБУ «НЦЭСМП»
Минздравоуразвития России
д. м. н. А.Н. Миронов*

НОРМАТИВНЫЕ ПРАВОВЫЕ АКТЫ, РЕГЛАМЕНТИРУЮЩИЕ ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Федеральный закон Российской Федерации об обращении лекарственных средств (ст. 4, 11) от 12 апреля 2010 года № 61-ФЗ

Статья 4. Основные понятия, используемые в настоящем Федеральном законе.

Для целей настоящего Федерального закона используются следующие основные понятия:

40) доклиническое исследование лекарственного средства — биологические, микробиологические, иммунологические, токсикологические, фармакологические, физические, химические и другие исследования лекарственного средства путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства;

Статья 11. Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения

1. Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится путем применения научных методов оценок в целях получения доказательств безопасности, качества и эффективности лекарственного средства.

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

3. Для организации и проведения доклинического исследования лекарственного средства для медицинского применения разработчики лекарственных средств могут привлекать научно-исследовательские организации, образовательные учреждения высшего профессионального образования, имеющие необходимую материально-техническую базу и квалифицированных специалистов в соответствующей области исследования.

4. Доклиническое исследование лекарственного средства для медицинского применения проводится по утвержденному разработчиком лекарственного средства плану с ведением протокола этого исследования и составлением отчета, в котором содержатся результаты этого исследования и заключение о возможности проведения клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения.

5. Проведение проверок соблюдения правил лабораторной практики и правовых норм использования животных при проведении доклинических исследований лекарственных средств для медицинского применения осуществляется уполномоченным федеральным органом исполнительной власти.

6. Результаты доклинического исследования лекарственного средства для медицинского применения могут быть представлены в уполномоченный федеральный орган исполнительной власти в установленном порядке в целях государственной регистрации лекарственного препарата.

Перечень нормативных правовых актов

1. Конституция Российской Федерации от 12 декабря 1993 г.
2. Гражданский кодекс Российской Федерации от 18 декабря 2006 г. № 230-ФЗ.

3. Федеральный закон «Об основах охраны здоровья граждан в Российской Федерации» от 21 ноября 2011 г. № 232-ФЗ.
4. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (в ред. Федеральных законов от 27.07.2010 № 192-ФЗ, от 11.10.2010 № 271-ФЗ, от 29.11.2010 № 313-ФЗ).
5. Федеральный закон от 8 января 1998 г. № 3-ФЗ «О наркотических средствах и психотропных веществах».
6. Федеральный закон от 9 января 1996 г. № 3-ФЗ «О радиационной безопасности населения».
7. Федеральный закон от 7 февраля 1992 г. «О защите прав потребителя» № 2300-1;
8. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» (утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 сентября 2005 г. № 232-ст).
9. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (утв. и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. № 544-ст).
10. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 755н «Об утверждении порядка определения уровня профессиональной подготовки экспертов Федерального государственного бюджетного учреждения по проведению экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и аттестации их на право проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения».
11. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 748н «Об утверждении порядка выдачи разрешения на проведение клинического исследования лекарственного препарата для медицинского применения».
12. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 749н «Об утверждении формы документа, содержащего результаты мониторинга безопасности лекарственного препарата для медицинского применения в целях подтверждения его государственной регистрации».
13. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 750н «Об утверждении правил проведения экспертизы лекарственных средств для медицинского применения и формы заключения комиссии экспертов».
14. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 757н «Об утверждении порядка осуществления мониторинга безопасности лекарственных препаратов для медицинского применения, регистрации побочных действий, серьезных нежелательных реакций, непредвиденных нежелательных реакций при применении лекарственных препаратов для медицинского применения».
15. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 26 августа 2010 г. № 759н «Об утверждении порядка представления необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для медицинского применения в целях его государственной регистрации».
16. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».
17. Государственный реестр лекарственных средств [<http://grls.rosminzdrav.ru>].
18. Распоряжение Правительства РФ от 11 ноября 2010 г. № 1938-р «Об утверждении перечня жизненно необходимых и важнейших лекарственных препаратов на 2011 год».
19. Методические указания Минздравсоцразвития РФ от 12 мая 2008 г. «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств».
20. Методические рекомендации Росздравнадзора от 7 декабря 2009 г. «Подготовка текста инструкции по медицинскому применению лекарственного препарата».
21. Методические рекомендации Минздравсоцразвития России от 10 октября 2005 г. «Рациональный выбор названий лекарственных средств».
22. INN (International nonproprietary names)/WHO [www.mednet.who.int].

23. Medical Dictionary for Regulatory Activities (MedDRA) [www.meddrasso.com].
24. Рекомендации Росздравнадзора для фармацевтических компаний по изучению биотрансформации и транспортеров новых лекарственных средств: дизайн исследований, анализ данных и внесение информации в инструкцию по медицинскому применению от 05 февраля 2009 г.
25. Система стандартов по информации, библиотечному и издательскому делу. Отчет о научно-исследовательской работе. Структура и правила оформления. ГОСТ 7.32-2001 (введен Постановлением Госстандарта РФ от 04.09.2001 г. № 367-ст) (ред. от 01.12.2005).
26. Правила надлежащей лабораторной практики Таможенного союза. Приложение к Решению Комиссии Таможенного союза от 2 марта 1999 г. № 564.
27. Правила надлежащей клинической практики Таможенного союза. Приложение к Решению Комиссии Таможенного союза от 2 марта 2011 г. № 565.
28. Приказ Минздравсоцразвития России от 23 ноября 2011 г. № 1413н «Об утверждении Методических рекомендаций по содержанию и оформлению необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для медицинского применения в целях его государственной регистрации».

РАЗДЕЛ I

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ГЛАВА 1

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; д. м. н., проф. И.В. Березовская;
д. м. н. О.Л. Верстакова; член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова; член-корр. РАМН,
проф. А.Д. Дурнев; к. б. н. А.С. Иванова; к. б. н. Л.В. Крепкова; к. б. н. А.В. Сорокина*

Введение

Доклинические токсикологические исследования направлены на выявление и оценку выраженности токсических эффектов, возникающих при взаимодействии фармакологического вещества с организмом лабораторных животных. Согласно Федеральному закону от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» они являются неотъемлемой частью доклинических исследований, направленных на получение доказательств безопасности лекарственных средств (ЛС). Конечной целью доклинических токсикологических исследований является получение данных, достаточных для определения возможности и риска проведения клинических исследований (КИ) ЛС.

Доклинические исследования проводятся в соответствии с существующими правилами лабораторной практики, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти РФ (Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики»).

При исследовании общетоксического действия решаются следующие задачи:

1. Выявляются переносимые и токсические дозы фармакологического вещества.
2. Устанавливаются органы и системы организма, наиболее чувствительные к изучаемому фармакологическому веществу, определяется характер и степень патологических изменений.
3. Определяется зависимость токсических эффектов от дозы и длительности применения фармакологического вещества и обратимость патологических изменений.

1. Общие положения. Условия проведения эксперимента

Токсикологические исследования обязательны для субстанции оригинального фармакологического вещества и всех лекарственных форм на ее основе. Если лекарственная форма содержит вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители и т.п.), не разрешенные для применения в медицинской практике, то каждое из этих веществ подвергают отдельному токсикологическому исследованию. 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 способа получения фармакологического вещества или лекарственной формы проводится повторная токсикологическая оценка на одном наиболее чувствительном виде животных, который определяется исходя из данных первоначальных исследований.

При изменении количественного соотношения ингредиентов в лекарственной форме или увеличении дозировки следует провести ревизию уже имеющихся данных для обо-

снованного решения вопроса о необходимости проведения дополнительных токсикологических исследований и их объеме.

2. Фармакологическое вещество

Сведения о структуре, физико-химических свойствах, растворимости, условиях хранения, фармакологической активности с представлением данных экспериментальных исследований, предполагаемых дозах и путях введения в клинику, а также другие значимые для проведения эксперимента сведения о свойствах субстанции фармакологического вещества или его лекарственной формы, предоставляются разработчиком. В том числе в виде предварительной нормативной документации (проект ФС, аналитический паспорт вещества и пр.) на фармакологическое вещество.

Для лекарственных форм предоставляются проект ФСП, сертификат соответствия и характеристика вспомогательных веществ, использованных при ее получении (растворители, наполнители, стабилизаторы и др.).

3. Общие принципы выполнения исследований

Токсикологические исследования проводят на здоровых половозрелых животных и, при необходимости, на животных моделях патологических состояний. Это правило имеет ряд исключений.

1. Фармакологические вещества, предполагаемые для применения у детей, следует тестировать на новорожденных и неполовозрелых животных.

2. Фармакологические вещества, предназначенные для разработки гериатрических лекарств, следует тестировать на старых животных.

3. Фармакологические вещества, предназначенные для разработки лекарств для беременных, исследуют на беременных животных.

4. Лабораторные животные

Для токсикологических исследований применяют здоровых половозрелых животных, полученных из сертифицированных питомников и прошедших карантин в течение 10–14 дней. Получение животных от не сертифицированных производителей не допускается.

Исследования проводят на нескольких видах животных, причем наряду с грызунами обязательно использовать не грызунов. Для токсикологических исследований рекомендуются мыши, крысы, морские свинки, кролики, собаки, мини-свиньи и обезьяны.

Токсикологические исследования можно проводить как на нелинейных, так и на линейных животных. В последнем случае следует указать линию животных, поскольку чувствительность к токсическому действию может быть генотипически зависима. При прочих равных условиях в исследованиях по определению острой и хронической токсичности предпочтительнее использование аутбредных животных.

Исследования проводят на животных обоего пола одного возраста, разброс по исходной массе не должен превышать $\pm 10\%$.

Содержание животных определяется Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

Рекомендуется содержание грызунов в индивидуальных клетках, также неприемлема излишняя скученность животных.

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, состава корма, времени кормления и др.). В этой связи условия содержания животных, получающих фармакологическое вещество, и контрольных животных должны быть идентичными.

Животные содержатся на стандартных, сертифицированных комбикормах в соответствии с действующими нормами при свободном доступе к воде и пище.

4. Стандартные процедуры при работе с лабораторными животными

Все исследовательские работы с лабораторными животными выполняются в соответствии с общепринятыми этическими нормами обращения с животными, на основе стандартных операционных процедур, принятых в организации — производителе исследований, которые соответствуют правилам, принятым Европейской Конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для исследовательских и иных научных целей (European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986).

5. Планирование эксперимента

При планировании хронического токсикологического исследования следует учитывать возможную необходимость оценки динамики возможного токсического эффекта, что особенно важно при длительности введения свыше 3-х месяцев. С этой целью в исследование вводят группы животных, предназначенных для исследований в промежуточные сроки. Кроме того, необходимо предусматривать изучаемые группы для оценки обратимости наблюдаемых эффектов («отставленные группы»).

Число животных в каждой группе должно быть достаточным для того, чтобы оценить характер и частоту проявления токсических эффектов и подвергнуть результаты исследований адекватной статистической обработке. Группа должна содержать не менее 10 особей каждого пола. Данные, полученные на самках и самцах, учитываются и анализируются отдельно.

Фармакологические вещества вводят в фиксированное время суток с целью предупреждения ошибок, связанных с суточными ритмами. Для исключения ошибок, связанных с сезонными ритмами, обязательно параллельное ведение групп животных, получающих фармакологическое вещество, и контрольных.

При исследовании хронической токсичности фармакологических веществ не рекомендуется применение дополнительных растворителей. При необходимости их использования исследование должно быть дополнено еще одной изучаемой группой — «контроль на растворитель».

6. Изучение острой токсичности

6.1. Общие положения

Острая токсичность — токсиметрическая характеристика фармакологического вещества или лекарственного препарата (ЛП), выражающая его способность вызывать гибель животных при однократном введении или при введении через короткие (не более 6 ч) интервалы времени в течение суток.

Целью изучения острой токсичности является определение переносимых, токсических и летальных доз фармакологического вещества и причин наступления гибели животных с анализом клинической картины интоксикации.

Параметры острой токсичности ЛС могут быть вычислены с помощью любых статистических методов, однако предпочтительнее пользоваться методами, позволяющими провести сравнительную оценку исследованных параметров для двух или более фармакологических веществ. Используемый метод расчета среднелетальных доз должен быть обязательно указан в отчете, например, «метод Литчфилда и Уилкоксона».

В исследованиях с использованием крупных животных достаточно описания токсических эффектов без достижения летальности.

6.2. Вид и количество лабораторных животных

Острая токсичность изучается на нескольких видах животных. Причем обязательно используют тот вид животных, на которых была показана специфическая фармаколо-

гическая активность вещества и которые будут использоваться при исследовании хронической токсичности. Обычно используют 2 вида животных. Исследования на самцах и самках проводят раздельно, минимальный размер группы 5–6 особей грызунов, при использовании собак или кроликов 3–5 особей.

Полученные результаты должны адекватно обеспечить возможность вычисления LD_{50} , что предполагает наличие среди изучаемых групп одной группы со 100% летальностью и одной, в которой гибель животных отсутствует. Если из-за низкой токсичности фармакологического вещества нельзя определить LD_{50} , следует указать максимальную дозу, которая была введена животным, но не менее 2 г/кг.

6.3. Пути введения

У мелких лабораторных животных токсичность фармакологического вещества исследуют при нескольких путях введения, причем обязательно используется тот путь, при котором была показана специфическая фармакологическая активность вещества, и путь, который предполагается для клинического применения. Фармакологические вещества, предназначенные для системного введения, вводят перорально 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.

Фармакологические вещества, предлагаемые для приема внутрь, следует вводить через зонд, закладывая на корень языка.

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.

6.4. Продолжительность наблюдения и регистрация картины интоксикации

Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности должна составлять не менее 14 дней, 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 шерстного 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, характеризующие токсическое действие. Для соответствующих групп фармакологических веществ целесообразно исследовать некоторые гематологические показатели (морфологические, биохимические, свертываемость крови).

Обязательна регистрация сроков развития интоксикации и гибели животных. Целесообразно проведение макроскопического исследования внутренних органов погибших животных, а в случае отсроченной гибели животных — и микроскопическое исследование (степень кровенаполнения органов, наличие кровоизлияний, изъязвлений слизистых оболочек и др.).

Рекомендуемая форма представления результатов приведена в таблице (табл. 1).

Таблица 1

Форма представления результатов

Вид животных	Пол	Дозы в мг/кг	Число животных в группе/число погибших животных	ЛД ₁₀	ЛД ₁₆	ЛД ₅₀ с доверительными интервалами	ЛД ₈₄

6.5. Исследование кумуляции

При выборе доз для исследования хронической токсичности фармакологического вещества следует учитывать его кумулятивное действие. Поэтому до проведения хронических токсикологических исследований часто возникает потребность в определении индекса кумуляции фармакологического вещества, т. е. отношение ЛД₅₀ при однократном введении к ЛД₅₀ при кратном введении. Для этой цели можно использовать различные методы, основанные на учете гибели животных при повторном введении фармакологического вещества.

Предпочтение следует отдать оценке кумуляции методом Lim R.K. (1961), позволяющим оценить не только кумулятивные свойства, но и привыкание.

В таблице 2 приведен алгоритм изучения кумуляции методом субхронической токсичности по Lim R.K. и соавторам (минимальное число животных в группе 10 особей).

Таблица 2

Изучение кумуляции методом субхронической токсичности

Дни введения	Доля от ЛД ₅₀ при однократном введении
1–4	0,1
5–8	0,15
9–12	0,22
13–16	0,34
17–20	0,50
21–24	0,75
25–28	1,12

Суммарная доза за 24 дня – 12,8 ЛД₅₀, максимальная продолжительность эксперимента 24±4 дня. Вывод об эффекте вещества делается на основании величины коэффициента К, при К < 1 – кумуляция, или К > 1 – привыкание. Коэффициент определяется как частное из отношения ЛД₅₀ при однократном введении к ЛД₅₀ при повторных введениях.

7. Изучение хронической токсичности

7.1. Общие положения

Целью хронических токсикологических исследований является характеристика повреждающего действия фармакологического вещества при его длительном введении, выявление наиболее чувствительных органов и систем организма, а также исследование возможности обратимости вызываемых повреждений.

Продолжительность введения фармакологического вещества при изучении хронической токсичности зависит от предполагаемой длительности его применения в клинике, планируемой фазы КИ и видовой принадлежности лабораторных животных (см. табл. 3).

Таблица 3

*Продолжительность введения фармакологического вещества
в хроническом токсикологическом исследовании*

Длительность клинических исследований	Минимальная длительность исследований токсичности многократной дозы (грызуны/не грызуны)	
	Фаза I/II	Фаза III
До 2 недель	2 недели /2 недели	1 месяц/1 месяц
До 1 месяца	1 месяц/1 месяц	3 месяца /3 месяца
До 3 месяцев	3 месяца /3 месяца	3 месяца /3 месяца
До 6 месяцев	6 месяцев/6 месяцев*	6 месяцев/6 месяцев*
>6 месяцев	6 месяцев/6 месяцев*	6 месяцев/6 месяцев*

*) Допускается более длительное введение препаратов.

7.2. Вид и количество лабораторных животных

Хроническую токсичность изучают не менее чем на двух видах животных. Желательно использовать животных, на которых были получены сведения о специфической фармакологической активности вещества.

Изучение хронической токсичности проводится на крысах, кроликах и/или собаках. Группы животных формируют из самок и самцов.

7.3. Пути введения фармакологического вещества

Путь введения фармакологического вещества в эксперименте должен соответствовать рекомендованному для КИ. Фармакологическое вещество, предназначенное для применения внутрь, вводят лабораторным животным через зонд в желудок или закладывая на корень языка, так как это обеспечивает более точное дозирование, чем добавление фармакологического вещества в корм. Количество фармакологического вещества, получаемого животным за один прием, выражают на единицу массы тела или единицу поверхности тела животного в пересчете на действующее вещество. Фармакологическое вещество вводят в виде субстанции и/или лекарственной формы. Лекарственные формы, предназначенные для регулируемого высвобождения вещества, не подлежат измельчению.

7.4. Исследуемые дозы

Хроническую токсичность фармакологического вещества при его системном применении исследуют в двух–трех дозах. При выборе доз руководствуются результатами, полученными при исследовании специфической фармакологической активности и острой токсичности фармакологического вещества, его способностью вызывать кумулятивный эффект, а также предполагаемыми максимальными суточными дозами, в которых фармакологическое вещество рекомендовано для клинического изучения.

Введение максимальной дозы предполагает выявление возможных токсических эффектов или гибель части животных. Эта доза может быть определена из данных по острой токсичности. Минимальная доза должна быть близка к терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения, с учетом соответствующих коэффициентов. Третья доза является промежуточной.

Фармакологические вещества, предназначенные для ежедневного применения у человека, вводят животным 7 дней в неделю.

7.4.1. Межвидовой перенос доз

При планировании и проведении токсического исследования часто возникает потребность в межвидовых пересчетах доз. Это существенная проблема, поскольку сегодня не существует универсального алгоритма пересчета доз для всех классов фармакологических соединений. Принципиально, что выбор способа перерасчета дозы всегда должен быть научно обоснован. Для одних веществ (психотропные, адаптогенные, нейропротекторные и ряд других) приемлем прямой перенос дозы с единицы массы животных одного вида на единицу массы животных другого вида. Для других соединений, относящихся к цитотоксическим ядам (цитостатики, антиаритмики, антипаразитарные и ряд других), адекватен перерасчет исходя из поверхности тела.

7.5. Наблюдение за животным и регистрация картины интоксикации

На протяжении всего исследования животные должны находиться под ежедневным наблюдением; отмечают потребление корма и воды, состояние шерстного покрова и слизистых оболочек, поведение. Один раз в неделю животных взвешивают, регулярно (в исследовании продолжительностью свыше 1 месяца — не менее 2 раз) исследуют функциональное состояние сердечно-сосудистой, нервной, выделительной и пищеварительной систем, изучают морфологические и биохимические показатели крови. Методы исследования для оценки функционального состояния органов и систем организма выбирает исследователь: они должны быть современными и достаточно чувствительными, чтобы обеспечить регистрацию признаков возможного повреждающего действия изучаемого фармакологического вещества.

Примерная программа оценки токсичности фармакологического вещества представлена в приложении 1.

Все животные, погибшие в течение исследования, подвергаются вскрытию для установления характера повреждающего действия фармакологического вещества. До и после окончания введения фармакологического вещества проводят максимально полное обследование животных с помощью гематологических, биохимических и физиологических тестов. Животных каждой группы подвергают эвтаназии с оценкой макроскопических исследований. Проводят патологоанатомическое вскрытие с оценкой макроскопической картины места введения препарата и внутренних органов, определяют их абсолютную и относительную массу, проводят гистологическое исследование. За животными «отставленной» группы проводят наблюдение в течение 1 месяца, после чего их обследуют в том же объеме, что и животных, подвергшихся эвтаназии сразу после окончания введения фармакологического вещества. Исследования на мелких лабораторных животных проводят с таким расчетом, чтобы полученные результаты можно было подвергнуть статистической обработке.

При оценке изменений, наблюдаемых у животных в хроническом токсикологическом исследовании, необходимо исключить возможность влияния всех побочных факторов, не связанных с приемом препарата (содержание, кормление, заболевание животных и т. п.).

Могут возникнуть флуктуационные изменения гемограмм, биохимических показателей и анатомических характеристик, которые следует учитывать при объяснении результатов. В ряде случаев в дополнение к указанным выше методам может потребоваться применение дополнительных биохимических исследований, электронной микроскопии, гистохимических, автордиографических и других методов исследования.

Патологические изменения, возникающие у животных после введения высоких доз фармакологического вещества, дают ценную информацию для характеристики его токсических свойств, однако эта информация должна быть подвергнута тщательному анализу и полученные результаты следует рассматривать в качестве предупреждения, а не противопоказания для КИ.

8. Обработка и хранение данных, подготовка отчета и заключения по результатам исследований

Первичные данные доклинического токсикологического исследования должны документироваться и храниться в соответствии с требованиями, определяемыми Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

В отчете представляются все первичные данные в виде таблиц и/или графиков, они должны быть обработаны статистически, заключения и выводы должны базироваться на статистических заключениях. Общие принципы статистической обработки данных биологических исследований представлены в специальном разделе настоящего руководства.

Оформление отчета осуществляется в соответствии с ГОСТом 7.32-2001 «Отчет о научно-исследовательской работе» и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

Заключение должно содержать обоснованное мнение авторов о возможности КИ изученного ЛС. При решении и обосновании этого вопроса следует учитывать следующие факторы:

1. Терапевтическую широту фармакологического вещества, т.е. соотношение минимальной токсической и терапевтической доз.

2. Характер и обратимость выявленной патологии.

Заключение должно содержать суждения исследователей о степени опасности острого и хронического отравления, прогноз возможных побочных реакций и рекомендации по необходимым ограничениям применения ЛС при КИ.

Схема отчета об исследовании общетоксического действия фармакологического вещества

Отчет должен содержать следующие разделы: титульный лист, список исполнителей, оглавление, реферат, введение и общие положения, материалы и методы, результаты проведенных исследований, заключение, список литературы, приложение.

Титульный лист: содержит название организации-исполнителя, утверждение отчета, заверенное подписью руководителя учреждения и печатью организации, название отчета, должность, фамилию, имя, отчество и подпись руководителя проведенных исследований.

Список исполнителей: ответственный исполнитель, исполнители — фамилия, имя, отчество, должность, степень, звание, подпись.

Оглавление: перечень разделов с указанием страниц отчета.

Введение: цели и задачи исследования.

Обзор литературы: информация об оригинальном фармакологическом веществе или литературные сведения о воспроизведенном препарате.

Материалы и методы: физико-химическая характеристика субстанции и лекарственной формы, их соответствие проекту нормативной документации (ФСП, ФС или количественный и качественный состав лекарственной формы воспроизведенного ЛП, серия, соответствие проекту ФСП).

Характеристика использованных лабораторных животных (источник получения, масса, возраст, пол, условия содержания).

Схема исследования, обоснование выбранных доз.

Описание методов исследования и метода статистической обработки данных.

Результаты проведенных исследований: описание острой токсичности, кумуляции и хронической токсичности в соответствии с полученными достоверными изменениями изученных показателей и результатами патоморфологических исследований, способ эвтаназии животных.

Заключение: краткое обсуждение полученных результатов, прогноз возможных побочных эффектов, рекомендуемые ограничения или необходимый контроль при проведении КИ.

Список литературы.

Приложение: таблицы индивидуальных показателей и результаты их статистической обработки по всем изученным тестам, индивидуальное описание гистологических изменений органов и тканей лабораторных животных.

Приложение 1

Перечень рекомендуемых тестов

Рекомендуемые исследования	Рекомендуемые тесты и показатели
Интегральные показатели	Внешний вид, поведение, симптомы интоксикации, масса тела (еженедельно), суточное потребление корма и воды (еженедельно)
Гематологические исследования	Содержание в периферической крови эритроцитов, тромбоцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, лейкоцитарная формула, гемоглобин, гематокрит, коагулограмма, резистентность эритроцитов
Биохимические исследования	В сыворотке крови: общий белок, белковые фракции, общий холестерин, общие липиды, глюкоза триглицериды, активность основных ферментов, имеющих диагностическое значение (ЩФ, АЛТ, АСТ, ЛДГ и др.) В моче: концентрация мочевины, креатинина, глюкозы, белка
Физиологические исследования	Частота сердечных сокращений, параметры ЭКГ во втором отведении. Диурез, рН, относительная плотность мочи, мочевой осадок. Ритм и глубина дыхания. Поведение в тесте «открытое поле»
Патоморфологические исследования	Вскрытие, макроскопическое описание картины органов и тканей, места введения, определение относительной массы органов, гистологические исследования головного мозга, сердца, печени, почек, легких, селезенки, тимуса, надпочечников, желудка, кишечника, мочевого пузыря, поджелудочной железы, щитовидной железы, лимфоузлов, костного мозга, семенников, яичников и места введения

Приложение 2

*Максимально допустимые объемы введения жидкостей (в мл)
для некоторых видов лабораторных животных в зависимости от пути введения*

Вид животного	Масса тела (г)	Путь введения				
		в желудок	под кожу	в мышцу	в вену	в брюшную полость
Мышь	20–24	0,5	1,0	0,5	0,5	1,0
	25–30	0,8	1,0	0,5	0,5	1,0
	> 30	1,0	1,0	0,5	0,5	1,0
Крыса	100–200	3,0	10	5,0	2,0	5,0
	200–240	5,0	10	5,0	2,0	5,0
	240–300	6,0	10	5,0	2,0	5,0
	> 300	8,0	10	5,0	2,0	5,0
Морская свинка	250–300	5,0	15	5,0	8,0	5,0

Вид животного	Масса тела (г)	Путь введения				
		в желудок	под кожу	в мышцу	в вену	в брюшную полость
Кролик	2000–2400	100	30	15	20	30
	2400–3000	150	30	15	20	30
	> 3000	300	30	15	20	30

Приложение 3

Соотношение между массой и площадью поверхности тела человека и лабораторных животных

Объект	Масса тела (г)	Поверхность тела (см ²)	Соотношение (см ² /кг)	Коэффициент пересчета доз (мг/кг) с животных на человека
Человек	70 000	18 000	257	–
Кролик	1 500	1 240	826	3,2
Морская свинка	400	480	1200	4,7
Крыса	200	304	1517	5,9
Мышь	20	61	3050	11,8

Приложение 4

Основные физиологические параметры животных, используемых при исследовании острой и хронической токсичности

Параметр	Мыши	Крысы	Морские свинки	Кролики	Собаки (лабораторные породы)
Продолжительность жизни (годы)	1–2,5	2–3	4–6	5–7	12–14
Масса взрослых самцов (г)	20–35	350–400	1000–1200	3000–5500	6–25
Масса взрослых самок (г)	20–35	180–200	850–900	3000–5500	6–25
Масса при рождении (г)	1–1,5	5–6	90–120	40–60	300–500
Потребление корма (г/сутки)	5–10	15–20	20–30	75–100	250–1200
Потребление воды (мл/сутки)	3–7	20–30	12–15	80–100 мл/кг	100–400
Половое созревание самцов (мес/вес)	1,5–2–8/20	2,5–3/300	2,5–3/600	4–7/2,5–4	9–12
Половое созревание самок (мес/вес)	1,5–2/20	2–3/200	7–8/350	4–7/2,5–4	10–12
Эстральный цикл (дни)	4–5	4–5	16–18	Полиэструс	Дважды в год
Продолжительность беременности (дни)	19–21	20–22	65–70	30–32	56–58
Прекращение подсосного периода (день/вес)	21/8–12	21/35–44	7–14/150–200	8–30/1–1,5	6–8/15–45
Средний размер помета (особи)	10–12	8–12	2–5	4–12	4–8

Параметр	Мыши	Крысы	Морские свинки	Кролики	Собаки (лабораторные породы)
Рекомендуемая схема спаривания	1:1 или 1:n	1:1 или 1:n	1:1 или 1:10	1:1	1:1 или 1:n
Объем крови (от массы тела)	6–7%	6–7%	6–7%	6%	8–9%
Максимальный объем забора крови (мл/кг)	7–8	6–7	7–8	6,5–7,5	8–10
Эритроциты ($\times 10^{12}$ /л)	7–12 \times	6–10 \times	4,5–7 \times	4,5–7 \times	5,5–8,5 \times
Лейкоциты ($\times 10^9$ /л)	3–12 \times	7–14 \times	5–15 \times	5–12 \times	6–14 \times
Гемоглобин (г/л)	130–170	110–180	110–170	110–140	130–180
Гематокрит	40–54%	34–48%	39–47%	32–48%	38–52%
Частота сердечных сокращений (мин)	300–600	250–500	230–300	250–330	80–140
Частота дыхания (мин)	90–160	80–150	60–110	35–55	10–30
Ректальная температура (максимальное значение нормы)	37,5 °С	37,5 °С	39,5 °С	39,5 °С	38,5 °С
pH мочи	6,0–7,5	6,0–7,5	8,0–9,0	8,2	7,0–7,8
Объем мочи (мл/день)	1–3	10–15	15–75	50–130 (на кг)	25–45 (на кг)
Число хромосом (2n)	40	42	64	44	78

Литература

- Беленький М.Л. — В кн.: Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1968. — 151 с.
- Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Хим.-фарм. журн. — 2003. — Т. 37. — № 3. — С. 32–34.
- Березовская И.В., Иванова В.М. Актуальные проблемы безопасности дженериков // Бюллетень ВНИЦ БАВ. — Старая Купавна, 2002. — С. 37–52.
- Березовская И.В., Митрохин Н.М. // Экспресс-методы определения острой токсичности // Бюллетень ВНИЦ БАВ. — М., 1990. — С. 45–67.
- Балынина Е.С., Березовская И.В. Сравнительная оценка методов определения ориентировочной реакции крыс в токсикологическом эксперименте // Фарм. и токсикол. — 1976. — № 5. — С. 635–638.
- Голиков С.Н., Саноцкий И.В., Тиунов Л.А. Общие механизмы токсикологического действия. — Л.: Медицина, 1986. — С. 279.
- Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. — Москва, 2008. — 196 с.
- Куценко С.А. // Основы токсикологии. — СПб.: Фолиант, 2004. — 720 с.
- Липперт Г. Международная система единиц в медицине. — М.: Медицина, 1980. — С. 208.
- Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. проф. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987.
- Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрия) / Под ред. проф. И.В. Саноцкого. — М.: Медицина, 1970. — С. 343.
- Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского и В.А. Филова. — М.: Медицина, 2002. — С. 606.
- Проблема нормы в токсикологии / Под ред. проф. И.М. Трахтенберга. — М.: Медицина, 1991. — С. 204.
- European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimental and other Scientific Purposes (ETS 123). Strasbourg, 1986.
- Freireich E., Gehan E.A., Rail D.E, et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man // Cancer Chemother. Res. 1966. — Vol. 50 — № 4. — P. 219–244.
- Handbook of Toxicology, Second Edition, Ed. by M.J. Derelanko, M.A. Hollinger, CRC Press, 2002.

17. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers./ Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2005.
18. ICH Guideline M3: Non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals (CPMP/ICH/286/95).
19. ICH Guideline S4: Duration of chronic toxicity testing in animals (rodent and non-rodent toxicity testing) (CPMP/ICH/300/95).
20. Lim R.K., Rink K.G., Glass H.G., Soaje-Echague E. // A method for the evaluation of cumulation and tolerance by the determination of acute and subchronic median effective doses / Arch Int Pharmacodyn Ther. 1961; 130: 336–353.

Особенности исследования общей токсичности нанопрепаратов, воспроизведенных ЛП, ЛП природного происхождения, препаратов для педиатрической практики даны в дополнениях к настоящему документу.

ДОПОЛНЕНИЕ 1

ОСОБЕННОСТИ ИЗУЧЕНИЯ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И СРЕДСТВ МЕДИЦИНСКОГО НАЗНАЧЕНИЯ, СОДЕРЖАЩИХ НАНОЧАСТИЦЫ

*Составители: д. м. н., проф., член-корр. РАМН А.Д. Дурнев; д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев;
д. м. н., проф. В.М. Бухман; д. м. н., проф. И.А. Дятлов; к. б. н. В.В. Фирстова;
д. м. н., проф. В.П. Холоденко; д. б. н. В.Н. Герасимов; к. м. н. А.С. Соломина;
к. б. н. В.Д. Потапов, д. м. н., проф. А.А. Чуриш*

Введение

Вещества в наноформе могут обладать иным токсическим действием, чем в обычном физико-химическом состоянии. В этой связи характеристика потенциального риска для здоровья человека фармакологических веществ и средств медицинского применения, содержащих наночастицы, является обязательной.

Современная система доклинической токсикологической оценки ЛС, ориентированная на тестирование химических соединений, не вполне адекватна для оценки лекарственных нанопрепаратов в силу различий в характере распределения и выведения, времени экспозиции тестируемых агентов, сроках проявления возможных токсических эффектов и т.п.

Имеющиеся в настоящее время фундаментальные исследования по нанотоксикологии скудны и не дают научно обоснованной базы для создания всеобъемлющего документа, регламентирующего исследование общетоксического действия фармакологических веществ и средств медицинского назначения, в состав которых входят наночастицы. Настоящий документ имеет промежуточный характер и предложен в качестве дополнения к «Методическим рекомендациям по изучению общетоксического действия ЛС». Он отражает специфические особенности исследований токсического действия нанолечевых и других средств медицинского назначения, в состав которых входят наночастицы с акцентом на прогностическую оценку возможных отдаленных последствий.

1. Понятия и термины

Наночастицы – высокодисперсные, гомогенные по структуре частицы размером менее 100 нм хотя бы в одном измерении, характеризующиеся физико-химическими свойствами, отсутствующими у исходных материалов (измененные термодинамические характеристики (температура, фазовые переходы, форма «кривых плавления»); каталитическая активность; химическая реакционная способность; «квантовые» эффекты (оптический, электрический, магнитный, кристаллографический) и т.д.).

Нанопрепараты – лекарственные формы или средства медицинского назначения, содержащие наночастицы.

2. Нормативный материал

Экспериментальная оценка общетоксического действия фармакологических веществ и средств медицинского назначения, содержащих наночастицы, базируется на общих принципах доклинической лабораторной практики в соответствии с приказом Минздрава России от 23 августа 2010 г. № 708н.

Основными документами, регламентирующими объем, схему и процедуру проведения экспериментов по исследованию безопасности фармакологических веществ, полученных на основе нанотехнологии, являются:

1. Федеральный Закон № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Федеральный Закон № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения».
3. Приказ Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека № 224 от 19.07.2007 г. «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».
4. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 23 июля 2007 года № 54 «О надзоре за продукцией, полученной с использованием нанотехнологий и содержащей наноматериалы».
5. Постановление Главного государственного санитарного врача Российской Федерации от 31 октября 2007 года № 79 «Об утверждении Концепции токсикологических исследований, методологии оценки риска, методов идентификации и количественного определения наноматериалов».
6. Методические рекомендации (МР) 1.2.2566-09. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*: Методические рекомендации. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 69 с.
7. МР 1.2.2522-09. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. Методические рекомендации. — М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 35 с.
8. МР 1.2.2639-10. Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях nanoиндустрии. — М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. — 79 с.

По мере накопления новых сведений, раскрывающих особенности тестирования токсичности наночастиц, несомненна необходимость гармонизации с международными стандартами International Organization for Standardization — ISO, группой международной Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР) и научным комитетом — The Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR).

3. Условия проведения исследований

Работа с фармакологическими веществами, имеющими в своем составе наночастицы, должна проводиться высококвалифицированными специалистами в вытяжных шкафах, оборудованных ULPA фильтрами. Условия проведения работы должны соответствовать требованиям, указанным в Приказе Роспотребнадзора от 19.07.2007 г. № 224 «О санитарно-эпидемиологических экспертизах, обследованиях, исследованиях, испытаниях и токсикологических, гигиенических и иных видах оценок».

3.1. Общие положения

Токсикологические исследования обязательны для всех нанопрепаратов, независимо от того, оригинальное или известное фармакологическое вещество или какой-то иной материал использованы в их составе.

Если лекарственный нанопрепарат содержит наночастицы и/или вспомогательные вещества (стабилизаторы, растворители и т. п.), не разрешенные для применения в медицинской практике, то каждое из них подвергают отдельному токсикологическому исследованию. 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 приме-

нения в медицинской практике. При изменении способа получения фармакологического вещества или лекарственной формы проводится повторная токсикологическая оценка на одном наиболее чувствительном виде животных, который определяется исходя из данных первоначальных исследований. Недопустимо измельчать лекарственные формы, предназначенные для регулируемого высвобождения вещества, если это специально не предусмотрено разработчиком.

При изменении количественного соотношения ингредиентов в лекарственной форме или увеличении дозировки действующего вещества, ведущих к изменению фармакодинамики и фармакокинетики нанопрепарата, следует провести повторную оценку его токсичности на одном наиболее чувствительном виде животных, который определяется исходя из данных первичных исследований.

3.2. Сведения о лекарственном нанопрепарате

Для проведения токсикологического изучения необходимо иметь характеристику субстанции (предварительную нормативную документацию; проект ФС) фармакологического вещества (Приложение 1), согласно которой оно идентифицируется, устанавливаются пределы содержания примесей, определяется его стабильность. Дается также характеристика (проект ФСП) лекарственного нанопрепарата и вспомогательных веществ, использованных при ее получении (наночастицы, растворители, наполнители, стабилизаторы и др.).

Следует иметь данные о способе приготовления раствора для введения, растворимости, гидрофобности или липофильности фармакологического вещества, наночастиц, а также данные о химическом составе, адгезивности, размере, форме, поверхностных характеристиках (заряд), химической реактивности наночастиц, их биodeградации и порядка их организации в ЛП. Желательно иметь данные об изменении свойств наночастиц под действием температуры, магнитного поля, облучения и при попадании в биологические жидкости.

Сведения о структуре, физико-химических свойствах, растворимости, условиях хранения, фармакологической активности с представлением данных экспериментальных исследований, предполагаемых дозах и путях введения в клинику, а также другая значимая для проведения исследования информация о свойствах субстанции фармакологического вещества или его лекарственной формы предоставляются разработчиком.

Дополнительно к обычно употребляемым размерностям в мг на 1 кг массы (мг/кг) или мг на 1 м² (мг/м²) поверхности тела животного дозы лекарственного нанопрепарата целесообразно выражать как отношение количества наночастиц к массе препарата (10¹² мг⁻¹) и отношение площади поверхности наночастиц к массе препарата (см²/мг).

3.3. Количественная и качественная оценка наночастиц в лекарственном препарате

Гигиеническое нормирование содержания искусственных наночастиц в ЛП требует наличия методов, выявления, идентификации и количественного определения наночастиц. В числе методов, существующих в настоящее время, наиболее разработанным и надежным применительно к идентификации и выявлению искусственных наночастиц является электронная микроскопия. Она позволяет определять число, размер, форму, кристаллическую структуру, химический состав электроноплотных веществ в диапазоне размеров 1–100 нм.

Лекарственное вещество в порошкообразной форме растворяют в соответствии с указаниями в инструкции по применению препарата, в жидкой форме – суспензируют. Проводят электронно-микроскопические исследования, анализируя структурные и морфометрические характеристики фармакологического вещества (Приложение 2).

Токсические свойства наночастиц зависят от их размеров и структурной организации. Чем меньше размер наночастицы, тем больше вероятность индукции воспаления,

активации синтеза цитокинов, усиления цитотоксичности. Образование конгломератов наночастиц приводит к изменению физико-химических свойств препарата.

Результаты и заключение электронно-микроскопической визуализации и идентификации наночастиц в ЛП содержат информацию о форме и размерах наночастиц, данные о степени агрегированности наночастиц, сведения о характере распределения наночастиц в образцах, данные степени загруженности препарата наночастицами, информацию о характере структурного взаимодействия наночастиц с остальными водонерастворимыми компонентами препарата и электронно-микроскопические изображения наночастиц и других компонентов ЛП.

4. Особенности оценки «острой» токсичности нанопрепаратов

Исследуется «острая» токсичность как самого фармакологического вещества или средств медицинского назначения, содержащих наночастицы, так и его составляющих по отдельности: наночастиц, активного вещества и других компонентов лекарственной формы, если они не были ранее разрешены к использованию в составе ЛС.

Результаты исследований показывают, что проявление токсических свойств наночастиц в значительной мере зависит от пути их поступления в организм. Это означает, что суждение об острой токсичности нанопрепаратов может базироваться исключительно на результатах, полученных в исследованиях, обеспечивающих тот путь введения, который будет использоваться в клинике.

Общая продолжительность наблюдения за животными при исследовании острой токсичности нанопрепаратов должна составлять не менее 30 дней после последнего случая гибели животного. В первый день после введения животные должны находиться под непрерывным наблюдением.

Остальные параметры и процедуры оценки острой токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличаются от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС».

5. Исследование кумуляции нанопрепаратов

Исследование кумулятивного действия фармакологического вещества или средств медицинского назначения, содержащих наночастицы, является проблемой, не получившей должного освещения в современной литературе. Очевидно, что применение традиционных подходов, основанных на повторяющихся введениях $0,1 \text{ ЛД}_{50}$ (Lim et al (1961), Ю.С. Коган, В.В. Станкевич (1964)), не может быть адекватным в связи с принципиально иной динамикой манифестации токсических эффектов нанопрепаратов по сравнению с химическими соединениями в макродисперсной форме. В то же время кумуляция токсических эффектов неизбежно будут выявляться в ходе проведения исследований хронической токсичности, что позволяет временно отложить вопрос о специальном изучении кумулятивного действия нанопрепарата.

6. Особенности оценки токсичности нанопрепаратов в хроническом эксперименте

В экспериментах по изучению хронической токсичности используют три дозы нанопрепарата. Дозы рассчитываются по количеству действующего вещества в составе лекарственной формы. Путь введения аналогичен клиническому; если рекомендуется несколько путей введения, то следует провести оценку при введении нанопрепарата всеми используемыми способами.

Введение максимальной дозы предполагает выявление возможных токсических эффектов и гибель части животных. Эта доза может быть определена из данных по острой токсичности. Минимальная доза должна быть близка к терапевтической дозе, рекомендуемой для клинического изучения. Третья доза является промежуточной.

Основные изучаемые группы:

1. Контроль.

2. Группа животных, получающая нанопрепарат в минимальной дозе, включающая «отставленную», или, при необходимости изучения динамики, несколько «отставленных» подгрупп.

3. Группа животных, получающая нанопрепарат в максимальной дозе, включающая «отставленную», или, при необходимости изучения динамики, несколько «отставленных» подгрупп.

4. Группа животных, получающая нанопрепарат в дозе промежуточной между минимальной и максимальной дозами, включающая «отставленную», или, при необходимости изучения динамики, несколько «отставленных» подгрупп.

Постановка соответствующих контролей обязательна. При наличии в лекарственной форме наночастиц, не разрешенных к применению, обязательно проведение параллельного исследования их токсичности в тех же дозах, в которых они были использованы при исследовании лекарственной формы.

В качестве «положительного» контроля необходимо использовать наночастицы в дозе, эквивалентной дозе лекарственной формы нанопрепарата, если в обоих вариантах физико-химические характеристики (заряд, структура) наночастиц аналогичны.

Фармакологические вещества, предназначенные для ежедневного применения у человека, вводят лабораторным животным 7 дней в неделю.

В связи с предполагаемым разнообразием возможных нанолечеств, их различных вариантов фармакокинетических характеристик и проявления токсических эффектов определение длительности введения нанолечеств является сложной задачей, не имеющей удовлетворительного научного решения из-за отсутствия достаточных фундаментальных знаний по общей токсикологии наночастиц. По аналогии с правилами, действующими при определении продолжительности введения фармакологически активных химических соединений в макродисперсной форме, представляется целесообразным связать в исследовании продолжительность введения фармакологического вещества или средств медицинского назначения, содержащих наночастицы, с длительностью планируемого клинического курса применения в соответствии с таблицей, приведенной ниже, при условии обязательной постановки «отставленных» групп и срока наблюдения в «отставленных» группах не менее 60 дней.

Таблица

Продолжительность введения фармакологического вещества или средств медицинского назначения, содержащих наночастицы, в хроническом токсикологическом исследовании

Планируемая продолжительность применения в клинике	Продолжительность введения в доклиническом исследовании
Однократное введение	14 дней
2–14 дней	Не менее 30 дней
15–30 дней	Не менее 60 дней
Свыше 30 дней	Не менее 180 дней (6 мес.)

Еще одной особенностью лекарственных нанопрепаратов могут явиться изменения функциональной активности системы мононуклеарных фагоцитов, индукция окислительного стресса и воспаления, как это было показано для большинства исследованных наночастиц различного происхождения. Это делает необходимым расширение спектра параметров, оцениваемых в токсикологическом исследовании, принятом для химических веществ, за счет тестов, позволяющих оценить функциональное состояние фагоцитов и антиоксидантной системы, экспрессию маркеров воспаления и уровень окислительных

процессов и связанных с ним повреждений, а также структуры и функции центральной нервной системы (ЦНС) и почек как возможных основных мишеней токсического действия нанопрепаратов.

Способность некоторых наночастиц взаимодействовать с ДНК определяет возможное проявление лекарственным нанопрепаратом генотоксических и мутагенных свойств. В связи с этим необходимо расширить оценку мутагенной активности нанопрепаратов, т.е. проводить ее не только в рамках стандартной оценки специфических видов токсичности, но также в группах животных по окончании хронического введения с использованием метода учета цитогенетических повреждений в клетках костного мозга и методом учета «ДНК-комет» в клетках печени, крови, головного и костного мозга.

Для анализа накопления, перемещения и биоустойчивости лекарственных нанопрепаратов, в зависимости от их состава, следует использовать методы магнитно-резонансной томографии (например, с применением полиамидомина/полипропилен-амина дендример-гадолиниевых хелатов для выявления дендримеров), электронной микроскопии (для выявления металлических наночастиц, углеродных нанотрубок), флюоресцентной спектроскопии (для выявления нанокристаллов) или радиометки (обнаружение фуллеренов, углеродных нанотрубок).

Список рекомендуемых тестов с использованием лабораторных животных приведен в Приложении 3. Остальные параметры и процедуры оценки хронической токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличаются от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС» настоящего Руководства.

Заключение должно содержать мнение исследователей о степени опасности острого и хронического отравления на основании проведенных исследований, прогноз возможных побочных реакций и необходимых ограничений использования лекарственной формы нанопрепарата при КИ.

7. Схема отчета об исследовании общетоксического действия нанопрепарата

Отчет должен содержать следующие разделы: титульный лист, список исполнителей, оглавление, реферат, введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты проведенных исследований, заключение, список литературы, приложение.

Титульный лист: содержит название организации-исполнителя, утверждение отчета, заверенное подписью руководителя учреждения и печатью организации, название отчета, должность, фамилию, имя, отчество и подпись руководителя проведенных исследований.

Список исполнителей: ответственный исполнитель, исполнители — фамилия, имя, отчество, должность, степень, звание, подпись.

Оглавление: перечень разделов с указанием страниц отчета.

Введение: цели и задачи исследования.

Обзор литературы: информация об оригинальном препарате, нанопрепарате или литературные сведения о воспроизведенном препарате.

Материалы и методы: физико-химическая характеристика субстанции и лекарственной формы, их соответствие проекту нормативной документации (ФСП, ФС или количественный и качественный состав лекарственной формы воспроизведенного ЛП, серия, соответствие проекту ФСП).

Характеристика использованных лабораторных животных (источник получения, масса, возраст, пол, условия содержания).

Схема эксперимента, обоснование выбранных доз.

Описание методов исследования и метода статистической обработки данных.

Результаты проведенных исследований: описание острой токсичности и хронической токсичности в соответствии с полученными достоверными изменениями изучен-

ных показателей и результатами патоморфологических исследований, способ эвтаназии животных.

Заключение: краткое обсуждение полученных результатов, прогноз возможных побочных эффектов, рекомендуемые ограничения или необходимый контроль при проведении КИ.

Список литературы.

Приложения: таблицы индивидуальных показателей и результаты их статистической обработки по всем изученным тестам, индивидуальное описание гистологических изменений органов и тканей лабораторных животных.

Приложение 1

Сведения о фармакологическом веществе

Наименование продукции _____
 Номер серии (партии) _____
 Количество (масса, объем), ед. измерения: _____
 Дата изготовления продукции _____
 Исследования (анализы) проведены _____

Дата исследования	Наименование показателей	Результаты исследований
	Химический состав нанопрепарата или структурная формула	
	Концентрация наночастиц и основного вещества в растворе (мг/кг, см ² /мг)	
	Наличие примесей	
	Внешний вид (прозрачность, цветность)	
	pH	
	Номинальный объем	
	Стерильность	
	Характеристика наночастиц (наименование, форма, кристаллическая структура, пористость и однородность в препарате, заряд)	
	Удельная площадь поверхности наночастиц	
	Растворимость, температура кипения или плавления наночастиц	
	Стабильность наночастиц в фармакологическом веществе	
	Режим введения, доза и путь введения нанопрепарата	
	Фармакологическое действие нанопрепарата	
	Срок годности	
	Условия хранения	

Аналитический паспорт нанопрепарата

Наименование продукции _____
 Номер серии (партии) _____
 Количество (масса, объем), ед. измерения: не менее 50–100 мг (0,5–1,0 мл)
 Дата изготовления продукции _____
 Исследования (анализы) проведены _____

Дата исследования	Наименование показателей	Рекомендуемые параметры
	Размеры наночастиц в фармакологическом веществе	1,0–100,0 нм
	Форма наночастиц	Ровные края без острых выступов
	Коэффициент формы наночастиц	1–1,3
	Электронно-оптическая плотность наночастиц	Однородная
	Степень полиморфизма наночастиц в препарате	Низкая
	Степень агрегированности частиц в нанопрепарате	Низкая
	Характер распределения наночастиц в фармакологическом веществе	Равномерный
	Структурное взаимодействие с другими компонентами препарата	В соответствии с техническими характеристиками препарата
	Степень загрузки фармакологического вещества наночастицами (число наночастиц в единице объема/веса препарата)	В соответствии с техническими характеристиками препарата
	Структура фармакологического вещества	В соответствии с техническими характеристиками препарата

Заключение

Перечень рекомендуемых тестов
 для определения токсичности средств, содержащих наночастицы

Рекомендуемые исследования	Минимально достаточные тесты и показатели
Интегральные показатели	Внешний вид, поведение, симптомы интоксикации, масса тела (еженедельно), суточное потребление корма и воды (еженедельно)
Гематологические исследования	Содержание в периферической крови эритроцитов, тромбоцитов, ретикулоцитов, лейкоцитов, лейкоцитарная формула, гемоглобин, гематокрит, показатели, характеризующие систему свертывания крови
Биохимические исследования	В сыворотке крови: общий белок, билирубин, белковые фракции, общий холестерин, общие липиды, глюкоза, триглицериды, электролиты, активность основных ферментов, имеющих диагностическое значение (ЩФ, АЛТ, АСТ, ЛДГ и др.) В моче: концентрация мочевины, креатинина, глюкозы, белка

Рекомендуемые исследования	Минимально достаточные тесты и показатели
Иммунологические исследования	Спектр про- и противовоспалительных цитокинов и/или других маркеров воспаления (ФНО- α , ИЛ1 β , ИЛ-6, ИЛ-8, ИЛ-4, ИЛ-10), определение образования активных форм кислорода клетками крови или перитонеальными макрофагами или иными клетками, оценка гуморального и клеточного иммунитета; активность каспазы 3 в гомогенатах ткани печени, головного мозга Фагоцитарная активность РЭС (темп внутрисосудистого клиренса тест-частиц)
Физиологические исследования	Частота сердечных сокращений, параметры ЭКГ во втором отведении Ритм и глубина дыхания Диурез, рН, относительная плотность мочи, белок, глюкоза, уробилиноген, билирубин, кетоны, кровь (эритроциты, лейкоциты, гемоглобин), эпителиальные клетки, цилиндры, соли, бактерии
Про-/антиоксидантный баланс	Общая антиоксидантная активность плазмы крови; 8-гидроксигуанидин в ядерной ДНК клеток крови, печени, почек, костного и головного мозга и/или биологических жидкостях
Патоморфологические исследования	Вскрытие, макроскопическое описание состояния органов и тканей, места введения, определение относительной массы органов, гистологические исследования головного мозга, сердца, печени, почек, легких, селезенки, тимуса, надпочечников, желудка, кишечника, мочевого пузыря, поджелудочной железы, щитовидной железы, лимфоузлов, костного мозга, семенников, яичников и матки, места введения препарата

Литература

1. Арзамасцев Е.В. и соавторы // Методические рекомендации по изучению общетоксического действия фармакологических веществ. — В сб.: Руководство по доклинической (экспериментальной) оценке фармакологических веществ. — Москва, 2005.
2. Бельский М.Л. — В кн.: Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1968. — 151 с.
3. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения // Хим.-фарм. журн. — 2003. — Т. 37. — № 3. — С. 32–34.
4. Березовская И.В., Митрохин Н.М. Экспресс-методы определения острой токсичности // Бюллетень ВНИЦ БАН. — М., 1990. — С. 45–67.
5. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. Издание второе дополненное. — М.: МДВ, 2008. — 196 с.
6. Дурнев А.Д. Токсикология наночастиц. БЭБМ, 2008, 145 (1): 78–80.
7. Дурнев А.Д., Жанатаев А.К., Анисина Е.А., Сиднева Е.С., Никитина В.А., Оганесянц Л.А., Середенин С.Б., Бекиш В.Я., Чернуха И.М. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений // Методические рекомендации. Издание официальное. — Москва, 2006. — 28 с.
8. Курляндский Б.А. О нанотехнологии и связанных с нею токсикологических проблемах // Токсикологический вестник. — 2007, №6.
9. Куценко С.А. // Основы токсикологии. — СПб.: Фолиант, 2004. — 720 с.
10. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. — М.: Медицина, 1987.
11. Лысцов В.Н. Проблемы безопасности нанотехнологий / В.Н. Лысцов, Н.В. Мурзин. — М.: Изд-во МИФИ, 2007. — 70 с.
12. МР 1.2.2522-09. Методические рекомендации по выявлению наноматериалов, представляющих потенциальную опасность для здоровья человека. Методические рекомендации — М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 35 с.

13. МР 1.2.2566-09. Оценка безопасности наноматериалов *in vitro* и в модельных системах *in vivo*: Методические рекомендации. — М.: Федеральный центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2009. — 69 с.
14. МР 1.2.2639-10. Использование методов количественного определения наноматериалов на предприятиях nanoиндустрии. — М.: Федеральный Центр гигиены и эпидемиологии Роспотребнадзора, 2010. — 79 с.
15. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского и В.А. Филова. — М.: Медицина, 2002. — С. 606.
16. Пиотровский А.Б., Киселев О.И. // Фуллерены в биологии / Сев.-Зап. отделение РАМН. — Санкт-Петербург: ООО «Издательство «Росток», 2006. — 336 с.
17. Borm PJ, Robbins D, Haubold S, Kuhlbusch T, Fissan H, Donaldson K, Schins R, Stone V, Kreyling W, Lademann J, Krutmann J, Warheit D, Oberdorster E: The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECETOC. Part Fibre Toxicol 2006. — 3:11.
18. Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L., Haynes C.L. // Analytical methods to assess nanoparticle toxicity. Analyst, 2009, 134, 425–439.
19. Curtis J., Greenberg M., Kester J., Phillips S., Krieger G. // Nanotechnology and nanotoxicology: a primer for clinicians / Toxicol. Rev. 2006, 25(4), p. 245–260.
20. Dreher KL. Health and environmental impact of nanotechnology: Toxicological assessment of manufactured nanoparticles. Toxicological Sciences. 2004. 77: 3–5.
21. Freireich E., Gehan E. A., Rail D.E, et al. Quantitative comparison of toxicity of anticancer agents in mouse, rat, hamster, dog, monkey and man // Cancer Chemother. Res. 1966. — Vol. 50. — № 4. — P. 219–244.
22. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers./ Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), 2005.
23. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. <http://www.nap.edu/readingroom/books/labrats/>
24. Handbook of Toxicology, Second Edition, Ed. by M.J. Derelanko, M.A. Hollinger, CRC Press, 2002.
25. Hassellöv, M. Nanoparticle analysis and characterization methodologies in environmental risk assessment of engineered nanoparticles / M. Hassellöv, J.W. Readman, J.F. Ranville, K. Tiede // Ecotoxicology. — 2008. — Vol 17. — P. 344–361.
26. Holbrook, R.D. Trophic transfer of nanoparticles in a simplified invertebrate food web / R.D. Holbrook, K.E. Murphy, J.B. Morrow, R.D. Cole // Nat. Nanotechnol. — 2008. — Vol. 3. — № 6. — P. 352–355.
27. Igarashi E. Factors affecting toxicity and efficacy of polymeric nanomedicines. Toxicology and Applied Pharmacology. 2008. 229 (1): 121–134.
28. Marquis B.J., Love S.A., Braun K.L., Haynes C.L. Analytical methods to assess nanoparticle toxicity // Analyst. — 2009 Mar;134(3):425–39. Epub 2009 Feb 5.
29. Medina C., Santos-Martinez M.J., Radomski A., Corrigan O.I., Radomski M.W. // Nanoparticles: pharmacological and toxicological significance/ Br. J. Pharmacol., 2007, 150(5), 552–558.
30. Murthy S.K. // Nanoparticles in modern medicine: state of the art and future challenges./ Int. J. Nanomedicine, 2007, 2(2), p. 129–141.
31. Nancy A. Monteiro-Riviere, C. Lang Tran. Nanotoxicology: Characterization, Dosing and Health Effects. 2007 by Informa Healthcare USA, Inc. 434 p.
32. Oberdorster G., Oberdorster E., Oberdorster J.// Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles./ Environ. Health Perspect., 2005, 113(7), p. 823–839.
33. Suter L., Babiss L.E., Wheeldon E.B. // Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development.//Chem Biol. 2004 ,11(2), 161–171.
34. Tiede, K. Detection and characterization of engineered nanoparticles in food and the environment / K. Tiede, A.B.A. Boxall, S.P. Tear, J. Lewis, H. David, M. Hassellöv // Food Additives and Contaminants. — 2008. — Vol. 25, № 7. — P. 795–821.
35. Waters M.D., J.M. Fostel // Toxicogenomics and systems toxicology: aims and prospects / Nat. Rev. Genet. — 2004. — 5 (12), 936–948.

ДОПОЛНЕНИЕ 2

ОСОБЕННОСТИ ОЦЕНКИ ТОКСИЧНОСТИ ВОСПРОИЗВЕДЕННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; д. м. н., проф. И.В. Березовская;
член-корр. РАМН, д. м. н., проф. Т.А. Гуськова; член-корр. РАМН, д. м. н.,
проф. А.Д. Дурнев, к. б. н. Л.В. Крепкова*

Введение

Воспроизведенные лекарственные препараты (генерики) являются эквивалентами оригинальных ЛС в том, что касается лекарственной формы, эффективности, способа применения, качества, характера действия и назначения (1). Эти препараты не должны отличаться от прототипов по эффективности и безопасности. Достигнуть этого можно только в том случае, если воспроизведенный препарат по всем показателям, заложенным в соответствующей документации, не отличается от своего прототипа.

1. Общие положения

Полное совпадение состава лекарственной формы созданного в России препарата и его прототипа достигается редко, особенно это касается таблеток, капсул, суппозиторий и мазевых форм (2). Российские производители при создании препаратов, как правило, используют вспомогательные вещества отечественного производства. Это могут быть вспомогательные вещества нефармакопейного качества или отличающиеся от зарубежных аналогичных вспомогательных веществ по отдельным параметрам качества (3). Кроме того, вспомогательный состав лекарственной формы препарата (красители, стабилизаторы и др.) часто является «ноу-хау» и не может быть использован в отечественных разработках в полном объеме. Все это свидетельствует о том, что отечественные генерики часто не являются точной копией зарубежных аналогов (4). Поэтому прежде, чем передать такой генерик в клинику, следует оценить его безопасность в сравнении с аналогом в исследованиях на животных.

2. Оценка безопасности

Общим принципом доклинической оценки безопасности воспроизведенных ЛС является обязательность сравнительного исследования генерика и препарата сравнения, в качестве которого может выступать прототип или идентичный прототипу препарат, зарегистрированный в РФ.

1. Определение острой токсичности лекарственной формы воспроизведенного препарата и препарата сравнения на одном виде лабораторных животных при способе введения, указанном в инструкции по медицинскому применению. Результаты, полученные в этих исследованиях, могут быть косвенными показателями биоэквивалентности генерика и референтного препарата по действующему веществу в составе лекарственной формы.

2. Сравнительное изучение субхронической токсичности при введении воспроизведенного препарата и препарата сравнения в течение не менее 2-х недель при способе применения, указанном в инструкции, в дозах, вызывающих токсический эффект, с обязательным гистологическим исследованием внутренних органов и области введения препарата. Объем экспериментальных исследований идентичен таковому при исследо-

вании оригинальных фармакологических веществ (см. вышеприведенные приложения и основной документ).

ЛС в виде капсул, таблеток и инфузионных растворов желателно испытывать на крупных лабораторных животных (кролики, собаки), не нарушая целостности лекарственной формы, что особенно важно при изучении токсичности лекарственных форм с модифицированным высвобождением действующего начала. Ежедневное введение сравнимых лекарственных форм препаратов в высоких дозах дает возможность оценить токсичность минорных примесей или вспомогательных веществ, которые отличают воспроизведенный препарат от его прототипа. Исследования токсичности ЛП на лабораторных животных позволяют увидеть изменения структуры внутренних органов, что невозможно при оценке биоэквивалентности или сравнительных КИ препаратов. Результаты, полученные в этих исследованиях, являются показателями наличия или отсутствия различий в токсичности генерика и референтного препарата, имеющих различный состав лекарственной формы.

Оценка безопасности биотехнологических генериков (большая молекулярная масса, не всегда известна формула, молекула трехмерная) должна проводиться в большем объеме, чем аналогичная оценка безопасности синтетических ЛС (малая молекулярная масса, известная и воспроизводимая формула), поскольку даже незначительные изменения при производстве биопрепаратов могут приводить к непредсказуемым последствиям (5).

3. Подготовка отчета и заключения по результатам исследований

Отчет помимо результатов исследования должен содержать обобщенные литературные сведения о репродуктивной токсичности, мутагенных, аллергенных и иммунотоксических свойствах препарата сравнения и/или прототипа. При отсутствии сведений о специфических видах токсичности (мутагенность, аллергенность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность), характеризующих препарат сравнения или прототип, следует восполнить пробелы соответствующими исследованиями генерика. Аналогичные исследования должны быть выполнены в случае неопределенных или противоречивых сведений о том или ином виде специфической токсичности. Объем исследований определяется методическими рекомендациями по каждому виду специфической токсичности, представленным в настоящем Руководстве по проведению доклинических исследований ЛС.

Токсикологические исследования необязательны для генериков, полученных путем исключения из состава лекарственной формы вспомогательного вещества, имеющегося в аналогичном препарате, зарегистрированном в РФ, при наличии обоснования вносимых изменений, а также генериков, зарегистрированных для медицинского применения за рубежом.

Литература

1. Березовская И.В., Иванова В.М. Актуальные проблемы безопасности воспроизведенных лекарственных препаратов // Клинические исследования лекарственных средств в России. — 2004. — № 3–4. — С. 16–24.
2. Гуськова Т.А. Оценка безопасности применения генериков в странах СНГ: проблемы и перспективы // Биомедицина. — 2010. — №4. — С. 74–76.
3. European Pharmacopoeia 6.0 (01/2008:50400).
4. Рейхарт Д.В. //Безопасность и эффективность воспроизведенных лекарственных средств в социально-ориентированной системе лекарственного обеспечения Российской Федерации / Дис. ... док. биол. наук, Томск, 2010 г.
5. Гуськова Т.А. Особенности доклинической оценки безопасности биофармпрепаратов // Биофармацевтический журнал. — 2009. — Том 1. — №2. — С. 38–41.

ДОПОЛНЕНИЕ 3

ОСОБЕННОСТИ ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

*Составители: д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; к. б. н. Л.В. Крепкова;
к. б. н. В.В. Бортникова; д. м. н. В.К. Колхир; член-корр. РАМН, проф., д. м. н. А.Д. Дурнев*

Введение

В настоящее время в арсенале ЛС значительное место занимают препараты, созданные на основе лекарственного сырья растительного или животного происхождения, продуктов пчеловодства, минералов.

Отличительной особенностью лекарственных средств природного происхождения (ЛСПП) является их сложный химический состав, включающий биологически активные вещества, относящиеся к различным классам химических соединений, в том числе к сильнодействующим и потенциально токсичным, наличие и содержание которых зависит от многих факторов. Не исключено наличие в составе ЛСПП веществ природного происхождения с неизвестной биологической активностью, вероятность присутствия которых существенно повышается с внедрением новых высокоэффективных способов экстракции.

Дополнительной проблемой является загрязнение лекарственного сырья природного происхождения пестицидами, нитратами, радионуклеидами, тяжелыми металлами, микотоксинами, оказывающими негативное влияние на организм животных и человека. Содержание большинства из них регламентируется санитарно-гигиеническими нормами, которые, однако, не учитывают возможных токсических эффектов в результате прямого или опосредованного взаимодействия контаминантов и биологических веществ, входящих в состав ЛП.

Таким образом, условием получения высококачественной продукции является не только использование качественного стандартизованного природного сырья, но также обязательная доклиническая оценка безопасности ЛСПП.

В настоящем приложении, являющемся дополнением к документу «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС» отражены специфические особенности исследований токсического действия ЛСПП.

Объем, схема и процедура проведения исследований по безопасности ЛСПП составлены с учетом международных стандартов — Европейской Директивой 2004/24/ЕС, принятой в 2004 году Европейским Парламентом и Советом Европы, обеспечивающей основу для использования растительных ЛС в Европе, согласно которой ЛС природного происхождения должны иметь признанный уровень эффективности и безопасности, который должен быть оценен на основе данных доклинических и клинических исследований. В соответствии с существом этого документа все ЛСПП делятся на две группы. Первая — ЛСПП с научно установленной эффективностью и безопасностью. Вторая — традиционные ЛСПП, не имеющие научного подтверждения эффективности, но мало токсичные. В эту группу включаются только те препараты, которые имеют 30-летнее широкомасштабное использование, из этого срока — не менее 15 лет в пределах стран Европейского Союза. Для решения вопроса о регистрации ЛСПП первой группы требуется полный объем токсикологических

доклинических исследований. ЛСПП второй группы могут быть зарегистрированы на основании данных литературы, характеризующих острую и хроническую токсичности, а также специфических видов токсичности, в тех же качественных стандартах, что и для препаратов первой группы.

1. Общие положения

Доклинические токсикологические исследования обязательны для всех новых ЛСПП, независимо от источника и способа получения, а также для препаратов с измененным количественным и качественным составом, в том числе за счет вспомогательных веществ, и для новых лекарственных форм. Объем таких исследований (острая и хроническая токсичность, а также специфические виды токсичности — аллергенность, иммунотоксичность, мутагенность и репродуктивная токсичность) определяется нормативными документами настоящего Руководства с учетом имеющейся доказательной базы.

Программа экспериментального токсикологического исследования лекарственного природного сырья, производимого для приготовления настоев и отваров в домашних условиях, а также для внутриаптечного изготовления по экстенпоральной рецептуре, составляется с учетом сведений о безопасности его применения, имеющихся в отечественной и зарубежной медицине (обзор литературы по доклиническому и клиническому изучению), химическом составе, регистрации в зарубежных странах, наличии в Европейской и других фармакопеях.

При проведении токсикологических исследований необходимым условием является соблюдение всех правил приготовления изучаемого образца препарата в соответствии с инструкцией по медицинскому применению. Это объясняется установленной нормой содержания в исследуемом образце биологически активных веществ в виде сухого остатка или количества экстрактивных (действующих) веществ, количество которых регламентируется нормативной документацией (НД).

1.1. Сведения о лекарственном средстве

Для проведения экспериментального токсикологического изучения необходимо иметь предварительную нормативную документацию (НД) и проект ФСП на природное сырье, из которого получают фармакологические вещества, характеристику субстанции и готовых лекарственных форм (проекты ФСП, сертификаты анализов) препарата.

Разработчик обязан предоставить исследователю сведения о химическом составе, физико-химических свойствах, растворимости, условиях хранения, содержании сухого остатка, фармакологической активности с представлением данных экспериментальных исследований. Следует иметь проект инструкции по медицинскому применению, в котором указан способ приготовления ЛС, предполагаемые дозы и пути введения в клинику, а также другую значимую для проведения исследования информацию о свойствах субстанции фармакологического вещества или его лекарственной формы.

2. Особенности оценки «острой» токсичности лекарственных средств природного происхождения

Исследуется «острая» токсичность субстанции фармакологического вещества, а также настоев, отваров, настоек и жидких экстрактов.

Следует иметь в виду, что при приготовлении настоев и отваров соотношение сырье/экстрагент (вода) может быть изменено в сторону увеличения массы сырья, до полного его смачивания или уменьшения количества воды, что ведет к увеличению массы сухого остатка в извлечении. Однако не существует линейной зависимости между количеством экстрагируемого сырья и содержанием сухого остатка в образце при одинаковом объеме экстрагента, поэтому сухой остаток необходимо определять в каждом отдельном случае.

При экспериментальном исследовании настоек и жидких экстрактов, для приготовления которых используют этиловый спирт различной концентрации, чаще всего это 40% и 70%, или сока лекарственных растений, содержащего в качестве консерванта 20% этанол, необходимо прежде всего деалкоголизировать данную лекарственную форму путем выпаривания в мягких условиях. В некоторых случаях возможно разведение настойки водой (если не выпадает осадок) перед введением лабораторным животным. Расчет доз для введения лабораторным животным также необходимо проводить с учетом содержания биологически активных веществ в исследуемом образце и рекомендуемым разведением, указанным в инструкции по медицинскому применению препарата.

Для настоев, отваров, настоек и жидких экстрактов изучение острой токсичности возможно ограничить одним способом введения — пероральным (per os).

Процедура оценки острой токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличается от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС».

3. Особенности оценки «хронической» токсичности лекарственных средств природного происхождения

Изучение хронической токсичности субстанций и готовых лекарственных форм ЛСПП проводят в соответствии с требованиями по оценке общетоксического действия фармакологических веществ.

При изучении токсичности настоев и отваров, приготовленных из лекарственного сырья, в условиях субхронического или хронического исследования используют 2–3 дозы, минимальная из которых должна соответствовать терапевтической, указанной в инструкции по медицинскому применению. Максимальная доза определяется исходя из данных по острой токсичности и возможного объема введения. С целью уменьшения объема образца препарата при длительном введении животным вторую или третью дозы настоя или отвара возможно готовить путем увеличения концентрации раствора.

В случае изучения токсичности этанолсодержащих препаратов при длительном введении лабораторным животным их предварительно деалкоголизируют методом упаривания до 1/3 от исходного объема с последующим доведением водой до первоначального (содержание этанола в образце должно составлять не более 6–8%), и вводят животным внутривентрально зондом, один–два раза в сутки. Контрольные животные получают 6–8% этанол в эквивалентных объемах.

Дозы для введения рассчитывают с учетом содержания биологически активных веществ в исследуемом образце и рекомендуемым разведением, указанным в инструкции по медицинскому применению препарата.

Продолжительность введения настоев, отваров, настоек и жидких экстрактов в желудок возможно ограничить 3 месяцами.

Остальные параметры и процедуры оценки хронической токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличаются от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС».

При решении вопроса о возможности передачи препарата на клиническое изучение исследователь должен учесть следующие факторы:

1. Зависимость токсического действия ЛС природного происхождения от величины примененной дозы.

2. Терапевтическую широту препарата, т.е. соотношение минимальной токсической и терапевтической доз.

3. Характер и обратимость выявленной патологии.

Заключение отчета должно содержать выводы исследователей о степени токсичности ЛСПП при однократном и длительном введении лабораторным животным на основании

проведенных исследований, прогноз возможных побочных реакций и необходимых ограничений или противопоказаний использования ЛС при клиническом изучении.

Оформление отчета по доклиническому изучению общетоксического действия новых ЛСПП проводится в соответствии с базовым документом.

Литература

1. Беленький М.Л. — В кн.: Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Л., 1968. — С.151.
2. Березовская И.В. Классификация химических веществ по параметрам острой токсичности при парентеральных способах введения. Хим.-фарм. ж., 2003. — № 3 (37). — С. 32–34.
3. Верстакова О.Л. Доклиническая экспертиза лекарственных средств природного происхождения. Материалы VII Международного съезда ФИТОФАРМ, СПб.–Пушкин, 2003. — С. 596–600.
4. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. Издание второе дополненное, М.: МДВ, 2008. — 196 с.
5. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Медицина, 1987.
6. Крепкова Л.В., Бортникова В.В, Арзамасцев Е.В., Сокольская Т.А. Некоторые особенности токсикологического изучения лекарственных препаратов из растений. Ж. «Вопр. биол., мед. и фарм. химии», 2009. — № 5. — С. 75–78.
7. Самылина И.А. Пути стандартизации лекарственного растительного сырья. Сб. науч. тр. конгр. «Традиционная медицина-2007». — М., 2007. — С. 85–87.
8. Самылина И.А., В.М. Булаев, Фармация, 2009. — № 3. — С. 6–8.
9. Calixto J.V. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). — Braz. J. Med.Biol. Res. 2 (33), 179–189 (2000).
10. Chan K. Some aspects of toxic contaminants in herbal medicines, Chemosphere, 52 (9), 1361–1371 (2003).
11. Ernst E. Herbal medicines: balancing benefits and risks. Novartis Found Symp. 282, 154–172, 212–218 (2007).
12. Directive 2004/24/EC of the European Parliament and of the Council of 31 March 2004 amending, as regards traditional herbal medicinal products, Directive 2001/83/EC on the Community code relating to medicinal products for human use // Official Journal of the European Union 30.4.2004. L 136/85-L 136/90.

ДОПОЛНЕНИЕ 4

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ОБЩЕТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ПРЕДЛАГАЕМЫХ ДЛЯ ПЕДИАТРИЧЕСКОЙ ПРАКТИКИ

СОСТАВИТЕЛИ: член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова; д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; к. б. н. В.В. Бортникова; к. б. н. Г.Н. Енгальцева; к. б. н. Л.В. Крепкова; к. м. н. Р.Д. Сябаев

Введение

Каждый возрастной период человека характеризуется определенным функциональным состоянием органов и систем организма, что не может не влиять на их чувствительность к экзогенным веществам, в том числе и ЛП. Развивающийся организм человека и животных значительно отличается от взрослого организма незрелостью строения и функционирования многих органов и систем, продолжающимся их формированием и одновременным созревaniem, несовершенными биохимическими и физиологическими процессами, меньшей активностью биотрансформирующих ферментов печени и экскретирующей функции почек, которые могут существенно изменять фармакокинетику и фармакодинамику ЛС и, следовательно, специфическую эффективность и токсичность. Особое значение при этом имеет сочетанное применение нескольких препаратов [1–6].

1. Общие положения

Применение ряда ЛС в педиатрии запрещено или ограничено в связи с высоким риском тяжелых, часто специфических для детского возраста побочных эффектов. Все это свидетельствует о необходимости особого отношения к доклинической оценке безопасности ЛП для педиатрии.

В настоящее время развивающиеся («ювенильные») животные признаны стандартным объектом в токсикологических исследованиях ЛП для педиатрической практики. Использование развивающихся животных в качестве исследовательской тест-системы позволяет моделировать разные онтогенетические периоды развития организма. Это позволяет проводить адекватную оценку безопасности применения ЛП в конкретной возрастной группе пациентов (новорожденных, детей, подростков).

Международная практика разработки ЛС имеет отчетливую тенденцию к оптимизации доклинической программы исследований за счет исключения малоинформативных экспериментов на животных и поэтапного выполнения токсикологических исследований с учетом фазы КИ. В связи с этим в настоящие рекомендации включены положения, отражающие зарубежный опыт и методологические подходы, содержащиеся в официальных документах национального и международного статуса [7–11].

Доклинические исследования проводятся в соответствии с существующими правилами лабораторной практики, утвержденными уполномоченным федеральным органом исполнительной власти РФ (Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики»).

2. Планирование исследований на развивающихся (ювенильных) животных

Основная цель доклинической оценки безопасности препаратов, предназначенных для применения в педиатрии, должна быть сфокусирована на выявлении их нежелатель-

ного воздействия на процессы роста и развития, а также различий в чувствительности между взрослыми и ювенильными животными. Биомаркеры нежелательных эффектов, установленных в токсикологических исследованиях, необходимо использовать для мониторинга состояния пациентов в КИ.

Стратегия проведения токсикологических исследований зависит от схемы применения препарата в педиатрии, а также от объема и характера имеющейся информации о его безопасности при использовании у взрослых.

В соответствии с международными рекомендациями, до начала КИ с участием детей должны быть получены результаты исследований хронической токсичности соответствующей продолжительности на взрослых животных, фармакологических исследований безопасности и генотоксичности в стандартной батарее тестов. Исследования репродуктивной токсичности (фертильности, пре- и постнатального развития) особенно важны для оценки риска прямого токсического действия и влияния на развитие. Исследования канцерогенности обычно не требуются для проведения КИ ЛС, за исключением тех случаев, когда имеется существенные основания (например, доказанные генотоксические эффекты или наличие проканцерогенного риска) [11].

В соответствии с Законодательством РФ, КИ с участием детей можно проводить только после того, как препарат будет зарегистрирован для применения у взрослых.

Для интерпретации результатов токсикологических исследований на ювенильных животных в зарубежных руководствах применяется следующая классификация возрастных групп педиатрических пациентов [10]:

1. Недоношенные новорожденные.
2. Новорожденные от 0 до 27 дней.
3. Младенцы от 28 дней до 23 месяцев.
4. Дети (от 2 до 11 лет).
5. Подростки (от 12 до 18 лет).

Основным критерием адекватности исследований на ювенильных животных является соответствие их постнатального периода развития возрастным характеристикам развития пациентов в целом, а также конкретным системам, которые определяются как конечные точки токсического действия (органы-мишени). Ткани, подверженные значительному постнатальному развитию могут иметь более высокую чувствительность к определенным токсическим воздействиям, чем зрелые ткани. Органные системы, определяемые как подверженные значительному постнатальному росту и развитию, включают нервную, репродуктивную, легочную, почечную, скелетную, желудочно-кишечную, гепатобилиарную и иммунную системы.

Принципиальное значение имеет оценка обратимости эффектов и достаточный период отсроченного наблюдения для определения результата токсического воздействия препарата на морфологические и функциональные характеристики развивающихся систем к моменту их онтогенетической зрелости.

Возрастные характеристики ювенильных животных и человека с учетом периода онтогенетического развития нервной, репродуктивной, скелетной, легочной, иммунной, мочевыделительной, сердечной и метаболической систем представлены в таблицах 1–10.

Исследованию подвергаются субстанции фармакологических веществ, при введении их в желудок или парентерально, которые проводят чаще всего на крысах-отъемышах. Для токсикологического изучения детских лекарственных форм используют крольчат или щенят. Крольчата больше подходят для изучения мягких лекарственных форм (кремы, мази, гели, суппозитории и т.д.); щенята — для изучения лекарственных форм, предназначенных для приема внутрь (таблетки, капсулы, порошки, сиропы).

3. Особенности оценки острой токсичности лекарственных средств для педиатрии

3.1. Вид лабораторных животных

Для оценки токсичности ЛП, предназначенных для детей раннего возраста, необходимо провести исследования на тех видах животных, на которых возможно введение веществ в более ранние периоды развития. В зависимости от цели исследования выбирают необходимый вид животного, чаще всего исследования выполняют на крысах или мышатах, в том числе новорожденных.

3.2. Пути и объемы введения

У мелких лабораторных животных острую токсичность фармакологического вещества исследуют при двух способах введения (энтеральном и парентеральном), один из которых соответствует способу применения в клинике. Для крысят (мышат) в ранние сроки постнатального периода предпочтительнее внутрибрюшинное введение вещества. Фармакологические вещества, предлагаемые для приема внутрь, следует вводить через зонд. Объем вводимого раствора животным разного возраста должен быть одинаковым на единицу массы тела. Так, крысятам следует вводить 0,01 (не более 0,02) мл на 5 г массы тела, тогда как животному с массой тела 100 г — 0,2 (0,4) мл раствора той же концентрации. Введение больших объемов растворов неполовозрелым животным не рекомендуется из-за возможного увеличения объема циркулирующей крови, содержания жидкости в организме и нагрузки на сердечно-сосудистую систему (ССС).

Процедура оценки острой токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличается от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС».

4. Особенности оценки хронической, субхронической (подострой) токсичности лекарственных средств для педиатрии

В эксперименте используют детенышей, отсаженных от матери, возраст которых составляет: для крысят — 25–30 дней, мышат — 21 день, крольчат 40–45 дней, щенят 60–75 дней.

Для оценки токсичности фармакологических веществ в условиях субхронического эксперимента формируют группы из 10–15 детенышей из разных пометов. В качестве контроля обязательно используют животных того же возраста, находящихся в аналогичных условиях, получающих плацебо.

Препараты начинают вводить детенышам сразу после отсаживания их от матери.

Длительность введения препаратов щенятам при изучении субхронической токсичности должна составлять 35–40 дней, а при изучении хронической токсичности — 6 месяцев. Для изучения субхронической токсичности на крысятах и крольчатах оптимальной является длительность 30–45 дней с еженедельной оценкой основных интегральных показателей, ежемесячным исследованием периферической крови и функциональным состоянием основных органов и систем организма. В конце хронического эксперимента проводятся патогистологические исследования внутренних органов животных. Эвтаназия должна проводиться в соответствии с этическими нормами обращения с животными.

Фармакологические вещества, предлагаемые для приема внутрь, следует вводить через металлический зонд (мышата, крысята), закладывать на корень языка или вводить через мягкий зонд (щенята, крольчата). Щенята могут получать препараты с кормом только при индивидуальном содержании, чтобы была уверенность, что вся доза препарата поступила в организм животного.

Фармакологические вещества, предлагаемые для местного применения, наносят или вводят в соответствующую область тела, согласно способу, предлагаемому для клиники.

Инъекционные ЛС, предназначенные для внутривенного введения, исследуют на крольчатах или щенятах при указанном способе введения или крысятах при внутрибрюшинном введении.

Выбор экспериментальных доз при проведении токсикологических исследований на развивающихся животных основывается на показателях среднесмертельных доз (LD_{50}), полученных при однократном введении препарата, и терапевтической дозы, указанной в инструкции по медицинскому применению. Как правило, фармакологические вещества испытываются в 2–3 дозах, максимальная из которых сопоставляется с LD_{50} ($1/10$, $1/20 LD_{50}$) при соответствующем способе введения и ограничивается физиологически допустимым объемом введения.

Длительность введения препаратов растущим лабораторным животным составляет 1–2 месяца или до наступления половозрелости с еженедельной оценкой основных интегральных показателей, ежемесячным исследованием периферической крови и функционального состояния основных органов и систем организма. В конце хронического эксперимента проводятся патогистологические исследования внутренних органов животных.

Основные параметры и процедуры оценки хронической токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличаются от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС». Следует отметить, что особое внимание должно быть уделено системам, которые в большей степени подвержены изменениям в различные возрастные периоды.

5. Особенности токсикологического изучения лекарственных средств на новорожденных животных

Особое внимание необходимо уделить изучению безопасности ЛС, предназначенных для применения у новорожденных и недоношенных детей. Незрелость систем детского организма (разная скорость всасывания лекарственных веществ из желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), повышенная проницаемость гемато-энцефалического барьера в первые 2–3 недели жизни, меньшая активность биотрансформирующих ферментов печени и экскретирующей функции почек) может привести к изменению кинетики, метаболизма ЛС и взаимодействия их с рецепторами.

У детей первого года жизни и особенно периода новорожденности всасывание ЛС из пищеварительного тракта происходит медленнее, чем в старшем возрасте. Это связано с медленным продвижением и перемешиванием пищи в желудке и кишечнике, незрелостью механизмов активного транспорта через стенку кишечника, их легкой повреждаемостью при нарушениях гемодинамики и гомеостаза. Кормление детей молоком может оказать существенное влияние на активность и токсичность препаратов, применяемых внутрь. Хорошо известно, что всасывание жира в кишечнике новорожденных ограничено функциональными возможностями самого кишечника и поджелудочной железы.

Все вышеизложенное объясняет необходимость проведения токсикологических исследований фармакологических веществ, предназначенных для применения у новорожденных и недоношенных детей, на новорожденных животных.

Для парентеральных способов введения препаратов, особенно обладающих раздражающим действием, необходимо учитывать возможное отсутствие у животных раннего возраста истинной воспалительной реакции как в ЖКТ, так и в подкожной клетчатке. Незрелость барьеров создает условия для превалирования резорбтивного действия над местным. В связи с этим LD_{50} некоторых веществ может существенно не отличаться при внутрибрюшинном и подкожном введении.

5.1. Выбор и содержание животных, подбор в экспериментальные группы

В эксперименте используют крысят 2–3 дневного возраста. Самки с крысятами содержатся в индивидуальных клетках со свободным доступом к пище и воде. Параметры

окружающей среды должны соответствовать санитарно-гигиеническим нормам, установленным для биоклиник (вивариев).

Подбор животных в экспериментальные группы осуществляется с учетом количества родившихся крысят, оставляя при этом не более 8 новорожденных в помете (желательно одинаковое количество самцов и самок). Каждую экспериментальную группу составляют не менее 3–4 пометов. Каждый помет делят на 3 части (примерно 3:3:2). Поскольку новорожденные мышата и крысята не имеют шерстного покрова, их нельзя метить краской, которая удаляется при уходе матери за пометом.

Важнейшим моментом при проведении манипуляций с новорожденными и сосунками является риск их гибели после возвращения в гнездо вследствие отказа матери от ухода за детенышем и причинения ему вреда. Крысят из гнезда обязательно берут в перчатках, проводят соответствующие манипуляции и отсаживают от матерей на некоторое время (не более 30 мин) в специально подготовленную теплую емкость, затем возвращают в гнездо.

5.2. Способ и длительность введения

Способ введения препарата, как правило, должен соответствовать рекомендуемому способу применения в клинике. При технической трудности выполнения рекомендуемого способа в эксперименте на новорожденных животных могут быть использованы альтернативные способы (например, внутрибрюшинный). Следует учитывать высокую системную экспозицию наружных лекарственных форм, обусловленную анатомо-физиологическими особенностями барьерной функции кожи у новорожденных, особенно недоношенных (тонкость рогового слоя, обильное кровоснабжение, слабовыраженный подкожный жировой слой). Длительность введения препарата новорожденным, как правило, не превышает 4 недели. Последующий период наблюдения должен обеспечивать адекватную оценку конечных точек токсикологического воздействия.

(Подбор доз для новорожденных ничем не отличается от того, что уже описано выше).

Примерная программа токсикологического изучения фармакологического вещества на новорожденных крысятах:

1. Отобрать беременных самок с конкретным сроком беременности и получить потомство с одинаковым сроком рождения.

2. На первом этапе эксперимента необходимо определить острую токсичность фармакологического вещества при внутрибрюшинном способе введения общепринятыми в токсикологическом эксперименте методами, используя новорожденных крысят из разных пометов на каждую экспериментальную дозу.

3. Второй этап исследований включает изучение токсичности фармакологического вещества в условиях длительного введения новорожденным крысятам (3–4 недели). Для этого необходимо сформировать экспериментальные группы новорожденных крысят, каждая из которых должна состоять из 3–4 пометов с численностью не менее 10 крысят в группе. При этом оценивается физическое развитие и поведение крысят, а в конце эксперимента проводятся гематологические, биохимические и патогистологические исследования и оценка влияния фармакологических веществ на функциональное состояние ЦНС. В случае необходимости исследования динамики гематологических, биохимических и других параметров следует увеличивать количество животных в группах (так как при взятии крови используют декапитацию животных).

Процедура оценки острой и субхронической токсичности, а также рекомендуемая форма представления результатов не отличается от типичных, описанных в базовом документе «Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС».

Интерпретация результатов исследования включает выводы о возможном влиянии препарата на процессы роста и развития, а также анализ различий его токсического действия у ювенильных и взрослых животных.

Заключение должно содержать обоснованное мнение авторов о возможности КИ изученного ЛС у детей конкретной возрастной группы (в том числе степень опасности острого и хронического отравления, прогноз возможных побочных реакций, рекомендации по мониторингу и минимизации риска неблагоприятных реакций).

Оформление отчета по доклиническому изучению общетоксического действия фармакологических средств для педиатрии проводится в соответствии с базовым документом.

Таблица 1

Эквиваленты возраста белых крыс (самцов) и человека (мужчин) по величинам истинной скорости роста массы тела

Период жизни крыс	Возраст крыс в месяцах	Возраст человека в годах
Ранний молочный	0,25	0,35
Средний молочный	0,5	1,56
Поздний молочный	1,0	4,80
Предпубертатный I	2,0	10,24
Предпубертатный II	3,0	14,20
Пубертатный	4,0	17,39
Репродуктивный	5,0	20,08
	6,0	22,32
	7,0	24,63

Таблица 2

Периодизация неполовозрелого возраста животных различных видов

Вид животных	Период молочного кормления			
	1. Возраст новорожденный (в днях)	Масса тела (в г)	2. Возраст подсосный (в днях)	Масса тела
Собаки	1–14	400–1000	15–45	1,0–2,5 кг
Кролики	1–7	50–90	8–30	90–450 г
Морские свинки	1	60–85	2–21	80–150 г
Белые мыши	1–5	1–3,8	6–21	3,8–8,8 г
Белые крысы	1–5	4–6	6–21	11–35 г
Вид животных	Период полового созревания			
	3. Возраст неполовозрелый (инфантильный)	Масса тела	4. Возраст предслучный (ювенильный)	Масса тела
Собаки	2–5 мес.	2,6–12 кг	6–8 мес.	12–18 кг
Кролики	31–90 дн.	0,46–1,6 кг	4–6 мес.	1,4–2,5 кг
Морские свинки	31–91 дн.	0,35–0,46 кг	51–151 дн.	0,35–0,65 кг
Белые мыши	22–40 дн.	8,5–14,5 г	41–60 дн.	13,5–21 г
Белые крысы	22–50 дн.	30–110 г	51–120 дн.	90–270 г

Таблица 3

Нервная система

Параметр развития	Период постнатального развития			
	Человек (годы)	Приматы (недели)	Собака (недели)	Крыса (дни)
Глутаматные рецепторы (максимальное связывание)	1–2 Кора Снижение у взрослых 2–16			28 Снижение у взрослых >28
Моноаминная система	2–4			21–30 Уровень взрослых
Глазные функции	0–3			21–15
Мозжечковый наружный зародышевый слой	0,6–2			0–21
Окончание быстрой фазы миелинизации	2			25–30
Умственное развитие Замедленная реакция на обучение	1–2	9–36	12–16	10–35

Таблица 4

Репродуктивная система

Параметр развития	Период постнатального развития				
	Человек (годы)	Макака резус (годы)	Собака (дни)	Мышь (дни)	Крыса (дни)
Половая зрелость	11–12	2,5–3	180–240	15–45	40–60

Таблица 5

Скелетная система

Параметр развития	Период постнатального развития					
	Человек (годы)	Обезьяна (годы)	Собака (годы)	Кролик (недели)	Крыса (недели)	Мышь (мышь)
Слияние центров оссификации						
Дистальный эпифиз бедренной кости	14–19	3–6	0,7–0,9	32	15–162	12–13

Таблица 6

Легочная система

Параметр развития	Период постнатального развития (дни)		
	Человек	Крыса	Мышь
Формирование альвеол			
Начало	Пренатально	1–4	1–2
Завершение	730	28	28

Таблица 7

Иммунная система

Параметр развития	Период постнатального развития (дни)	
	Человек	Мышь
Развитие В-клеток	Пренатально	Пренатально
Развитие Т-клеток	Пренатально	Пренатально
Развитие НК-клеток	Пренатально	21
Т-зависимый иммунный ответ	0	14 41–56 уровень взрослых
Т-независимый иммунный ответ	45–90	0 14–21 уровень взрослых
IgG уровень взрослых	1825	42–56

Таблица 8а

Почки (функция)

Параметр развития	Период постнатального развития (дни)	
	Человек	Крыса
Гломеруло-/Нефрогенез	Пренатально	8–14
СГФ и канальцевая секреция уровень взрослых	45–180	15–21

Таблица 8б

Почки (морфология)

Параметр развития	Период постнатального развития (недели)				
	Человек	Собака	Кролик	Мышь	Свинья
Завершение нефрогенеза	Пренатально на 35 неделе	2	2–3	Пренатально	3

Таблица 9

Метаболизм

Развитие I/II фазы метаболизма			
Созревание активности ферментов			
Фермент	Человек (годы)	Крыса (дни)	Кролик (дни)
CYP2D6	0–3	Нет данных	Нет данных
CYP2E1	0–1	4–17 Снижение у отъемышей (самцы>самки)	14–35 2-кратный уровень взрослого
CYP1A2	0,5 1 (> взрослых)	7–100 низкие уровни	21–60
CYP2C8	<1	Нет данных	Нет данных
CYP2C9	<0,5 0,5 (> взрослых)	Нет данных	Нет данных

Развитие I/II фазы метаболизма			
	Созревание активности ферментов		
СУРЗА4	0–2	Нет данных	Нет данных
Ацетилирование	1 (35% взрослых)	Нет данных	Нет данных
Метилирование	<1 (50% уровня взрослых)	Нет данных	Нет данных
Глюкуронирование	0 (> взрослых) 12		Нет данных
Сульфатирование	0	Нет данных	Нет данных

Таблица 10

Сердце

Параметр развития	Период постнатального развития (уровень зрелости, соответствующий взрослому)		
	Человек (годы)	Собака	Крыса (недели)
Электрофизиология (ЭКГ)	5–7	Нет данных	3–8
Сердечный выброс и гемодинамика	При рождении 138 уд/мин Взрослые 85 уд/мин <2 лет: меньший желудочковый объем, ударный индекс, фракция выброса в сравнении со взрослыми При рождении АД 62/40; 2 месяца 85/47; 0,5-8 лет диастолическое давление 58–62	Увеличение АД и снижение ЧСС от 1 недели до 0,5 года	Раннее увеличение ЧСС до постоянного у взрослых Высокий сердечный выброс и легочное сосудистое сопротивление
Миоциты	Диплоидные при рождении по сравнению с 60% у взрослых (40% полиплоидные)	Нет данных	Изначально диплоидные у детенышей и взрослых
Коронарные сосуды	Диаметр артерий удваивается к 1 году, максимальный к 30 годам. Капиллярный ангиогенез появляется постнатально, снижается с возрастом	Капиллярный ангиогенез появляется постнатально, снижается с возрастом	Капиллярный ангиогенез появляется постнатально, созревание артерий к 1 мес.
Сердечная иннервация	Количество нейронов увеличивается и достигает взрослого уровня в детстве	Развитие продолжается в течение 2–4 месяцев	Адренергические структуры созревают к 3 нед. Нервы – к 5 нед. Холинергические структуры созревают постнатально

Литература

1. Бортникова В.В., Крепкова Л.В., Арзамасцев Е.В., Шкаренков А.А. Методические подходы к доклиническому изучению безопасности лекарственных средств для применения в педиатрии. Мат. IV Междунар. конф. «Клинические исследования лекарственных средств». – М., 2004. – С. 31–32.

2. Гуськова Т.А. Особенности изучения токсичности лекарственных средств различных групп. Препараты для педиатрии. — В кн.: Токсикология лекарственных средств. — Москва, 2008. — С. 56–73.
3. Гуськова Т.А. Токсикологические аспекты одновременного использования различных лекарственных средств. — В кн.: Токсикология лекарственных средств. — Москва, 2003. — С. 116–140.
4. Максимова А.В., Енгальцева Г.Н., Сюбаев Р.Д. Актуальные вопросы экспертизы токсикологических исследований лекарственных средств, предлагаемых для применения в педиатрии. XVII РНК «Человек и лекарство». — М., 2010. — С. 531.
5. Крепкова Л.В., Бортникова В.В., Боровкова М.В., Гнутов В.Б. Токсикологическое изучение беллатаминала на неполовозрелых животных. — XVII РНК «Человек и лекарство» — М., 2010. — С. 649.
6. Маркова И.В. Современные проблемы возрастной фармакологии. Фармакол. и токсикол., 1981. — № 4. — С. 494–499.
7. Directive EMEA/CHMP/SWP/169215/2005/ Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for pediatric indications/ London, 24 January 2008.
8. Nonclinical Safety Evaluation of Pediatric Drug Products U.S. Department of Health and Human Services FDA, February 2006.
9. Guideline on the need for non-clinical testing in juvenile animals of pharmaceuticals for pediatric indications, EMEA, January, 2008.
10. Clinical Investigation of Medicinal Products in the Pediatric Population, ICH E11, December 2000.
11. Guidance on nonclinical safety studies for the conduct of human clinical trials and marketing authorization for pharmaceuticals ICH M3(R2) 15 July 2008.

ГЛАВА 2

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ АЛЛЕРГИЗИРУЮЩИХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: д. б. н. Л.П. Коваленко; д. б. н., проф. В.Н. Федосеева; член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев; к. б. н. А.С. Иванова; к. б. н. Т.Б. Мастернак; д. м. н. А.Н. Мионов; д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова; к. б. н. И.Б. Жоголева; д. м. н. О.Л. Верстакова, к. б. н. Л.У. Радченко

Введение

Настоящие методические рекомендации являются частью общей программы оценки безопасности фармакологических веществ и способствуют унификации и оптимизации методических подходов по выявлению аллергизирующего действия потенциальных лекарственных веществ в эксперименте на животных с целью получения информативных и сопоставимых результатов.

Использование стандартных методов при изучении аллергизирующих свойств фармакологических веществ особенно вновь синтезированных, дает возможность врачам более рационально назначать лекарства больным и тем самым снизить число аллергических осложнений лекарственной этиологии.

Материалы экспериментальной оценки фармакологического вещества, полученные по рекомендуемой программе, могут быть включены в протокол КИ, в проект инструкции по его медицинскому применению, а также, в некоторых случаях, могут быть использованы при решении вопроса о судьбе препарата наряду с фармакологическими и химиотерапевтическими данными.

1. Общие положения

Под аллергизирующими свойствами понимают способность того или иного вещества вызывать при введении в организм состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсибилизация) [1]. В основе патогенеза наиболее тяжелых аллергических осложнений, развивающихся по 1 типу гиперчувствительности, лежит активация Th2 хелперов и продукция цитокинов IL-4, IL-5 и IL-13, с последующим синтезом IgE-антител, имеющих высокое сродство к тучным клеткам и базофилам [3]. Антиген вступает во взаимодействие с фиксированными на тучных клетках IgE-антителами, что приводит к активации клеток и секреции медиаторов аллергии (гистамина, серотонина и др.). Согласно классификации P.G.H.Gell и P.R.A.Coombs имеется еще 4 типа гиперчувствительности, в основе которых лежат другие иммунопатологические механизмы [14].

Типы гиперчувствительности

1. Анафилактический тип — реакция между фиксированными на клетке антителами (АТ) IgE и специфическим антигеном (АГ) с последующим высвобождением медиаторов из клеток-мишеней. 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. Аллергические реакции, связанные с образованием иммунных комплексов в крови или тканях и активацией комплемента (феномен Артюса, сывороточная болезнь, увеит, лекарственная лихорадка, аллергический васкулит).

4. Клеточный тип — реакция сенсibilизированных лимфоцитов со специфическим АГ. Механизм действия по типу гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) (аллергические дерматиты). В настоящее время клеточный тип гиперсенсibilизации относят к иммунопатологическим реакциям.

5. Прямая стимуляция антителами функции клеток (стимуляция рецептора тирео-стимулирующего гормона щитовидной железы при тиреотоксикозе).

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

Реакции «немедленного» типа развиваются быстро, в течение нескольких мин (1–20 мин), в их механизме участвует реакция антиген–антитело в тканях и жидких тканевых средах.

Реакции «замедленного» типа — реакции между АГ и сенсibilизированными Т-лимфоцитами с последующим развитием (через 24–48 ч.) аллергического воспаления. Реакциям «немедленного» и «замедленного» типов соответствуют разные стадии аллергических реакций: иммунологическая, патохимическая, патофизиологическая.

При подборе тестов для исследования фармакологических веществ на алергизирующее действие необходимо руководствоваться следующими принципами: информативность, экономичность, воспроизводимость, оптимальное сочетание методов алергодиагностики *in vivo* и *in vitro*, использование таких методов, которые бы позволяли выявить разные типы аллергических реакций.

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 алергенность 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 алергенность.

При решении вопроса об исследовании неоригинального фармакологического вещества следует исходить из наличия достаточно обоснованных литературных сведений экспериментального и ретроспективного характера о способности оригинального лекарственного вещества и ЛП вызывать состояние сенсibilизации и степени ее проявления или отсутствия 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.

2.1. Контрольный препарат

Изучение сенсibilизирующих свойств нового фармакологического вещества, относящегося к известному фармакологическому классу, проводят в сравнении со стандартным лекарственным веществом.

При необходимости изучения неоригинального фармакологического вещества 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, овальбумин, 2,4,6-тринитрофенилсульфоокислота, 2,4,6-тринитрохлорбензол, 2,4-динитрохлорбензол, пикрилсульфоокислота и др.).

2.2. Характеристика фармакологического вещества

К моменту исследования необходимо располагать сведениями о физико-химических свойствах фармакологического вещества; составе готовой лекарственной формы; дозах (летальная и эффективная, рекомендуемая для КИ); 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 вещества определяется проектами временных фармакопейных статей на субстанцию и лекарственную форму в соответствии с требованиями Минздравсоцразвития России. Изучаемые образцы должны соответствовать проекту временной фармакопейной статьи.

2.3. Растворители и разбавители фармакологических веществ

Наиболее распространенными растворителями фармакологических веществ 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.

2.4. Исследуемые дозы

При исследовании сенсibilизирующих свойств фармакологических веществ наиболее оптимальным является исследование двух уровней доз. Минимальная доза — эффективная доза для данного вида животных ($ЭД_{50}$), максимальная — на порядок выше рекомендуемой для КИ или субтоксическая доза для данного вида животных (ориентировочно $10 ЭД_{50}$), 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 $ЛД_{50}$ ($1/10$, $1/100$, $1/1000$ от $ЛД_{50}$) 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 вещества 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 исследованиях 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.

2.5. Лабораторные животные

Исследования проводят на следующих видах лабораторных животных: морские свинки (масса тела 250–300 г), белые крысы популяции Wistar (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, 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. 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. Исследования проводят на молодых, здоровых и половозрелых животных.

Животные должны пройти карантин не менее 10–14 дней. В целях стандартизации перед исследованием животных не кормят в течение суток. Животные должны получать стандартную диету, представленную в виде сертифицированного комбикорма или набора натуральных кормов. Число животных в каждой группе должно быть достаточным (не менее 10), чтобы оценить характер, частоту и степень проявления аллергизирующих 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.

3. Выявление развития сенсibilизации

при различных путях поступления фармакологических веществ в организм

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

3.1. Эпикутанная сенсibilизация

Наиболее разработанным является метод эпикутанной сенсibilизации (см. раздел 3.4). 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, концентрации наносимого на кожу фармакологического вещества и др.). Поэтому проведению исследований по эпикутанной сенсibilизации обязательно предшествует изучение раздражающего действия фармакологического вещества.

3.2. 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.

3.3. Ингаляционное введение фармакологического вещества

Определение сенсibilизирующих свойств фармакологических веществ, предназначенных для ингаляционного применения, осуществляется при распылении тест-препарата дозирующими баллончиками или ингаляторами непосредственно в носоглоточную полость на протяжении 4 недель 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 веществ на чувствительность гладких мышц трахеобронхиальной цепочки в эксперименте на морских свинках.

3.4. Пероральное введение фармакологических веществ

Морским свинкам в ротовую полость или в желудок через мягкий пластмассовый зонд 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 вещества рекомендуется использовать реакции: непрямой дегрануляции тучных клеток или базофильных лейкоцитов, кожные пробы.

4. Методы выявления сенсibiliзации

Единого метода, с помощью которого можно зарегистрировать алергизирующее действие фармакологических веществ, не существует. Отсюда следует, что система исследований потенциальных ЛП 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 веществ можно рекомендовать следующие технически простые и хорошо воспроизводимые.

I. Тесты *in vivo*

Оценка анафилактогенной активности в реакции общей анафилаксии (анафилактический шок)

2. Кожные тесты:

- а) активная кожная анафилаксия;
- б) пассивная кожная анафилаксия;
- в) реакция гиперчувствительности «замедленного» типа на мышах или морских свинках;
- г) 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*

Реакция непрямой дегрануляции тучных клеток или базофильных лейкоцитов.

Возможности выявления сенсibiliзации не ограничиваются предложенными методиками, так как в настоящее время с целью обнаружения алергизирующих свойств разработано и широко применяется множество других методов исследований, в том числе определение магния в сыворотке крови, колориметрический метод определения гистамина в крови и органах животных, определение массы и клеточности подколенных лимфоузлов, так называемый PLNA тест и т.д. Следует отметить, что наиболее информативными являются методы, с помощью которых можно определить специфические для данного лекарственного вещества иммуноглобулин Е, патологическая роль которого доказана в развитии наиболее серьезных алергических осложнений. Из диагностических методов *in vitro* наиболее чувствительными являются методы иммуноферментного анализа и проточной цитометрии [7, 9]. Наиболее оптимальный подбор тестов зависит от направленности фармакологического действия вещества. Выявлению сенсibiliзации к фармакологическим веществам может способствовать также и оценка некоторых специфических показателей, таких как увеличение абсолютного числа или относительного количества эозинофилов и базофилов, концентрация в сыворотке крови биогенных аминов (гистамин, серотонин и др.), эозинофилия тканей и др. Исходя из длительной апробации перечисленных методов при экспериментальной оценке сенсibiliзирующих свойств лекарственных веществ и учитывая удовлетворительную корреляцию данных, полученных в эксперименте, с результатами КИ на людях, можно рекомендовать их как

основные в целях унификации исследований аллергозов и накопления экспериментальных данных. Эти тесты доступны для серийных исследований. Результаты, полученные с их помощью, хорошо воспроизводимы.

4.1. Оценка анафилактогенной активности

Оценка анафилактогенной активности является обязательным исследованием при изучении аллергизирующих свойств новых лекарственных веществ. При изучении высокомолекулярных и белковых соединений, препаратов, содержащих медиаторы аллергического воспаления (гистамин, серотонин, лейкотриены и др.) или новых препаратов известных групп, которые по литературным данным имеют высокий процент аллергических осложнений I типа, необходимо изучать возможную сенсибилизацию не менее чем по 2-м методам из представленных в этом подразделе.

4.1.1. 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 сенсибилизирующей инъекции. Разрешающая доза должна быть равна суммарной сенсибилизирующей 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 [20].

4.1.2. Активная кожная анафилаксия

При изучении активной кожной анафилаксии сенсибилизация та же, что и при изучении общей анафилактической реакции [18]. На 14–21-й дни на выстриженных участках спины морским свинкам внутрикожно вводят препарат в двукратных разведениях, в концентрациях, не вызывающих кожнораздражающего действия. Через 20 мин морским свинкам вводят внутривенно по 0,5 мл 1% раствора синего Эванса. Через 30 мин животных подвергают эвтаназии 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 исследований 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 сенсибилизации групп животных, получавших препарат, 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.

4.1.3. Реакция общей анафилаксии на овальбумин

Вторая модель реакции общей анафилаксии выбрана на основе экспериментальных доказательств аллергизирующих свойств овальбумина, селективно стимулирующего Th2 хелперы с последующей секрецией IL-4, IL-5, IL-13 и синтеза IgE антител [17]. Данный метод позволяет выявить усиление или ослабление I типа гиперчувствительности под воздействием исследуемого соединения. Интактных морских свинок иммунизируют овальбумином или для получения более слабой системной анафилаксии раствором белка куриного яйца (БКЯ, основным аллергическим компонентом которого является овальбумин). Для

получения реакции общей анафилаксии животных контрольной и получавших препарат групп иммунизируют перорально 1% БКЯ в дозе 1 мл на 250 г массы тела в течение трех дней (растворенный в физиологическом растворе БКЯ морским свинкам вводят через мягкий пластмассовый зонд) [11]. Через 12 дней после начала иммунизации БКЯ животным получавших препарат групп в течение трех дней в/б вводят исследуемое соединение не менее чем в 2-х дозах, контрольным животным — соответствующий объем физиологического раствора. На следующие сутки животным получавших препарат групп внутрибрюшинно вводят препарат в изучаемых дозах, контрольным животным — физиологический раствор. Через 1 ч животным всех групп внутрисердечно вводят овальбумин или БКЯ в дозе 1 мг на 300 г массы тела, после чего регистрируют развитие анафилактической реакции. В контрольной группе у всех животных, иммунизированных БКЯ, развивается анафилактический шок различной степени тяжести (обычно легкий и умеренный).

Вычисление анафилактического индекса по Weigle [20] проводят по следующей формуле:

$$\frac{(N \times 4) + (N_1 \times 3) + (N_2 \times 2) + (N_3 \times 1) + (N_4 \times 0)}{N + N_1 + N_2 + N_3 + N_4},$$

где N — число морских свинок, у которых наступила смерть; N_1 — число морских свинок, у которых развился тяжелый шок; N_2 — число морских свинок, у которых развился умеренный шок; N_3 — число морских свинок, у которых развился слабый шок; N_4 — морские свинки, у которых не наступило шока.

При гибели всех животных в группе индекс Weigle составляет 4(++++). При тяжелом шоке — 3(+++), при умеренном шоке — 2(++), при слабом шоке — 1(+).

4.1.4. Пассивная кожная анафилаксия

Для получения сывороток, содержащих аллергенспецифический IgE к овальбумину, используют мышей Balb/c массой 18–20 г. Сенсибилизацию мышей осуществляют путем внутрибрюшинного введения каждому животному 150 мкг трижды перекристаллизованного овальбумина (Sigma) в 0,5 мл физиологического раствора в смеси с 7,5 мг (Aluminum Hydroxide Gel, Sigma) $Al(OH)_3$ [15].

В ходе эксперимента, начиная со дня сенсибилизирующей инъекции, группам мышей, получающим препарат, трехкратно внутрибрюшинно вводят исследуемое соединение не менее чем в двух дозах, контрольным животным — соответствующий объем растворителя. Взятие крови у мышей и выделение сыворотки осуществляют на 10 день после сенсибилизации.

Для постановки ПКА используют нелинейных крыс самцов или крыс самцов линии Вистар массой 150–200 г. Животным внутрикожно вводят микрошприцом по 30 мкл физиологического раствора (контроль) и по 30 мкл последовательных двукратных разведений (начиная с разведения 1:4 до 1:32) сывороток мышей контрольной и получающих препарат групп, содержащих аллергенспецифический IgE к овальбумину. Инъекцию овальбумина в разрешающей дозе делают крысам в хвостовую вену через 24 ч после пассивной сенсибилизации кожи. Антиген вводят из расчета 100 мкг овальбумина на 100 г массы тела в 1 мл 0,5% раствора синего Эванса на физиологическом растворе. Интенсивность ПКА оценивают через 30 мин по прокрашиванию участков кожи, для чего животных подвергают эвтаназии под эфирным наркозом цервикальной дислокацией, кожу отсепааровывают и выраженность реакции определяют по диаметру прокрашенного участка, измеряемому на внутренней поверхности кожи. Реакция считается положительной, если диаметр синего пятна был не менее 5–6 мм, а контроль был не больше 2–3 мм.

4.2. Реакция гиперчувствительности замедленного типа на мышцах

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 группе животных, получавших исследуемый препарат. 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.

4.3. Реакция гиперчувствительности замедленного типа на морских свинках

Животных получающих препарат групп сенсибилизируют однократно, в подушечки всех лапок или 2-х задних лапок, тест-препаратом в смеси с ПАФ в объеме 0,5 мл, в отношении 1:1. Испытуемый препарат вводят 2 группам животных в дозах: терапевтическая доза и в 10 раз ее превышающая [4]. Контрольным животным аналогичным способом вводят только ПАФ.

На 21-й день исследования животным на выстриженный участок спины внутрикожно (в/к) вводят разрешающую дозу препарата. Разрешающей дозой при в/к введении будет являться та концентрация препарата, которая у интактных животных не вызывает раздражающего действия. Для контроля реактивности кожи на другой выстриженный участок кожи вводится в/к 0,05 мл растворителя (фосфатный буфер рН 7,2 или стерильный изотонический раствор натрия хлорида). Через 1, 24 и 48 ч определяют наличие положительной реакции. Реакцию оценивают на наружной поверхности кожи по шкале С.В. Суворова через 24 ч и оценивают в баллах по следующей шкале [10]:

- видимой реакции нет;
- бледно-розовая эритема по всему участку или по его периферии;
- ярко-розовая эритема по всему участку или его периферии;
- красная эритема по всему участку;
- инфильтрация и отек кожи (утолщение кожной складки) при наличии или отсутствии эритемы;
- эритема, выраженная инфильтрация, очаговые изъязвления (некроз), возможны геморрагии, образование корочек.

Следует отметить, что гиперергическая реакция, оцениваемая в 5 баллов, развивается крайне редко и в ряде случаев через 3–4 сут.

4.4. Метод накожных аппликаций

На выстриженный участок кожи боковой поверхности туловища морских свинок-альбиносов, ближе к середине туловища, наносят по 3 капли раствора испытуемого вещества, приготовленного на дистиллированной воде или других растворителях (ацетон, этиловый спирт, вазелиновое масло и др.). Если вещество нерастворимо, то наносят по 0,5 г мази, приготовленной на вазелине или ланолине. Дозы для эксперимента определяют в соответствии с разделом 1.5. Вещество наносится на протяжении 2 нед по 5 раз в неделю.

Реакцию кожи учитывают ежедневно по шкале оценки кожных проб [2, 5]. Этот эксперимент позволяет выявить опасность развития неаллергического контактного дерматита в зависимости от дозы изучаемого фармакологического вещества.

Исследование сенсибилизирующего действия вещества проводят путем 20 повторных накожных аппликаций на участок боковой поверхности туловища размером 2×2 см по 5 раз в неделю. Если наносят жидкость, то ее дозируют пипеткой и берут по 3 капли (1 мл водного раствора — 60 капель, ацетона — 40, вазелинового масла — 51). Если применяют мазь, то ее наносят равномерным слоем на весь участок аппликации с помощью глазной стеклянной лопаточки. Более 20 накожных аппликаций проводить не следует, так как они могут оказать гипосенсибилизирующее действие, особенно если фармакологическое вещество является слабым аллергеном.

Первое тестирование проводят после 10 аппликаций и в случае выявления аллергии дальнейшее нанесение вещества можно прекратить. При отрицательном или сомнительном результате число аппликаций обязательно доводят до 20, после чего животных тестируют повторно.

4.5. Конъюнктивальная проба

Сенсибилизацию животных осуществляют в соответствии со способом введения тестируемого препарата в клинику. Для постановки пробы 1 каплю водного раствора аллергена вводят глазной пипеткой с вытянутым тонким концом под верхнее веко получающим препарат и контрольным морским свинкам, во второй глаз (контрольный) вводят 1 каплю воды. Закапывание удобно производить при положении животного лежа головой вниз [5].

Реакции учитывают через 15 мин (быстрая реакция) и через 24–48 ч (гиперчувствительность замедленного типа) и оценивают по следующей шкале (в баллах):

1 — легкое покраснение слезного протока;

2 — покраснение слезного протока и склеры в направлении к роговице;

3 — покраснение всей конъюнктивы и склеры. Реакция сопровождается зудом и при расчесывании лапками возможно развитие гнойного офтальмита. Подбор концентрации аллергена осуществляется путем закапывания различных концентраций в глаз несенсибилизированного животного.

4.6. Метод оценки чувствительности гладких мышц трахеобронхиальной цепочки морских свинок при ингаляционном пути введения тест-препарата

Сразу же после эктаназии морских свинок готовят изолированную трахеобронхиальную цепочку из 16–20 отдельных колец трахеи, связанных по стороне хряща тонкой шелковой ниткой таким образом, чтобы участки гладких мышц, соединяющих хрящевые концы отдельных колец, находились на одной линии и составляли продольную полосу длиной 3–4 см. Приготовленную цепочку помещают в отдельный сосуд — «баню», который заполняют 10 мл питательного раствора Кребс—Гензелейта с температурой 35–37 °С [13].

Состав раствора в г/л Н₂О:

NaCl — 6,87,

KCl — 0,42,

CaCl₂ — 0,28,

NaHPO₄ — 0,15,

MgSO₄ × 7H₂O — 0,29,

NaHCO₃ — 2,1,

глюкоза — 1,0.

Через питательный раствор в течение всего исследования пропускают газовую смесь, состоящую из 95% O₂ и 5% CO₂. Исследуемые вещества вносят в «баню» в объеме 0,1–0,2 мл, затем цепочку многократно отмывают свежими порциями питательного раствора. Повторно вещества в исследуемых концентрациях вносят через 15–20 мин. Определяют концентрацию препаратов, которые вызывают пороговое сокращение цепочки. Ее чувствительность к каждому веществу выражают в микрограммах на миллиметр.

4.7. Непрямая реакция дегрануляции тучных клеток (РДТК)

Постановку РДТК осуществляют следующим образом [3, 8]. Для получения тучных клеток крыс животных подвергают эвтаназии кровопусканием, вводят внутривенно 5–8 мл подогретого до 37 °С раствора Тирода без глюкозы, после легкого массажа брюшной стенки в течение 1–1,5 мин делают ножницами по средней линии разрез длиной 1,5–2 см, переворачивают тушку разрезом вниз и собирают экссудат, стекающий с петель кишечника в смоченную гепарином пробирку. Препараты готовят на обезжиренных предметных стеклах, окрашенных 0,3 % спиртовым раствором нейтрального красного и высушенных при комнатной температуре.

К 0,03 мл взвеси тучных клеток добавляют 0,03 мл сыворотки получавшего препарат животного и 0,03 мл специфического аллергена (например, исследуемого фармакологического вещества).

Исследуемое фармакологическое вещество должно быть растворимо в воде. Разведение фармакологического вещества обычно составляет 1:100 или более, чтобы в контроле на антиген дегрануляция тучных клеток не превышала 5 %.

Далее препараты покрывают покровным стеклом, края которого смазывают вазелином, затем инкубируют 15 мин в термостате при 37 °С. Препараты микроскопируют под увеличением × 20.

Оценку результатов проводят дифференциальным способом учета, подсчитывают показатель дегрануляции тучных клеток (ПДТК) по формуле:

$$ПДТК = \frac{1a + 2b + 3c + 3d}{100},$$

где a, b, c, d — количество (среднее из трех повторений) дегранулированных клеток соответственно степени дегрануляции (слабовыраженной, умеренной, резкой и степени полностью дегранулированных клеток). В каждой камере подсчитывают 100 клеток, если ПДТК превышает 0,2. При постановке реакции необходимо учитывать следующие контроли: перитонеальной взвеси тучных клеток, аллергена и сыворотки. В контрольных пробах до нужного объема доводят растворителем (фосфатный буфер pH 7,2): необходимо учитывать отсутствие подбора оптимальных доз антигена и исследуемой сыворотки, нарушение pH среды. В качестве метода выбора может быть использована реакция дегрануляции базофильных лейкоцитов кролика (непрямой тест Шелли).

5. Псевдоаллергические реакции

Известно, что многие лекарственные вещества и химические вещества высвобождают медиаторы, в том числе гистамин, неспецифически, в результате прямого действия на ТК и базофильные лейкоциты. Такой механизм гистаминолиберации характерен

для так называемых псевдоаллергических реакций, а вещества, вызывающие эти реакции, называются неиммунологическими активаторами (конканавалин А, 48/80, декстран и др.) [9, 15, 16].

В настоящих методических рекомендациях предлагается также использовать метод определения процента гистаминолиберации из ТК крыс по реакции конденсации медиатора с ортофталевым альдегидом. Для этой цели адекватным методом является метод Шор.

5.1. Реакция воспаления на конканавалин А у мышей

Реакция воспаления на Кон А (псевдоаллергическая реакция) основана на способности Кон А неспецифически, т.е. без участия реагинов с аллергенами на мембранах клеток-мишеней, в результате прямого действия на рецепторы мембран тучных клеток и базофильных лейкоцитов высвобождать медиаторы воспаления (гистамин, серотонин, лейкотриены и др.) [7].

Исследования проводят на мышках-самцах линии СВА или беспородных мышках массой 18–20 г. Исследуемое фармакологическое вещество вводят рекомендуемым для клинического применения способом не менее чем в 2 дозах: терапевтически эффективной (для мышей) и субтоксической. Животным контрольной группы аналогичным способом вводят соответствующий объем растворителя. Через 1 ч (или через время максимальной концентрации препарата в крови) мышам, получавшим препарат, и контрольной групп субплантарно (в подушечку задней стопы) вводят Кон А в дозе 100 мкг/20 г массы тела (20 мкл раствора в концентрации 5 мг/мл), в контралатеральную конечность — тот же объем изотонического раствора натрия хлорида. Таким образом, Кон А вводят в концентрации, значительно превышающей оптимальную (1–10 мкл/мл) в исследованиях по изучению митогенной активности. Через 1 ч мышей подвергают этаназии, определяют массу лап и подсчитывают индекс реакции воспаления (Ир) по формуле:

$$I_p = \frac{P_{on} - P_k}{P_k} \times 100\%,$$

где P_{on} — масса стопы задней лапы, в подушечку которой вводили Кон А, P_k — изотонический раствор натрия хлорида.

Статистически достоверная разница между данными получавших препарат и контрольной групп, превышающая 20%, считается значимой.

5.2. Метод Шор

Работа выполняется на интактных крысах популяции Wistar (1–2 животных для исследования одного вещества). После декапитации животному внутрибрюшинно вводят 5–10 мл подогретого до 25 °С раствора Хенкса, аккуратно массируют живот в течение 90 с. Вскрывают брюшную полость по средней линии и отсасывают взвесь ТК пипеткой или сливают в пробирки [19]. Эритроцитов не должно быть. Тучные клетки осаждают центрифугированием в течение 5 мин при 1000–1500 об/мин и готовят в растворе Хенкса 10 мл взвеси ТК с концентрацией 105 кл/мл. Для подсчета клеток используют 0,1 % раствор нейтрального красного.

Выявление гистаминолибераторного действия исследуемого вещества:

а) в предварительном эксперименте подбирают нетоксическую дозу фармакологического вещества;

б) с целью инкубации с исследуемым веществом ТК разливают в 2 параллельные пробирки по 1 мл в указанной концентрации. К взвеси добавляют по 100 мкл тест-препарата в нетоксической для ТК концентрации. Пробирки слегка встряхивают и инкубируют в течение 10 мин при температуре 37 °С. Для остановки процесса гистаминолиберации в пробирки добавляют по 1,5 мл охлажденного раствора Хенкса, центрифугируют 5–10 мин при 1000–1500 об/мин и надосадок сливают в чистые пробирки для определения выделившегося гистамина. К осадкам добавляют 0,1 мл 1% раствора

трилона X-100, выдерживают при комнатной температуре 5–7 мин, добавляют 2,5 мл раствора Хенкса.

В качестве контроля используют:

1-я пробирка — стандартный раствор гистамина (1 мкг/мл 100 % содержание гистамина);

2-я пробирка — раствор Хенкса (флюоресценции не должно быть);

3-я пробирка — 1 мл взвеси ТК в концентрации 10⁵;

4-я пробирка — 1 мл рабочего раствора Хенкса.

3-я и 4-я пробирки ставятся для проверки чистоты реактивов. Исследуемое вещество оценивают на степень спонтанной флюоресценции или способность ее ингибировать.

5.3. Реакция конденсации с ортофталевым альдегидом (ОФА)

В четыре опытные пробирки (2 — с надосадочной жидкостью и 2 — с тучными клетками, лизированными трилоном) и контрольные 3-ю и 4-ю добавляют по 0,2 мл 3М NaOH и 0,1–0,2 мл ОФА. Обязательно встряхивают каждую пробирку сразу же после добавления ОФА. Через 4 мин добавляют 0,15 мл 1,5% H₃PO₄ (среда должна быть кислая). Флюориметрия — через 10 мин после стабилизации раствора ортофосфорной кислотой, измеряют флюоресценцию на спектрофлюориметре Хитачи НРр-4. Сначала измеряют величину свечения контрольных проб, затем опытных образцов [13].

Процент выхода гистамина рассчитывают по формуле:

$$\frac{A}{A+B} \times 100,$$

где А — процент выделившегося гистамина из ТК (надосадочная жидкость); В — процент гистамина, оставшегося в ТК (осадок ТК).

Определение рабочей зоны тест-препарата осуществляется опытным путем. Обычно это уже 10⁻⁴–10⁻⁶ молей. К 900 мкл суспензии ТК в концентрации 10⁶ добавляют 100 мкл исследуемого вещества (инкубируют 10–15 мин в термостате при 37 °С). Затем подсчитывают живые клетки по исключению трипанового синего (каплю клеточной суспензии при комнатной температуре смешивают с каплей 0,1 % раствора трипанового синего и через 1–3 мин подсчитывают число погибших, т. е. окрашенных клеток), количество погибших клеток не должно превышать 5 %.

Ставится контроль на отсутствие спонтанной дегрануляции:

ТК + трипановый синий — мертвые клетки ≤ 5 %.

6. Оценка сенсibilизирующих свойств лекарственных средств

Степень аллергенной активности фармакологического вещества устанавливается в зависимости от ряда критериев, определенных в эксперименте на животных: величина сенсibilизирующей дозы, степень развития аллергического состояния, частота и характер проявления аллергической реакции, величина титра сенсibilизации и др.

Результаты исследования позволяют сделать следующие выводы.

Если число сенсibilизированных животных в группе по одному из использованных тестов составляет менее 50 %, то наблюдаемые эффекты рассматриваются как проявление индивидуальной чувствительности.

Если число сенсibilизированных животных в получавших препарат группе составляет 50% и более, то фармакологическое вещество относится к потенциальным аллергенам, что следует учитывать при оценке степени потенциальной опасности развития аллергоза в клинической практике.

Если обнаружено, что изученное фармакологическое вещество вызывает псевдоаллергические реакции, необходимо продолжить исследования для установления дозы, которая не вызывает неспецифического выброса гистамина, и внести эти сведения в проект инструкции.

Работа по изучению потенциальной аллергенности фармакологических веществ с использованием описанных методов требует хорошей профессиональной подготовки и должна проводиться иммунологами и научными работниками, прошедшими необходимую стажировку в специальных лабораториях.

Заключение

Данные методические рекомендации характеризуют процедуру проверки, но не являются пособием для освоения методов. Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Адо А.Д. // Общая аллергология. — М.: Медицина, 1978. — 462 с.
2. Алексеева О.Г., Дуева Л.А. // Аллергия к промышленным химическим соединениям. — М., Медицина, 1978. — 271 с.
3. Гуцин И.С. // Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. — М.: Фармарус Принт, 1998. — 250 с.
4. Иммунологические методы // Под ред. Г. Фримеля. — М.: Медицина, 1967. — 472 с.
5. Кудрина Г.П., Шашкина Л.Ф., Иванова В.М. и др. // Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств. — М., 1988.
6. Любимов Б.И., Коваленко Л.П. // Опыт оценки безопасности фармакологических средств в России (1991–1996). Проблемы и перспективы. Тез. докл. симп., 12–13 ноября 1996–1997 г.
7. Никитин В.М. // Справочник методов иммунологии. — Кишинев, 1982. — 303 с.
8. Радунская С.Ф. — Тест непрямой дегрануляции тучных клеток крыс для оценки специфической активности неинфекционных аллергенов: Дисс. ... канд. мед. наук. — М., 1982. — С. 54–59.
9. Руководство по иммунофармакологии // Под ред. Дейла М.М., Формена Д.К. — Медицина, М., 1998. — 332 с.
10. Суворов С.В. // Профилактика профессиональных заболеваний кожи рабочих железнодорожного транспорта как комплексная гигиеническая проблема. — М., 1974. — С. 103–122.
11. Хлопушина Т.Г., Кринская А.В., Коваленко Л.П. и др. — Влияние зиксорина на фармакокинетику антипирина у интактных и сенсибилизированных морских свинок // Бюл. экспер. биол. и мед., 1991. — № 7. — С. 67–69.
12. Черноусов А.Д. // Гигиена труда и профессиональные заболевания. 1987. — № 6. — С. 45–48.
13. Юденфред С. // Флуоресцентный анализ в биологии и медицине. — М.: Мир, 1965. — С. 45–48.
14. Cell P.G.H., Coombs P. R. A. // Clinical aspects of immunology. — Oxford, Edinburg, 1975. — 1754 P.
15. Faquim-Mauro E.L., Macedo M.S. Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and of IL-4-Independent, non-anaphylactic-type IgG2A antibodies is modulated by adjuvants // Int. Immunology. — 2000. — Vol. 12. — No. 12. — P. 1733–1740.
16. Khosravi E. et al. - Allergic conjunctivitis and uveitis models: Reappraisal with some marketed drugs // Inflamm. Res. — 1995. — Vol. 44. — P. 47–54.
17. Kimber I., Kerkvliet N.I., Taylor S.L. et al. Toxicology of protein allergenicity: prediction and characterization // Toxicol. Sci. — 1999. — Vol. 48. — P. 157–162.
18. Ovary Z. Immediate reaction in the skin of experimental animals provoked by antibody antigen interactions // Progr. Allergy. — 1958. — Vol. 5. — P. 459.
19. Shore P.A., Burkhalter A., Coch V.U.J. A method for the fluorometric assay of histamine in tissues // J.Pharmacol.Exp. Ther. — 1959. — Vol. 127. — P. 182–186.
20. Weigle W.O., Cochrane C.G., Dixon F.J. Anaphylactogenic properties of soluble antigen-antibody complexes in guinea pig and rabbit // J.Immunol. — 1960. — Vol.85. — P.469–477.

ГЛАВА 3

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ ИММУНОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: академик РАМН, проф. Р.М. Хаитов; к. б. н. А.С. Иванова;
д. б. н. Л.П. Коваленко; член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев, д. м. н. А.Н. Миронов;
д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; к. б. н. Т.Б. Мастернак; к. б. н. О.Н. Стеценко;
д. м. н., проф. Р.И. Атауллаханов; член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова*

Введение

В последние два десятилетия возрастающее количество публикаций о повреждающем действии на иммунную систему факторов загрязнения окружающей среды и ряда ЛП привело к формированию самостоятельного научного направления — иммунотоксикологии.

Иммунотоксикология зародилась во второй половине 70-х годов XX столетия. В 1979 г. в «Анналах Нью-Йоркской 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 [15, 17].

Иммунотоксикология в исследовательском плане определяется как наука, занимающаяся идентификацией и анализом внешнесредовых агентов, химических, пищевых и лекарственных факторов, которые вызывают изменения иммунитета [18].

Первое десятилетие существования иммунотоксикологии было ознаменовано развитием исследований по следующим направлениям [15, 22]:

— доказательство того, что иммунная система организма может являться мишенью поражающего действия ксенобиотиков;

— подтверждение того, что иммуносупрессия, гиперчувствительность и аутоиммунные процессы могут являться нежелательными последствиями воздействия ксенобиотиков;

— разработка стандартной группы тестов для изучения иммунотоксичности на грызунах.

К настоящему времени поле научных интересов в области иммунотоксикологии представляет собой четко ограниченную область иммунологии, основывающуюся на токсикологических принципах. Так как во всем мире в обществе растет понимание важности связи между иммунитетом и общим состоянием здоровья человека, значение иммунотоксикологии возрастает до степени жизненно важного междисциплинарного направления.

В настоящее время иммунотоксикология 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 иммунотоксического действия фармакологических средств до настоящего времени остаются предметом поиска и дискуссий во всем мире.

В нашей стране был разработан ряд соответствующих методических рекомендаций, регламентирующих изучение влияния на иммунную систему фармакологических средств, изучение аллергизирующего и иммунотоксического действия потенциальных ЛП [2, 3, 7, 8, 11, 13].

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 [28].

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

Предложенный подход к оценке иммунотоксического 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 иммунотоксичность должны подвергаться новые, оригинальные фармакологические средства, а также известные ЛС, для которых отсутствуют данные об изучении иммунотоксичности, рекомендуемые:

- а) для применения длительными повторными курсами;
- б) 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 индивидуально вопрос об изучении иммунотоксичности препаратов:

- а) предназначенных для лечения злокачественных новообразований;
- б) однократно или коротким неповторяющимся курсом.

Тестирование не обязательно для препаратов, предлагаемых:

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

Методические рекомендации предназначены для сотрудников исследовательских лабораторий, занимающихся доклиническими исследованиями потенциальных ЛС.

Настоящие Методические рекомендации являются частью общей программы доклинического изучения безопасности новых ЛС и направлены на оценку потенциального риска для иммунной системы человека.

2. Методология иммунотоксического тестирования

Главной задачей иммунотоксикологии является разработка стратегии оценки состояния иммунитета, которая позволит четко прогнозировать последствия влияния экзогенных факторов на иммунную систему человека.

Наиболее подробно и тщательно вопросы методологии иммунотоксикологического исследования были рассмотрены в 1994 г. на рабочем совещании, состоявшемся в Арлингтоне (США) [25]. При тестировании на иммунотоксичность предлагается использовать этапный подход, как правило, двух- или трехуровневый. При оценке иммунотоксичности приоритет отдается функциональным методам иммунологического исследования, морфологические и гистологические исследования служат дополнением. На совещании большое внимание уделялось стандартизации методов: валидность

метода (селективность, специфичность, чувствительность, точность и воспроизводимость); выбор животных (видовые и генетические особенности); межлабораторная верификация исследований.

Существующие представления о ходе развития защитных реакций иммунной системы [12] свидетельствуют о том, что в эксперименте обнаружить повреждения в иммунной системе под воздействием химических или фармакологических средств с большей вероятностью можно при использовании модели антигенного стимула, т. е. на фоне развития специфического иммунного ответа, включающего в себя все этапы иммунного реагирования.

При обсуждении условий проведения исследований иммуотоксических свойств фармакологических средств наибольшие дискуссии вызывают вопросы выбора методов, доз и схем введения исследуемого препарата.

Накопленный 20-летний опыт изучения иммуномодулирующего и иммуотоксического действия фармакологических средств определяет использование комплексного подхода. Этот подход включает в себя изучение действия исследуемого соединения как при однократном введении в широком диапазоне доз, различающихся на 3–4 порядка, так и при курсовом введении в дозах, отобранных при однократном введении с учетом дозы, рекомендуемой для клинического изучения и ЛД₅₀ препарата.

Однократное введение фармакологического средства с перерывом в 1 ч от введения антигена позволяет выявить прямое действие на иммунные реакции и на клетки иммунной системы. Курсовое введение позволяет оценить и не прямое иммуотоксическое действие, связанное с нарушением органов и систем организма, сопряженных с иммунной системой (нервная и эндокринная системы, печень и др.).

Для предварительного анализа иммуотоксичности фармакологического средства могут быть использованы:

— данные литературы о влиянии на иммунную систему аналогов или близких по действию и химической структуре веществ;

— результаты изучения общетоксического действия, полученные при изучении подострой и хронической токсичности. Окраска органов иммуногенеза азуром 2 и эозином вместо традиционно используемого в токсикологии гематоксилина позволяет оценить зональную принадлежность и степень дифференцировки иммунокомпетентных клеток. Оценку активности морфологических изменений в лимфоидных органах можно проводить с использованием метода рангов (приложение 2).

3. Условия проведения эксперимента

3.1. 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 1/10–1/20 ЛД₅₀.

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 (CBA \times C57BL/6)F, 6–8-недельного возраста массой 18–20 г.

3.2. 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.

3.3. Экспериментальные животные

Используются сертифицированные животные: мыши CBA, 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 инбредных линий. Наиболее доступными в наших условиях являются мыши-гибриды (CBA \times C57BL/6)F1, и (C57BL/6 \times 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 получавшие препарат 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 наследуемый 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 иммуноотропных препаратов иммуностимулирующего и иммуносупрессирующего действия.

3.4. Обоснование предлагаемых методов и подходов к оценке иммунотоксичности на первом этапе исследования

Luster и соавт. в руководстве «Methods in Immunotoxicology» [23] приводят доказательства высокой прогностической ценности использования комплекса перечисленных методов для оценки риска при изучении иммунотоксического действия.

Используется один из предложенных или другие адекватные поставленным задачам методы.

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

Таблица 1

Программа первого этапа оценки иммунотоксического 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 Эрне). 2. Реакции гемагглютинации и гемолиза
Клеточный иммунный ответ	Индукция реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к корпускулярному антигену и/или гаптену	Реакция ГЗТ к ЭБ или гаптену – тринитробензолсульфоновой кислоте (ТНБС)
Активность фагоцитов	Оценка фагоцитарной и бактерицидной активности фагоцитирующих клеток разной локализации	1. Фагоцитоз агентов различной природы (ЭБ, тушь, латекс, стафилококк и др.) перитонеальными макрофагами. 2. Хемилюминесценция клеток при фагоцитозе опсонизированного материала. Определение активности фермента 5'-нуклеотидазы

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 [3, 8, 13, 20, 21]. Именно этот интегральный показатель широко используется многими исследователями на первом этапе тестирования фармакологических средств. Оценка иммуотропного 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 [5].

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 сенсibilизации тринитробензолсульфоновой 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 иммунотоксичности 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 [10]. Установлено, что активность препаратов, выявленная в указанном тесте, коррелирует с иммуноадьювантной активностью и способностью изменять резистентность животных к инфекции [5].

Важно, что при мозговой травме различного генеза лейкоциты генерируют токсичные продукты окисления, способствующие совместно с провоспалительными цитокинами адгезии лейкоцитов к эндотелию сосудов и прохождению через него в паренхиму мозга, вызывая периваскулярный отек и увеличивая зону поражения на 25–45% [24, 27, 29]. Следовательно, стимуляция нейтрофильных гранулоцитов под действием препаратов некоторых фармакологических групп, например кардиотропных и нейропротективных средств, нельзя расценивать как однозначно позитивный эффект.

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 в большей степени вероятности прогнозировать последствия применения в клинике фармакологического средства.

3.5. 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 ЛС, а именно: возможное усиление аллергизации и развитие аутоиммунной патологии.

Требования к оценке аллергизирующих свойств фармакологических средств изложены в специальных методических указаниях [4].

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 бласттрансформации 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 сенсибилизирующими свойствами фармакологического средства является факт усиления ФГА-индуцированной пролиферации спленоцитов мышей после введения им препарата [6].

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 [16]. В журнале «Toxicology» [26] данный тест рекомендуется 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.

Таблица 2

Программа второго этапа оценки иммунотоксического 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-митогенами)
Резистентность мышей к экспериментальной инфекции	Заражение животных различными видами микроорганизмов	Учет выживаемости и продолжительности жизни

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 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.

4. Интерпретация результатов

Интерпретация результатов экспериментальных исследований, адекватная клиническим ситуациям, экстраполяция полученных данных на человека представляет наибольшую сложность в иммунологии, следовательно, и в рассматриваемой проблеме.

Известно, что иммунная система способна к быстрому реагированию на изменение гомеостаза и в то же время обладает значительными резервами к самовосстановлению. Существуют механизмы обратного развития иммунного ответа, направленные на восстановление структуры иммунной системы до состояния, близкого к исходному. Важную роль играет при этом прекращение вовлечения в реакцию новых клонов клеток в связи с устранением антигенного стимула. Срабатывает также ряд механизмов активной иммуносупрессии, которую обеспечивают Т-клетки и макрофаги. В данном случае роль указанных клеток состоит в генерации неспецифических супрессорных сигналов, направленных на ограничение и прекращение иммунного ответа.

Временной интервал, в течение которого восстанавливаются нарушенные функции, следует рассматривать как очень важный показатель для характеристики безопасности препарата.

В случае выявления достоверных изменений какого-либо из исследуемых параметров иммунореактивности животных окончательный прогноз о возможном иммунотоксическом действии фармакологического средства можно будет сделать только после решения вопроса о длительности сохранения выявленного нарушения иммунологической функции и способности организма животных к восстановлению.

Для этого через 7–21 день по окончании курса введения исследуемого препарата проводится тестирование состояния иммунной системы по тем параметрам, для которых были выявлены достоверные изменения. Почему последний срок 21 день? Это срок, в течение которого созревает новая популяция лимфоцитов. Если через 3 недели у животных не произошло восстановления нарушенной функции, то исследуемый препарат следует отнести к высокоиммунотоксичным соединениям, он не может быть рекомендован для КИ.

В случае, когда измененная функция восстанавливается через 7–14 дней, можно полагать, что исследуемый препарат не вызывает серьезного повреждения иммунной системы животных. В то же время имеются основания прогнозировать вероятность риска нарушений иммуногенеза при использовании данного препарата у человека, иммунная система которого, как известно, отличается более высокой чувствительностью по сравнению с животными, особенно мышами. Решение о целесообразности дополнительного иммунотоксикологического исследования конкретного фармакологического средства и рекомендация его КИ должно приниматься индивидуально в зависимости от его уникальности. Если это уникальное фармакологическое средство, не имеющее аналогов, и будет принято решение о его КИ, то необходимо предусмотреть контроль иммунного статуса на первом и втором этапе фазы КИ и методы коррекции в случае выявления иммунопатологического эффекта.

Заключение

Проводимые по обсуждаемой Программе экспериментальные исследования фармакологических средств могут помочь установить противопоказания или ограничения при применении потенциального ЛС или, напротив, выявить возможность расширения сферы его применения как иммуномодулятора. В последнем случае изучение специфической иммуномодулирующей активности фармакологических средств должно явиться предметом специальных исследований, выходящих за рамки изучения безопасности ЛП. Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздрава России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Приложение 1

Опыт работы позволяет авторам предложить следующие варианты постановки вышеуказанных методов.

Определение массы и клеточности органов иммунной системы

Мышей подвергают эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекают тимус, селезенку, лимфатические узлы и трубчатые кости. Лимфоидные органы взвешивают и с помощью стеклянного гомогенизатора готовят клеточную взвесь на среде 199 или на растворе Хенкса (рН 7,4). Полученную суспензию фильтруют через 2 слоя капрона и дважды отмывают путем центрифугирования при 200g в течение 5 мин. Средой 199 из костей вытесняют и затем гомогенизируют костный мозг. Далее подсчитывают концентрацию ЯСК в органе и в относительных значениях по отношению к массе органа.

Определение числа антителообразующих клеток (АОК)

Метод основан на образовании вокруг клеток, продуцирующих антитела с высокой гемолитической активностью (Ig M-антитела), сферической зоны лизиса после добавления антигена и комплемента. Существует значительное число модификаций метода Эрне и Нордина, поэтому исполнители могут выбрать вариант, оптимально отвечающий задаче конкретного исследования.

Мышам вводят внутрибрюшинно суспензию трижды отмытых в стерильном изотоническом растворе натрия хлорида эритроцитов барана (ЭБ) в субоптимальной дозе, равной 5×10^7 ЭБ/мышь. Рекомендуются, чтобы пути введения антигена и тестируемого препарата различались. Поэтому препарат согласно предполагаемому способу клинического использования вводят иным путем в 2 дозах по схемам, указанным выше. На 5-е сутки после иммунизации определяют число АОК в селезенке. Целесообразно также проведение реакции локального гемолиза на предмет обнаружения возможного влияния на бляшкообразование (в эксперимент добавляют 3 группы без введения ЭБ: две с введением препарата и одна — интактные животные). Наличие эффекта поликлональной активации будет свидетельствовать о риске развития аутоиммунного состояния.

Постановка реакции. Животных подвергают эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекают селезенки и готовят клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. Суспендирование проводят в растворе Хенкса (рН 7,2–7,4) в объеме 5 мл на холоде. Приготовленную суспензию фильтруют через 1 слой капрона и помещают в холодильник.

Приготовление агарозной смеси. Расплавленную в дистиллированной воде 2 % агарозу (пригодна агароза различных фирм) добавляют к равному объему нагретого до 45–48 °С двукратного (10-кратной концентрат, разведенный в 5 раз дистиллированной водой) раствора Хенкса. В приготовленную таким образом агарозу вносят суспензию ЭБ (концентрация 6–8 млрд/мл) из расчета 1,2 % ЭБ на окончательный объем агарозы. По 2,75 мл полученной смеси разливают по пробиркам, предварительно помещенным в водяную баню с температурой 46–48 °С. Далее в пробирки, содержащие агарозу с ЭБ, вносят определенное количество суспензии селезеночных клеток (как правило, 0,05–0,2 мл), желательно определить его в предварительных исследованиях. Содержимое пробирок встряхивают и выливают на чашки Петри (диаметр чашки 100 мм). Осторожным покачиванием и вращением смесь равномерно распределяют по дну чашки. После застывания агарозы чашки помещают в термостат при 37,5 °С на 1 ч. Затем на поверхность агарозы в чашках наливают по 3 мл раствора сухого комплемента морской свинки (разведение в изотоническом растворе натрия хлорида 1:5) и вновь инкубируют в термостате при 37 °С в течение 45 мин. После инкубации комплемент сливают и проводят подсчет образовавшихся бляшек (зон гемолиза). При относительно небольшом числе бляшек (примерно до 120 на чашку) их подсчитывают полностью. Если же бляшек больше, то их подсчет производят следующим образом. В листе плотной черной бумаги вырезают отверстие в форме квадрата со стороной 1 см (т.е. площадью 1 см²). Подкладывая лист с вырезанным квадратом под доньшко чашки, подсчитывают выборочно число бляшек в 10 таких квадратах в разных участках чашки с последующим перерасчетом на всю поверхность агарозы в чашке (коэффициент перерасчета для чашек диаметром

100 мм равен 6,88). Зная объем клеточной суспензии, вычисляют количество бляшек (АОК) на всю селезенку.

При статистической обработке полученных данных определяют среднюю геометрическую числа АОК и стандартную ошибку. При сравнении результатов применяют критерий t Стьюдента. Достоверными считают различия при $P < 0,05$. При постановке экспериментов необходимо использовать не менее 10 животных в группе. Итоговые результаты являются суммарными показателями, по крайней мере, 2 исследований.

Реакцию Эрне можно заменить определением на 7-е сутки после иммунизации титра антител в сыворотке крови мышей с помощью реакции гемагглютинации.

Оценка фагоцитарной активности перитонеальных макрофагов

Для фагоцитоза можно использовать различные частицы (меченые эритроциты, дрожжевые тельца, частицы латекса и др.). Здесь приводится описание фагоцитоза частиц коллоидной туши. По окончании введения мышам исследуемого препарата через 24 ч оценивают у них фагоцитарную активность перитонеальных макрофагов по интенсивности захвата ими частиц туши, введенной животным внутривентриально в виде 0,05 % суспензии в объеме 2 мл. Через 10 мин брюшную полость промывают 5 мл изотонического раствора натрия хлорида. Подрученные таким образом клетки перитонеального экссудата (КПЭ) отмывают, ресуспендируют в 1–2 мл изотонического раствора натрия хлорида, подсчитывают концентрацию ЯСК и процент фагоцитирующих клеток. Далее клетки осаждают центрифугированием, супернатант удаляют, а осадок КПЭ лизируют дистиллированной водой. Лизаты КПЭ затем помещают в плоскодонные планшеты и определяют с помощью спектрофотометра «Multiscan MCC 340» при длине волны, равной 620 нм, оптическую плотность, отражающую количество туши, поглощенной перитонеальными фагоцитами. Результаты выражают в условных единицах, отражающих оптическую плотность лизата КПЭ, соотношенную с количеством фагоцитирующих клеток.

Исследования позволяют оценить:

- концентрацию и количество ядродержащих клеток в ПЭ;
- процент и количество фагоцитирующих клеток в ПЭ;
- суммарное количество туши, поглощенной КПЭ;
- количество туши, поглощенной одним фагоцитом (фагоцитарный индекс).

Определение активности нейтрофилов в тесте хемилюминесценции

В качестве источника нейтрофилов используют гепаринизированную кровь мышей гибридов F1 (СВА´С57В1/6), выделенную путем декапитации животных. С целью выделения фракции нейтрофилов полученную кровь наслаивают на двойной градиент (гистопак 1,077 г/см³ и гистопак 1,119 г/см³, Sigma Chemical Co.) и центрифугируют в течение 30 мин при 1500 об/мин [18]. После центрифугирования лейкоциты собирают с границы раздела фаз и трижды отмывают раствором Хенкса (рН=7.4). Жизнеспособность клеток оценивают в тесте с трипановым синим. Используют только те образцы, жизнеспособность клеток в которых составляет не менее 95 %. Подсчет клеток производится в счетной камере Горяева под микроскопом Standart-20. На протяжении работы клетки сохраняют при температуре таящего льда.

Для стимуляции хемилюминесценции используется опсонизированный зимозан (рецептор-опосредованный стимулятор, Sigma Chemical Co.). Хемилюминесценцию регистрируют на хемилюминесцентном биоорбите 1251 (Швеция), при постоянном перемешивании и температуре 37 °С. Среда измерения включает: 130 мМ NaCl, 5 мМ глюкозы, 5 мМ KCl, 1,5 мМ MgSO₄, 0,5 мМ Na₂HPO₄, 0,5 мМ KH₂PO₄, 4 мМ NaHCO₃, 1 мМ CaCl₂, 0,65 мМ люминола (рН=7.4). Общий объем кюветы для измерения составляет 1 мл. В кювету прибора помещают люминольную среду и клеточную взвесь, так чтобы количество нейтрофилов было одинаковым во всех пробах (конечная концентрация нейтрофилов составляет 5×10⁵ – 8×10⁵ клеток/мл). Спонтанный уровень хемилюминесценции измеряют в течение 1 мин, затем к содержимому

кюветы добавляют 10 мкл опсонизированного мышшиной сывороткой зимозана в концентрации 10 мг/мл. После чего регистрируют уровень и кинетику хемилюминесценции в течение 20 мин. Интенсивность хемилюминесцентного ответа оценивают по максимальному значению на кинетической кривой. Среднее значение интенсивности хемилюминесценции определяют по данным не менее чем трех идентичных измерений.

Оценка влияния препаратов на гиперчувствительность замедленного типа

О состоянии клеточного иммунитета животных после введения им фармакологических препаратов можно судить по способности мышей к индукции реакции гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ) к эритроцитам барана (ЭБ) и к тринитробензолсульфоновой кислоте (ТНБС). Использование двух разных антигенов позволяет с большей вероятностью выявить стимулирующий или ингибирующий эффект препаратов, так как эти реакции различаются по своей интенсивности (очень высокая в случае ТНБС). При использовании только одного антигена предпочтение следует отдать ТНБС в силу высказанных выше причин.

По окончании курса введения препарата мышшей-самцов (СВА × С57ВL/6)F1 иммунизируют подкожно эритроцитами барана (2×10^8) в межлопаточную область или 10 мМ раствором ТНБС (0,2 мл) в основание хвоста. Вторую (разрешающую) инъекцию антигена производят на 5-е сутки в подушечку задней лапы — «исследуемая лапа» (50 мкл суспензии ЭБ, содержащей 10^8 клеток) или на 6-е сутки (50 мкл 10 мМ раствора ТНБС). В контролатеральную лапу вводят 50 мкл стерильного изотонического раствора натрия хлорида («контрольная лапа»). Результаты реакции регистрируют через 24 ч путем определения массы «исследуемой» и «контрольной» лап. Индекс реакции для каждого животного определяют по формуле:

$$I_p = \frac{M_{on} - M_k}{M_k} \times 100\%;$$

где M_{on} и M_k — масса «исследуемой» и «контрольной» лап.

При статистической обработке определяют среднюю арифметическую и стандартную ошибку показателей. Достоверность различий — по t -критерию Стьюдента.

Исследование спонтанной и индуцированной митогенами пролиферации спленоцитов

Иммуностропные, митогенные, а в ряде случаев и аллергенные свойства исследуемых препаратов можно оценить с помощью реакции бласттрансформации лимфоцитов. Использование этого подхода с применением Т- и В-клеточных митогенов позволяет также оценить преимущественное влияние фармпрепаратов на Т- или В-клеточные популяции лимфоцитов.

Постановка реакции. Животных получавших препарат и контрольных групп подвергают эвтаназии с помощью цервикальной дислокации, извлекают селезенки и готовят клеточную суспензию при помощи стеклянного гомогенизатора. Полученные спленоциты отмывают средой 199 с 5% сыворотки крупного рогатого скота и по 200 мкл клеточной взвеси (с концентрацией 2×10^6 мл) в среде RPMI-1640 (Flow, Англия), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Gibco, Англия), 10 мМ Нерес (Gibco, Англия), 2 мМ L-глутамин (Sigma, США), 10 мМ 2-меркаптоэтанол (Sigma, США), 100 мг/мл стрептомицина и 100 ед/мл пенициллина вносят в лунки 96-луночных планшетов. В часть лунок одновременно вносят митогены (ФГА, ЛПС) в предварительно оттестированных концентрациях (10–20 мкг/мл). Контрольные лунки митогена не содержат. При наличии инъекционной или растворимой формы исследуемого препарата проводят оценку их митогенных свойств, помещая в различных концентрациях в лунки, содержащие спленоциты интактных животных. Внесение же препаратов в максимальной не митогенной концентрации в культуру спленоцитов животных, получавших препарат, позволяет судить о возможности сенсбилизации организ-

ма животных к препарату в случае повышения пролиферации при повторном контакте с препаратом спленоцитов животных получавших препарат групп.

Затем селезеночные клетки инкубируют в течение 96 ч в атмосфере CO_2 при температуре 37°C и за 24 ч до окончания культивирования в лунки добавляют по 1 мкКи раствора ^3H -тимидина в объеме 10 мкл. Интенсивность включения ^3H -тимидина (число импульсов/мин) определяют в клетках, собранных с помощью Cell Harvester (Flow), на сцинтилляционном счетчике (Marck-III).

Уровень РБТЛ спленоцитов под влиянием митогенов или вносимых в среду культивирования препаратов оценивали по отношению к интенсивности РБТЛ спленоцитов в среде, не содержащей митогены или используемые препараты. Для оценки влияния препаратов на РБТЛ сравнивали величину включения ^3H -тимидина клетками селезенки мышей, получивших препараты, с таковой спленоцитов мышей, получивших изотонический раствор натрия хлорида. Результаты выражают в значениях импульсов в минуту.

Патоморфологические исследования

1. Иммунокомпетентные органы — тимус, селезенку, лимфатические узлы различной локализации, фрагменты тонкого кишечника, включающие групповые лимфатические фолликулы (пейеровы бляшки) — рекомендуется фиксировать в жидкости Буэна в течение 24 ч [9].

Обезвоживание и проводку образцов, заливку в парафин с воском проводят по общепринятой в гистологии технике.

2. После депарафинирования срезы (толщиной 3–5 мкм) окрашивают азуром и эозином по Нохт–Максимову [9].

Результат окраски: цитоплазма клеток, в которых идет активный синтез РНК, имеет различные оттенки синего цвета, отчетливо дифференцируются все клетки, входящие в структуру изучаемого органа на момент эвтанази.

Для более объективной оценки влияния испытуемого препарата на структуру органов иммунной системы можно применить простой в исполнении полуколичественный метод рангов, предложенный экспертами ВОЗ для патоморфологических исследований в прозектурах [14].

Минимальное количество рангов от 0 до +++, где 0 обозначает отсутствие изменений, + — слабые изменения изучаемого признака (например, количество иммунобластов в коре тимуса или в паракортикальной зоне лимфатического узла), ++ — умеренные изменения и +++ — сильные изменения. Можно увеличить количество рангов от 0 до ++++++, где + и ++ обозначают минимальные изменения и т. п. Каждый ранг можно представить цифрой (например, + = 1, +++ = 3 и т. п.) и полученные результаты обрабатывать статистически с помощью непараметрического критерия U Вилкоксона–Манна–Уитни [1].

Приложение 2

Название учреждения-исполнителя _____
Подразделение _____
Адрес _____
Телефон _____
Факс _____
Ответственный исполнитель _____

Протокол №

Оценка влияния препарата на гуморальный иммунный ответ

Цель исследования _____
Исследуемый препарат _____ Серия _____ Дата выпуска _____
Схема введения _____

Начало введения _____ Окончание введения _____
 Доза _____ мг/кг; _____ Способ введения _____
 Концентрация _____ Объем введения _____ Время введения _____
 Препарат сравнения _____ доза _____ мг/кг _____ на мышь

Используемые животные:

Мыши: линия _____ гибриды _____ пол _____ масса ($M \pm m$) _____

Получены из питомника _____

Дата получения _____

Дата выхода из карантина _____

Количество животных в группе _____

Метод оценки. Локальный гемолиз в геле агарозы _____

Оцениваемый параметр – количество антителообразующих клеток (АОК) в селезенках мышей при иммунизации их эритроцитами барана _____

Дата иммунизации _____

Антиген-эритроциты барана:

Источник получения _____ Дата получения _____

Способ введения _____ Концентрация _____

Объем введения _____ Доза _____ Время введения _____

Постановка реакции:

Дата _____

Источник антителообразующих клеток (АОК)

Селезенка: Объем суспензии _____ Концентрация _____

Объем суспензии для внесения в смесь агарозы с ЭБ _____

Комплемент источник _____ разведение _____ объем внесения _____

Результаты анализа. Индекс стимуляции АОК на селезенку

№	Группы	Дозы	АОК/сел ($M \pm m$)	Индекс модуляции ($M \pm m$)	<i>p</i>	АОК/млн ЯСК ($M \pm m$)	Индекс модуляции ($M \pm m$)	<i>p</i>
1	Положит. контроль	–						
2	Отрицат. контроль	–						
3	Препарат	1 доза						
4	–«–	–«–						
5	–«–	–«–						
6	–«–	–«–						
7	–«–	–«–						
8	–«–	–«–						
9	–«–	–«–						
10	Препарат сравнения	–«–						

Заключение

Ответственный исполнитель _____

Должность _____

Дата _____ Подпись _____

Название учреждения-исполнителя _____

Подразделение _____

Адрес _____

Телефон _____

Факс _____

Протокол № _____

Оценка влияния препарата на клеточный иммунный ответ

Цель исследования _____
 Исследуемый препарат _____ Серия _____ Дата выпуска _____
 Схема введения _____
 Начало введения _____ Окончание введения _____
 Доза _____ мг/кг _____ Способ введения _____
 Концентрация _____ Объем введения _____ Время введения _____
 Препарат сравнения _____ доза _____ мг/кг _____ на мышь

Используемые животные:

Мыши: линия _____ гибриды _____ пол _____ масса ($M \pm m$) _____
 Получены из питомника _____
 Дата получения _____
 Дата выхода из карантина _____
 Количество животных в группе _____

Метод оценки – реакция гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ). Оцениваемый параметр – величина воспалительной реакции у иммунизированных мышей при повторном введении антигена/эритроциты барана (ЭБ) или тринитробензосульфоновая кислота (ТНБС)

Иммунизация

Дата _____ Антиген ЭБ ТНБС _____
 Источник получения _____
 Концентрация _____
 Объем введения _____
 Доза _____
 Способ введения _____
 Время введения _____

Разрешающая инъекция

Дата _____
 Антиген ЭБ ТНБС _____
 Источник получения _____
 Концентрация _____
 Объем введения _____
 Доза _____
 Способ введения _____
 Время введения _____

Оценка реакции

Дата _____
 Оцениваемый параметр – процент прироста массы исследуемой лапки по отношению к контрольной (индекс реакции)

Результаты анализа

№	Группы	Доза	Масса контрольной лапки (мг) ($M \pm m$)	Масса исследуемой лапки (мг) ($M \pm m$)	Индекс реакции % ($M \pm m$) ответ	<i>p</i>
1	Положит. контроль					
2	Отрицат. контроль					
3	Препарат	1 доза				

4	-«-	-«-			
5	-«-	-«-			
6	-«-	-«-			
7	-«-	-«-			
8	-«-	-«-			
9	-«-	-«-			
10	Препарат сравнения	-«-			

Заключение:

Ответственный исполнитель _____
 Должность _____
 Дата _____ Подпись _____
 Название учреждения-исполнителя _____
 Подразделение _____
 Адрес _____
 Телефон _____
 Факс _____

Литература

1. Гублер Е.В., Генкин А.А. Применение непараметрических критериев статистики в медико-биологических исследованиях. — Л., 1973.
2. Кудрина Г.П., Шашкина Л.Ф., Иванова В.М. и др. Методические рекомендации по оценке аллергенных свойств фармакологических средств. — М., 1988.
3. Кудрина Г.П., Буров Ю.В., Алтынбаева Р.Д. и др. Методические рекомендации по оценке иммунотоксических свойств фармакологических средств. — М., 1991.
4. Любимов Б.И., Коваленко Л.П., Федосеева В.Н. и др. Методические указания по оценке алергизирующих свойств фармакологических веществ. — М., 2000.
5. Мастернак Т.Б., Малкина Е.Ю., Ларин А.С. и др. Протективное действие ряда иммуномодуляторов и их влияние на активность макрофагов // Иммунология. — 1998. — № 1. — С. 33–56.
6. Мастернак Т.Б., Чижевская М.А., Иванова А.С., Манько В.М. Влияние иммуномодулирующих препаратов на индуцированную ФГА пролиферацию спленоцитов // Иммунология. — 1997. — № 4. — С. 27–31.
7. Медунин Н.В., Буковский С.Н., Григорьева Л.В. и др. Порядок и методы контроля иммунологической безопасности вакцин. Общие методические принципы. — М., 1989.
8. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Манько В.М. и др. Методические материалы по экспериментальному (фармакологическому) и клиническому испытанию иммуномодулирующего действия фармакологических средств. — М., 1984.
9. Ромейс Б. Микроскопическая техника. — М., 1954. — С. 1396–1399.
10. Туманян М.А., Кирилличева Г.Б. // Открытия. — 1986. — № 6. — С. 24.
11. Федосеева В.П., Шарецкий А.Н., Аристовская Л.В. Методические рекомендации по экспериментальному изучению иммунотоксических свойств химических факторов окружающей среды. — М., 1989.
12. Хаитов Р.М. Физиология иммунной системы. — М., 2001.
13. Хаитов Р.М., Атауллаханов Р.И., Иванова А.С. и др. Методические указания по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ. — М., 2000.
14. Cottier A., Turk J., Sobin L. A proposal for a standardized system of reporting human lymph node morphology in relation to immunological function // J. Clin. Patol. — 1973. — Vol. 26. — P. 317–331.
15. Dean J.H., Padarathsingh M.L., Jerrells T.R. Assessment of immunobiological effects induced by chemicals, drugs or food additives. I. Tier testing and screening approach. Drug Chem Toxicol. — 1979. — Vol. 2. — P. 5–17.
16. Descotes J., Verdier F. Popliteal Lymph Node Assay. — In Methods in Immunotoxicology, Vol. 1 G.R. Burleson, J.H. Dean, and A.E. Munson, Eds., Wiley-Liss, Inc., 1995 — P. 189–196.
17. Davies G.E. Immunotoxicity: Undesirable effect of inappropriate responses // Immunology Today. — 1983. — Vol. 4. — № 1. — P. 1–2.
18. Dietert R. R., Golemboski K. A. Immunotoxicological mechanisms. — in: Encyclopedia of Molecular Biology and Molecular Medicine, Vol. 3/Ed. Meyers R. A — VCH, 1996. — P. 295–302.

19. English D., Andersen B.R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque // *J. Immunol Methods*. — 1974. — Vol.5. — № 3. — P. 249–252.
20. European Commission (1994) Risk Assessment of Existing Substances Technical Guidance Document X1/9I/S494-CN. Chapter 7. European Communities, Luxembourg.
21. Hinton D. M. Testing guidelines for evaluation of the immunotoxic potential of direct food: additives. — *Crit Rev. Fd. Sci. Nutr.* — 1992. — Vol. 32. — № 1. — P. 173–190.
22. Luster M.I., Munson A.E., Thomas P.T., et al. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity: National Toxicology Program's guidelines for immunotoxicity evaluation in mice // *Fundam Appl Toxicol.* — 1988. — Vol.10. — P. 2–19.
23. Luster M.I., Portier C., Pait D. G. et al. // *Immunotoxicology and risk assessment*. — in *Methods in Immunotoxicology*. — New York et al.: Wiley-Liss, Inc., 1995. — Vol.1. — P. 51–58.
24. Maloney C.G., Kutchera W.A., Albertine K.H., et al. Inflammatory agonist induce cyclooxygenase type 2 expression by human neutrophils // *J.Immunol.* — 1998. — Vol.160. — № 3. — P. 1402–1410.
25. Neuman D.A. Immunotoxicity testing and risk assessment: Summary of 1994 Workshop Immunotoxicology Technical Committee // *Fd. Chem. Toxic.* 1995. — Vol. 33. — № 10. — P. 887–894.
26. Pieters R. The popliteal lymph node assay: a tool for predicting drug allergy // *Toxicology*. — 2001. — Vol. 158. — № 1-2. — P. 65–69.
27. Sheng H., Batinic-Haberle I., Warner D.S. Catalitic antioxidants as novel pharmacologic approaches to treatment of ischemic brain injury // *Drug News Perspect.* 2002. — Vol. 15. — № 10. — P. 654–665.
28. Stanworth D.R. Current concepts in hypersensitivity. — In: *Immunotoxicology and Immunopharmacology* / Eds Dean J. H. et al — New York: Raven Press. 1985. — P. 91–99.
29. Wang X., Feurstein G.Z. Role of Immune and Inflammatory Mediators in CNS Injury // *Drug News Perspect.* 2000. Vol. 13. — № 3. — P. 133–140.

ГЛАВА 4

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ РЕПРОДУКТИВНОЙ ТОКСИЧНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев; к. м. н. Н.М. Смольникова; к. м. н. А.М. Скосырева; к. б. н. Е.П. Немова; к. б. н. А.С. Соломина; к. б. н. О.В. Шреде; член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова; д. м. н. О.Л. Верстакова; к. м. н. Р.Д. Сюбаев

Введение

Изучение репродуктивной токсичности фармакологических веществ является частью доклинических токсикологических исследований.

Исследования по выявлению репродуктивной токсичности включают:

- а) изучение влияния на репродуктивную (генеративную) функцию;
- б) изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в антенатальном периоде развития;
- в) изучение эмбрио- и фетотоксического действия, регистрируемого в постнатальном периоде развития.

1. Общие положения

1.1. Тестирование на репродуктивную токсичность

Тестированию на репродуктивную токсичность подвергаются 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 для применения по жизненным показаниям.

1.2. Изучение субстанции фармакологического вещества и/или лекарственной формы

Изучению подлежит субстанция фармакологического вещества и/или лекарственная форма. 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.

1.3. Характеристика фармакологического вещества

К моменту начала тестирования необходимо располагать сведениями о физико-химических свойствах вещества, дозах (летальная, эффективная, рекомендуемая для КИ), признаках интоксикации, специфических для данного вещества, предполагаемых способах введения, профиле фармакологического действия, показаниях и схемах применения препарата в клинике. Желательно иметь данные по фармакокинетике фармакологического вещества.

1.4. Способ введения

Фармакологическое вещество вводят тем способом, который рекомендован при клиническом применении. Изучаемое вещество, предназначенное для применения внутрь, вводят лабораторным животным через зонд в желудок. По возможности следует избегать внутрибрюшинного введения.

1.5. Лабораторные животные

Исследование можно проводить как на нелинейных, так и на линейных животных. В последнем случае следует указать линию животных. Исследования проводят на здоровых и половозрелых животных. Животные должны пройти карантин не менее 10–14 дней. Разброс по исходной массе в исследуемых группах не должен превышать $\pm 10\%$. Число животных в каждой группе должно быть достаточным (не менее 10), чтобы провести статистическую обработку экспериментальных данных.

1.6. Выбор доз

При выборе доз руководствуются результатами, полученными в исследованиях по изучению острой токсичности. Наиболее целесообразно, с точки зрения последующей интерпретации результатов, проводить тестирование вещества, используя не менее 2 доз. Минимальная доза соответствует терапевтической дозе, рекомендованной для КИ, максимальная — на порядок выше рекомендованной для КИ, при которой не отмечается выраженного токсического действия на животных. В большинстве случаев в качестве максимальной дозы можно использовать высшую дозу, принятую в исследованиях по изучению хронической токсичности. Исключения составляют вещества, изменяющие характер действия при беременности. Дозы тестируемого вещества рассчитывают на единицу массы тела животного в пересчете на действующее вещество.

1.7. Контроли

При постановке эксперимента обязательно должна быть контрольная группа животных, которые содержатся в таких же условиях, как и получающие исследуемое ЛС, и получают те же вспомогательные ингредиенты, которые дополнительно используются в ходе введения.

1.8. Статистическая обработка данных

При статистической обработке данных за единицу наблюдения принимают помет, то есть результаты, полученные при исследовании одной самки. Сведения о методах статистического анализа, использованных при обработке результатов, должны быть указаны в отчете.

2. Изучение репродуктивной (генеративной) функции животных

2.1. Задачи исследований

Задачей этого этапа исследований является выявление возможного отрицательно-го действия фармакологического вещества на репродуктивную функцию. Токсическое действие фармакологических веществ может реализовываться на различных этапах репродукции: на стадии гаметогенеза (формирование мужских и женских гамет); полового поведения; созревания и качества половых клеток, их транспорта; способности к зачатию и оплодотворению и др.

2.2. Общие требования к проведению исследований

Требования к проведению исследований изложены в п.п. 1.1.–1.8. Влияние на генеративную функцию изучают в исследованиях на самках и самцах крыс.

В исследованиях на самках фармакологическое вещество вводят в течение 15 дней (3 эстральных цикла). Наиболее целесообразно проводить тестирование вещества, используя не менее 2 доз. В каждой группе должно быть не менее 20 крыс. По окончании введения препарата самок подсаживают к интактным самцам в соотношении 2:1 на 10 дней (2 эстральных цикла). Во время исследования следят за общим физическим состоянием и поведением животных. Крыс взвешивают до начала исследования, по окончании введения фармакологического вещества и перед эвтаназией на 20-й день беременности. Первым возможным днем беременности считают день подсадки самок к самцам.

Исследуют состояние репродуктивных органов самок — в яичниках подсчитывают число желтых тел, в матке — мест имплантаций, живых и мертвых плодов. На основании полученных данных определяют показатели пред- и постимплантационной гибели. Кроме того, вычисляют индекс фертильности — отношение числа беременных самок к числу подсаженных. Из каждой группы получающих ЛС самок оставляют до родов часть беременных крыс и в течение одного месяца наблюдают за развитием потомства, регистрируют общее физическое состояние и поведение, динамику массы и гибель крысят.

В исследованиях на самцах фармакологическое вещество вводят 48 дней (период сперматогенеза). Наиболее целесообразно проводить тестирование вещества, используя не менее 2 доз. В каждой группе должно быть не менее 10 крыс. По окончании введения к самцам подсаживают интактных самок в соотношении 1:2 на 10 дней (2 эстральных цикла). О состоянии репродуктивной функции самцов судят по результатам исследования репродуктивных органов самок, спаренных с самцами, получавшими препарат. Желательно предусмотреть дополнительную группу животных для выяснения возможности обратимости эффекта в случае его обнаружения.

2.3. Выбор конкретных методов исследования

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, в том числе изменениями эндокринной функции половых желез, гипофиза, гипоталамуса и др., принимающих участие в регуляции гормонального полового гомеостаза. Поэтому, если под влиянием тестируемого вещества возникают нарушения репродуктивной функции животных, необходимо выяснить, связано это с прямым воздействием на спермато- или оогенез либо имеет опосредованный характер. Выбор конкретных методов исследования проводится экспериментатором. Ряд рекомендуемых методов приведен в приложении.

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

3.1. Эмбриотоксичность

Под эмбриотоксическими свойствами понимают способность вещества оказывать токсическое действие на развивающиеся эмбрионы/плоды. Эмбриотоксичность может проявляться как в повышении уровня эмбриональной смертности (эмбриолетальное действие), изменении массы тела, кранио-каудальных размеров плодов, задержке оссификации скелета (общая задержка развития), так и в виде анатомических, гистологических, цитологических, биохимических, нейрофизиологических и иных отклонений от нормы, проявляющихся до или после рождения (тератогенное действие), увеличении перинатальной смертности.

3.2. Объект исследования

Исследованию на наличие эмбриотоксических свойств должны подвергаться все новые фармакологические вещества, которые могут быть назначены женщинам репродуктивного возраста, а также не исследованные ранее компоненты, которые в качестве вспомогательных веществ включены в лекарственную форму новых или уже применяемых лекарств. Для лекарственных веществ, планируемых для клинического применения у больных с отсутствующим репродуктивным потенциалом, изучение эмбриотоксичности не является обязательным. При изучении эмбриотоксического действия должны соблюдаться положения, изложенные в пунктах 1.1–1.8.

3.3. Экспериментальные исследования

Они должны включать изучение состояния плодов к концу антенатального периода развития.

3.4. Сроки введения фармакологического вещества

Сроки должны охватывать весь период беременности, поскольку чувствительность эмбриона к токсическому действию фармакологических веществ зависит от стадии развития и при этом эмбрионы, находящиеся на одной стадии развития, могут различаться в чувствительности к действию различных по структуре веществ.

3.5. Расчет доз

С точки зрения адекватности последующей интерпретации результатов, целесообразно проводить тестирование вещества, используя не менее 2 доз. Дозы тестируемого вещества рассчитывают на единицу массы тела самки (п. 1.6).

3.6. Контроли

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

3.7. Выбор вида животного

При выборе вида животного необходимо учитывать фармакокинетические параметры и видовую чувствительность изучаемого лекарственного вещества. В большинстве случаев исследования проводят на крысах. В случае необходимости получения дополнительной информации используют животных другого вида — кроликов, хомяков, мини-свиней и др.

3.8. Тестирование на крысах

3.8.1. Количественный состав групп

Каждая группа крыс в группе получающих ЛС и в контрольной должна состоять не менее чем из 10 беременных животных. Первым днем беременности считают день обнаружения сперматозоидов в вагинальном мазке. В исследованиях используют виргинных самок линейных, гибридных или рандомбредных животных.

3.8.2. Тестируемое вещество

Его вводят самкам один раз в день, в одно и то же время суток. При отсутствии сведений о выраженной индукции или ингибировании ферментов возможно введение лекарственных веществ с 1-го по 19-й день беременности в 2 дозах (п. 1.6.). Также возможна 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 трех параллельных экспериментальных группах. Крысам контрольной группы в эти же сроки следует вводить растворители, используемые при приготовлении раствора или суспензии тестируемого вещества. Кроме того, в эксперимент может быть введена группа интактных беременных самок.

При необходимости валидации эксперимента в качестве позитивного контроля целесообразно использовать заведомый тератоген (салициловокислый натрий, циклофосамид и др.) в дозе, оказывающей эффект примерно на 50% эмбрионов.

3.8.3. Выявление возможного токсического действия изучаемого вещества

Во время эксперимента следует наблюдать за состоянием и поведением беременных самок, регулярно, не реже одного раза в неделю, взвешивать животных для выявления возможного токсического действия изучаемого вещества.

3.8.4. Оценка эффектов

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

3.8.5. Показатели эмбриотоксичности

Показателями эмбриотоксичности служат: пред- и постимплантационная эмбриональная гибель и аномалии развития. Предимплантационную гибель (%) определяют по разности между количеством желтых тел в яичниках и количеством мест имплантации в матке; постимплантационную гибель (%) — по разности между количеством мест имплантаций и количеством живых плодов. При оценке тератогенного действия рекомендуется сначала подсчитать количество плодов с аномалиями, регистрируемыми при внешнем осмотре, а затем разделить плоды на 2 группы и у одной части плодов исследовать состояние внутренних органов, у другой — состояние скелета. Кроме того, плоды взвешивают и определяют их краниокаудальный размер.

3.9. Тестирование на кроликах

Исследования проводят на виргинных самках. Каждая группа (в группах получающих ЛС и контроле) должна состоять не менее чем из 10 беременных крольчих.

3.9.1. Введение изучаемых веществ

Изучаемое вещество рекомендуется вводить с 6-го по 18-й дни беременности (период органогенеза), один раз в сутки, в высшей дозе (п. 2.6). Группы контрольных животных должны быть такими же, как указано в п. 4.8.2. Вопрос о том, использовать субстанцию или лекарственную форму, решается так, как указано в п. 2.2. 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.

3.9.2. Показатели эмбриотоксичности

Используются те же показатели эмбриотоксичности, что и в исследованиях на крысах (п. 3.8.5).

Примерная форма представления данных по изучению эмбриотоксического действия представлена в таблице 1.

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

Показатели	Единица измерения
Количество беременных самок	
Количество желтых тел	О/О (в числителе — общее количество, в знаменателе — на одну самку)
Количество мест имплантации	О/О
Количество живых плодов	О/О
Количество резорбций	О/О
Количество мертвых плодов	О/О
Предимплантационная гибель	(%)
Постимплантационная гибель	(%)
Масса плодов	(г)
Краниокаудальный размер	(см)

Показатели	Единица измерения
Внешний осмотр плодов:	
количество обследованных плодов	абс.
из них с аномалиями развития:	абс., %
Состояние костной системы: количество обследованных плодов из них с аномалиями развития:	абс. абс., %
Состояние внутренних органов: количество обследованных плодов из них с аномалиями развития:	абс. абс., %

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

Группа животных (экспозиция, доза препарата)		
Вид нарушения	Количество плодов, имевших данное нарушение	
	абс.	% к общему количеству обследованных по этой методике

4. Изучение антинатального действия фармакологических веществ, регистрируемого в постнатальном периоде развития

4.1. Цель исследований

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

4.2. Животные

Исследование проводят на виргинных самках крыс. В получающих ЛС 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 общее физическое 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 и самцов). На 30-й день после рождения крысят отсаживают от матерей.

Исследования следует начинать не раньше чем через 24 ч и продолжать до 2-месячного возраста.

4.3. Типы исследований

Оценка включает следующие типы исследований: общие наблюдения за физическим развитием потомства; изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания самкой; изучение двигательной активности и эмоциональной реакции, способности к координации движений у потомства после окончания вскармливания; изучение обучаемости и памяти при выработке условных рефлексов с положительным и отрицательным подкреплением и сохранение полученных навыков.

Программа изучения постнатального развития определяется экспериментатором с учетом фармакологических и токсикологических свойств изучаемого лекарственного

вещества. Примерный перечень тестов указан в приложении. В некоторых случаях он может быть расширен для получения дополнительной информации (изучение влияния на морфологический состав крови, проведение биохимических, патоморфологических исследований, спаривание с последующим изучением потомства F1, F2 генераций 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.

4.4. Вещества, применяемые во время грудного вскармливания

Для некоторых фармакологических веществ, применяемых во время грудного вскармливания, желательно изучение их влияния на развитие потомства. Исследования проводят при введении вещества самкам с 1-го дня после родов до окончания вскармливания (25–30-й день). Состояние потомства оценивают с использованием тех же показателей, что и при изучении постнатального развития (п. 4.3).

4.5. Статистическая обработка полученных результатов

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 исследований желательно, 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 использованных методиках статистического анализа.

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

5.1. Отчет

Представляемый 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.

5.2. Описание аномалий развития

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

5.3. Заключительная часть отчета

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

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

5.4. Общее заключение

Указывают сведения о наличии или отсутствии повреждающего действия ЛС на репродуктивную функцию и внутриутробное развитие.

6. Приложение

6.1. Стандартные операционные процедуры, используемые в экспериментах по изучению репродуктивной токсичности фармакологических средств

6.1.1. Эвтаназия получавших ЛС и контрольных животных и получение эмбрионального материала

Эвтаназию самок осуществляют дислокацией шейных позвонков или декапитацией. Вскрывают брюшную полость, вырезают матку, переносят в чашку Петри с изотоническим раствором натрия хлорида. Вскрывают рога матки, подсчитывают количество живых, мертвых, резорбированных плодов, обследуют слизистую оболочку матки, отмечая места имплантации. Отделяют плоды, освобождают их из оболочек. В яйчниках подсчитывают количество желтых тел, в матке — число мест имплантаций и плодов.

6.1.2. Наружный осмотр, взвешивание плодов

Все живые плоды каждого помета обследуют под бинокулярным микроскопом типа МБС для обнаружения видимых аномалий развития. После этого плоды взвешивают, отмечают состояние каждого плода, описывают аномалии, указывают массу каждого плода и суммарную массу плодов помета.

После наружного осмотра плодов, регистрации всех аномалий и взвешивания плоды каждого помета делят на две группы. Одну группу плодов (около половины) фиксируют в жидкости Буэна и используют для изучения внутренних органов. Остальные плоды фиксируют в 96° этаноле и используют для изучения состояния скелета.

6.1.3. Исследование внутренних органов плодов по методике Вильсона в модификации отдела эмбриологии НИИЭМ АМН СССР

Исследования проводят на плодах, которые фиксировали в жидкости Буэна не менее 1 недели. Плод укрепляют на пробковом столике и при помощи безопасной бритвы разрезом параллельно нижней челюсти отделяют голову от туловища. Первый разрез головы проводят перпендикулярно нижней челюсти непосредственно за вибриссами. На этом срезе видно состояние нижней челюсти, переднего отдела твердого неба и носовой полости. Второй разрез проводится через середину глазных яблок и охватывает обонятельные луковицы. На третьем разрезе изучают состояние головного мозга: коры больших полушарий, боковых, III и IV желудочков. Срез проводят через большой поперечный диаметр черепа. Четвертый разрез проходит параллельно третьему. Исследуют мозжечок и продолговатый мозг. Пятый разрез идет через гортань, пищевод, спинной мозг, сосуды и слюнные железы. Шестым разрезом отсекается шея от туловища. Разрез проводят перед передними лапами. Видны пищевод, трахея, спинной мозг, крупные сосуды. Седьмой разрез проходит через органы грудной клетки непосредственно за передними конечностями. На разрезе видны: сердце, легкие, бронхи, пищевод, спинной мозг. Восьмой разрез проводят по середине между седьмым разрезом и пупочным кольцом. Осматривают печень, а затем осторожно удаляют ее пинцетом и исследуют состояние диафрагмы. Девятый разрез проходит ниже пупочного кольца. Видны кишечник, поджелудочная железа. Осторожно удалив петли кишечника и печень, можно наблюдать органы таза: почки, мочеточники, мочевой пузырь, прямую кишку, внутренние половые органы. Необходимо обратить внимание на почки (возможность гидронефроза), матку с придатками и тестикулы.

6.1.4. Метод висцерального исследования органов плодов по Стейплсу

После внешнего осмотра живых плодов на наличие аномалий развития, определения массы и краниокаудального размера производят декапитацию. Декапитированный плод

фиксируют, глазными ножницами разрезают переднюю брюшную стенку и грудь вдоль левого края грудины. Пинцетом удаляют вилочковую железу и исследуют топографию и состояние крупных сосудов, отходящих от сердца (правая и левая подключичные артерии, общая сонная артерия, нисходящая аорта и легочная артерия). Обращают внимание на их форму и размеры. Пинцетом фиксируют сердце за ушко правого предсердия, рассекают сердце ножницами двумя разрезами от верхушки к основанию (1 — правее, 2 — левее межжелудочковой перегородки) и исследуют состояние межжелудочковой перегородки и клапанов. Затем исследуют состояние легких (количество долей) и органов брюшной полости. После извлечения печени определяют состояние диафрагмы, а удалив петли кишечника, осматривают надпочечники, почки, мочеточники и мочевой пузырь. Почки разрезают на уровне почечных лоханок и исследуют их. Определяют абсолютную и относительную массу вилочковой железы, сердца, почек. Устанавливают пол плода и изучают топографию половых органов.

6.1.5. Окрашивание скелета ализарином (методика Доусона, модифицированная в отделе эмбриологии НИИЭМ АМН СССР)

Плоды фиксируют в 96° этаноле не менее 7 дней. Объем спирта должен превышать объем фиксируемых плодов в 10 раз. После фиксации у плодов удаляют внутренние органы и погружают в 1 % раствор КОН для просветления мягких тканей. Время пребывания плодов в этом растворе определяют эмпирически (примерно 1–2 сут). Когда становятся видны закладки костей, плоды вынимают, промывают водопроводной водой и переносят их в раствор А (150 мл глицерина, 800 мл дистиллированной воды и 10 г КОН), к которому добавляют несколько капель раствора Б (1 % раствор ализарина красного) до появления светло-фиолетового окрашивания. Через 3–5 сут окостеневшие участки скелета окрашиваются в красно-фиолетовый цвет. Для обесцвечивания мягких тканей плоды переносят в раствор А на 7–14 дней, затем их проводят через смеси глицерина, спирта и воды с целью обезвоживания (1:2:7, 2:2:6, 4:4:2, равные части спирта и глицерина, чистый глицерин с добавлением 1–2 капель формалина). В чистом глицерине плоды могут храниться. Плоды изучают под микроскопом МБС, учитывают аномалии скелета, количество точек окостенения в различных костных образованиях.

6.1.6. Методы изучения развития потомства в постнатальном периоде жизни

Общие наблюдения за физическим развитием потомства

Дни наблюдений	Регистрируемые параметры
1–2-й	Размер помета, число живых и мертвых новорожденных, число особей разного пола. Вычисляется размер помета и индекс гибели
4, 7, 14, 21-й 21-й	Гибель новорожденных, масса тела
Со 2-го	Отлипание ушной раковины (в среднем — 2-й день)
С 4-го	Появление первичного волосяного покрова (в среднем — 5-й день)
С 6-го	Прорезывание резцов (в среднем — 8-й день)
С 12-го	Открытие глаз (в среднем — 16-й день)
С 25-го	Опускание семенников (в среднем — 28-й день)
С 30-го	Открытие влагалища (в среднем — 37-й день)

*Изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов
в период вскармливания*

Дни наблюдений	Показатели	Способ проведения исследования и регистрируемые параметры
Со 2-го	Переворачивание на плоскости*	Крысят кладут на спину на плоской поверхности, быстро отпускают и измеряют время, необходимое для возвращения в нормальное положение. Формирование рефлекса считается завершенным (в среднем — на 8-й день), если крысята возвращаются на все 4 лапы. Исследования проводят не более чем по 30 с с каждым животным до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах
С 5-го	Отрицательный геотаксис*	Исследования проводят 1 раз в день, по 1 мин. Крысят помещают на наклонную плоскость (25°) головой вниз. Рефлекс считается сформированным, если крысята поворачиваются на 180° (в среднем — 7-й день). Можно измерять время удержания на наклонной плоскости. Исследования проводят до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах
С 5-го	Удержание на «горизонтальной веревочке»	Изучают становление двигательной активности при помощи установки «Горизонтальная веревочка». Крысят помещают передними лапами на канат толщиной 2 мм. Регистрируют число крысят, удерживающихся передними лапами на канате и время удерживания (с).
С 6-го	Избегание обрыва*	Крысят кладут на стол или возвышающуюся над клеткой платформу таким образом, что передние лапы касаются края стола. Формирование рефлекса завершено (в среднем — 9-й день), если в течение 10 с крысята отползают от края площадки. Исследования проводят до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах
6-8-й	Маятниковый рефлекс	Определяется как изменение направления головы и туловища в горизонтальной плоскости приблизительно на 90° за счет перемещения передних лап, когда задние конечности поджаты и неподвижны. Измеряется количество поворотов за 1 мин и количество изменений направления на обратное (реверсия)
С 6-го	Открытое поле-1	Крысят помещают на площадку размерами 30 × 30 см, на которой проведены линии, образующие 36 квадратов. Регистрируют:
8-9-й		поднимание головы и передних лап
9-11-й		ползание
13-15-й		опору на задние конечности, подъем всего тела
17-20-й		двигательную активность (число пересеченных квадратов), умывания различного рода, обнюхивания, стойки, карабканье на стенки, прыжки, время отсутствия активности, возможные аномалии походки

Дни наблюдений	Показатели	Способ проведения исследования и регистрируемые параметры
С 8-го	Реакция на акустический стимул*	Крысят помещают на небольшую площадку в звукоизолированной клетке. Поворот площадки или движение животного можно регистрировать автоматически или визуально. Рефлекс считают сформированным, если животное реагирует на акустический стимул длительностью 0,3–0,5 с (в среднем формируется на 13-й день). Исследования проводят до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах
С 14-го	Зрачковый рефлекс*	Регистрируют сокращение зрачка или поворот головы. Исследования проводят в затемненном помещении с точечным источником света до полного формирования рефлекса во всех контрольных пометах (в среднем – 14–15-й день)
14–15-й	Избегание обрыва (вызванное визуальным стимулом)	Животное помещают на площадку, поднятую на высоту 45 см над поверхностью. Избегание падения принимается за положительное решение. Исследования проводят однократно, после открытия глаз
10-11-й	Обонятельная реакция	Животное помещают посередине рейки шириной 6 см с делениями, которую кладут на клетки. Расстояние между клетками можно менять. Определяют расстояние, на котором животное правильно выбирает направление на клетку с сибсами и матерью, в которой оно содержалось перед исследованием. Средний возраст формирования рефлекса – 10–11-й день). Можно учитывать число падений, соскальзываний, совмещая этот тест с тестом хождения по полоске
С 15-го	Мышечная сила*	Животное помещают на густую проволочную сетку, которую медленно поворачивают на 180°. Измеряют время нахождения животного под сеткой, которое должно быть не менее 15 с. Исследования проводят до достижения критерия всеми контрольными пометами

*Исследование эмоционально-двигательного поведения
и способности к координации движений*

117–20-й	Переворачивание в свободном падении	Крысят держат спиной вниз на высоте 60 см над мягкой поверхностью и быстро отпускают. Визуально регистрируют, переворачиваются ли крысята в воздухе, чтобы упасть на все 4 лапы
114–25-й	Удержание на вращающемся цилиндре*	Изучают время удержания на вращающемся цилиндре (при скорости 30 об/мин). Исследования проводят до достижения критерия – удержания в течение 3 мин на цилиндре с резиновой поверхностью и диаметром приблизительно 12 см. Сложность задачи можно варьировать, уменьшая диаметр цилиндра и его текстуру, а также скорость вращения. Исследования проводят до достижения критерия всеми контрольными животными

440-45-й	Открытое поле-2	Исследования проводят в 3-минутных тестах на протяжении 3–4 дней, либо, при большом количестве животных (более 60), один день при длительности теста не менее 3 мин. Крыс помещают в центр ярко освещенной площадки, разбитой на квадраты. Регистрируют время выхода из центра (латентный период), число посещаемых квадратов (двигательная активность), число стоек (реакция оглядывания), число обследованных отверстий (исследовательская активность), число умываний различного типа (груминг), число актов дефекации и мочеиспускания (эмоциональность)
330-45-й	Спонтантная двигательная активность	Измерение двигательной активности может быть проведено одним из альтернативных методов анализа: «белчье колесо», системы с фотоэлектрической и магнитной регистрацией и т.п.

Примечание *) — эти показатели можно изучать не в динамике, а однократно, в предполагаемый день созревания у контрольных животных.

Изучение обучаемости и памяти

Способ проведения эксперимента	Регистрируемые параметры
<i>Пассивное избегание с отрицательным (болевым) подкреплением</i>	
Методика основана на естественной для крыс реакции переходить из освещенной камеры в темную. Крыс помещают в освещенную камеру размером 40 × 20 × 20 см. В 1-й день обучения животные в темной камере получают электроболевое раздражение при силе тока 1 мА. Через 24, 48 ч исследуют время нахождения животных в освещенной камере (обычно не более 2–3 мин)	Относительное число животных, не избегающих светлой камеры. Латентный период выхода в темную камеру при первом предъявлении. Латентный период выхода в темную камеру через 24, 48 ч после обучения
<i>Активное избегание с отрицательным (болевым) подкреплением</i>	
Проводится обычно в так называемой челночной камере, состоящей из двух отсеков размером 20 × 20 × 20 см, и разделенных переходом или дверцей. В полу камеры — решетки, на которые можно подавать ток силой 0,75–1,5 мА (обычно определяют болевой порог индивидуально для каждого животного и используют ток, равный 1,5 единицам болевого порога). Обучение методом дискретных проб заключается в том, что каждое исследование начинается с сигнала (зуммер, свет). Если животное через фиксированное время (5–10 с) не переходит в безопасный отсек, подается электроболевое раздражение. Исследования проводят до достижения критерия обученности не менее чем у 80% животных контрольной группы. Критерием обученности является 18 успешных избеганий в серии из 20 исследований. Крыс обучают двустороннему избеганию. При изучении долгосрочной памяти (например 1, 7, 10 дней после достижения критерия) животных подвергают однотипным действиям с обучением исследованию. Угасание навыка исследуют каждый день, не подкрепляя сигнал болевым раздражением. Возможны модификации метода выработки этого рефлекса: одностороннее избегание, массирующее обучение	Среднее количество правильных ответов в зависимости от числа предъявлений. Кривая обучаемости — относительное число животных, достигших критерия обученности при данном числе исследований. Среднее значение болевого порога. Среднее число межсигнальных реакций. Процент ошибочных ответов при исследовании памяти. Скорость угасания навыка

<i>Обучение в лабиринте с положительным (пищевым) подкреплением</i>	
<p>Используют Т-, У-образные лабиринты или многосекционные лабиринты. Животных взвешивают до начала ограничения в питании, после первого дня исследования и после достижения критерия обученности. Исследования продолжают до достижения критерия, подбираемого эмпирически при анализе кривой обученности. Исследования продолжают до достижения критерия не менее чем 80 % животных контрольной группы. При отсутствии различий в скорости обучения исследуют память обученных животных. При исследовании памяти необходимо, чтобы животные получили в процессе обучения сходное количество подкреплений</p>	<p>Среднее количество правильных ответов в зависимости от числа предъявлений. Кривая обученности. Частота (и длительность) различных актов поведения, в том числе и эмоциональная реакция на лабиринт. Число различных элементарных актов поведения до достижения критерия обученности. Потеря массы тела в процессе обучения и корреляция этого показателя со скоростью приобретения навыка</p>

6.1.7. Методы изучения репродуктивной функции

6.1.7.1. Морфологическое изучение семенников

Для морфологического изучения семенников их фиксируют в 10% формалине или жидкости Карнуа, заливают в парафин, готовят поперечные срезы толщиной 6–7 мкм, окрашивают гематоксилином и эозином. Морфологическую оценку состояния сперматогенного эпителия проводят по следующим количественным показателям:

а) индекс сперматогенеза = $\Sigma A/100$, где А — число стадий в каждом канальце, 100 — число подсчитанных канальцев. Индекс сперматогенеза подсчитывают по 4-балльной системе, фиксируют в канальце наличие сперматогоний, сперматоцитов 1-го и 2-го порядка, сперматид и сперматозоидов;

б) среднее количество нормальных сперматогоний в каждом канальце (подсчитывают 20 канальцев);

в) относительное количество канальцев с 12-й стадией мейоза (метафаза 2-го деления созревания, подсчитывают в 100 канальцах).

6.1.7.2. Функциональное состояние сперматозоидов

Имеются различные модификации получения эякулята (из эпидидимуса, после введения окситоцина, раздражение семенного бугорка и др.). Функциональное состояние сперматозоидов оценивают по следующим показателям: характер и продолжительность их движения; относительное количество патологических форм сперматозоидов; концентрация сперматозоидов. Возможно также определение относительного количества живых сперматозоидов и их резистентности — осмотической и кислотной и др. показатели.

6.1.7.3. Морфологическое изучение яичников

Для морфологического изучения яичников их фиксируют в жидкости Карнуа, заключают в парафин, готовят срезы по типу топографических, через весь орган, толщиной 6 мкм, окрашивают гематоксилином и эозином. Эвтаназию животных проводят в стадии эструс или проэструс, что необходимо для последующего подсчета структурно-функциональных элементов в яичнике.

Регистрируют:

- примордиальные фолликулы и фолликулы с одним слоем гранулезных клеток;
- фолликулы с двумя и более слоями гранулезных клеток;
- зрелые фолликулы (граафовы пузырьки);
- атретические тела и атретизирующие фолликулы;
- желтые тела;
- общее количество генеративных форм.

Указанные элементы подсчитывают по всей поверхности среза. Фолликулы примордиальные и с одним слоем гранулезных клеток учитывают в каждом 10-м срезе и результат умножают на 10, фолликулы зрелые с двумя и более слоями гранулезных клеток, атретические тела подсчитывают в каждом 5-м срезе, желтые тела фиксируют в срединном срезе. При количественной оценке микроструктуры яичника регистрируют только фолликулы, содержащие ядро и ядрышко.

Заключение

При изучении влияния фармакологического вещества на репродуктивную функцию исследователь может использовать и другие показатели, позволяющие выявить возможность его неблагоприятного действия на репродукцию. Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Гуськова Т.А. Основные проблемы безопасности лекарственных средств // Фарматека. — 2006, №5. — С.151–156.
2. Гуськова Т.А. Доклинические токсикологические исследования лекарственных средств как основа их безопасного применения в клинике // Клинические исследования лекарственных средств в России, 2004. — №3–4. — С. 8–15.
3. Гуськова Т.А., Смольникова Н.М., Скосырева А.М., Сюбаев Р.Д., Верстакова О.Л. Категории риска репродуктивной токсичности лекарственных средств // Ведомости научного центра экспертизы и государственного контроля лекарственных средств, 2001. — № 3. — С. 36–38.
4. Дыбан А.П. Раннее развитие млекопитающих. — Л.: Наука, 1988. — 228 с.
5. Дыбан А.П., Баранов В.С., Цитогенетика развития млекопитающих. — М.: Наука, 1978. — 216 с.
6. Кирющенко Л.П., Тараховский М.Л. Влияние лекарственных средств на плод. М.: 1990. — 286 с.
7. Методические указания по изучению репродуктивной токсичности фармакологических веществ. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2005. — С. 87–100.
8. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию. — М.: Фармакологический комитет, 1986. — 25 с.
9. Принципы оценки риска для потомства в связи с воздействием химических веществ в период беременности. — Женева: ВОЗ, 1986. — 156 с.
10. Alexander P. G., Tuan R. S. Role of environmental factors in axial skeletal dysmorphogenesis. Birth Defects Research (Part C), 90: 118–132 (2010).
11. Burdan F. et al. Morphological studies in modern teratological investigations. Folia Morphol (Warsz), 64(1): 1–8 (2005).
12. Depew M.J. Analysis of skeletal ontogenesis through differential staining of bone and cartilage. Methods Mol Biol., 461: 37–45 (2008).
13. Menegola E., Broccia M. L., Giavini E. Atlas of rat fetal skeleton double stained for bone and cartilage. Teratology., 64(3): 125–133 (2001).
14. Yang Y. Skeletal morphogenesis during embryonic development. Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr., 19(3): 197–218 (2009).
15. Neubert D. Reproductive toxicology: the science today. Teratogenesis, Carcinogenesis and Mutagenesis 22: 159–174 (2002).
16. Harris M., Chapin R. E., Lockhart A. C. and Jokinen M. P. Assessment of a short-term reproductive and developmental toxicity screen. Fundam. Appl. Toxicol., 1: 186–196 (1992).
17. Amann R. P. Use of animal models for detecting specific alterations in reproduction. Fundam. Appl. Toxicol., 2: 13–16 (1982).
18. Chahoud I. et al. Classification terms in developmental toxicology: need for harmonization. Reproductive toxicology, 13 (1): 77–82 (1999).

ГЛАВА 5

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ МУТАГЕННЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев; член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова; д. б. н., проф. Ю.А. Ревазова; д. м. н., проф. В.А. Меркулов; д. м. н. О.Л. Верстакова; д. м. н., проф. В.С. Журков; д. б. н. Л.П. Сычева; к. б. н. А.К. Жанатаев; к. м. н. В.В. Юрченко

Введение

Исследования мутагенности новых фармакологических средств и вспомогательных компонентов лекарственных форм проводятся на этапе доклинического изучения и предусматривают оценку способности ЛС к индукции разных типов мутаций в зародышевых и соматических клетках. С этой целью используют комплекс методов, выполняемых на разных тест-объектах. Опыт работы по тестированию лекарств, накопленный различными группами исследователей с момента выхода первой редакции «Методических рекомендаций по оценке мутагенности новых ЛС» (1981), показывает, что на доклиническом этапе исследования целесообразно применение следующего набора тестов для оценки ЛС на мутагенность:

— тест на индукцию генных мутаций (тест Эймса на *Salmonella typhimurium* или 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).

Регламент выполнения рекомендованных методов и алгоритмы трактовки результатов исследований описаны в соответствующих разделах, общие вопросы по генотоксикологии ЛС изложены ранее [1].

Исследование мутагенных свойств фармакологических средств, так же как и экспертную оценку результатов, должны проводить специалисты, имеющие достаточные профессиональные навыки по применению методов, составляющих систему тестирования. Данные методические рекомендации описывают комплексную систему проверки генетической активности новых ЛС, но не является пособием для освоения методов. Последние в должном объеме можно освоить только в результате стажировки в лабораториях соответствующего профиля.

1. Общие подходы

Тестированию на мутагенную активность подвергаются новые оригинальные фармакологические средства, созданные химическими, биотехнологическими, генно-инженерными и иными способами, включая полученные из сырья природного происхождения и фитопрепараты¹, а также новые фиксированные комбинации фармакологических средств, планируемые для широкого клинического применения.

В случае получения положительных результатов в обоих тестах делается заключение о наличии мутагенной активности и препарат не подвергается дальнейшим исследова-

¹ Настоящие методические указания не распространяются на лекарства-кандидаты на основе наночастиц и бессмысленных последовательностей. До разработки специальной системы исследования мутагенности таких субстанций и лекарственных форм оценка их мутагенности должна проводиться по программам, специально разработанным для каждой из них в отдельности на основе тестов *in vivo*, позволяющих учитывать зависимость манифестации возможного эффекта от особенностей биодоступности, биодegradации, кинетики, пути введения и времени экспозиции в организме.

дованиям. В случае получения положительного результата только в тесте на индукцию генных мутаций необходимо проведение дополнительного исследования на индукцию ДНК-повреждений в различных органах и тканях млекопитающих *in vivo*, с включением в анализ зародышевых клеток. Исследование проводится с использованием методов, описанных в «Методических указаниях по оценке канцерогенности ЛС и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах» настоящего Руководства.

При условии получения отрицательных результатов препарат может быть допущен к 1-й и 2-й фазам КИ.

Перед 3-й фазой КИ необходимо провести изучение способности ЛП индуцировать мутации в зародышевых клетках (метод учета доминантных летальных мутаций у мышей).

В случае получения в экспериментальных тестах результатов, не позволяющих с полной определенностью сделать заключение о мутагенных свойствах тестируемого фармакологического вещества, на заключительных этапах КИ (3-я фаза) следует провести исследование методами учета хромосомных aberrаций и/или повреждений ДНК в клетках периферической крови леченых больных.

2. Тесты на индукцию генных мутаций

2.1. Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса)

2.1.1. Термины и определения

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.

2.1.2. Цель исследования и принцип метода

Данный метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ или их метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*.

Фармакологические вещества с выраженной антибактериальной активностью изучать в тесте Эймса нецелесообразно.

Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метаболической активации или без метаболической активации. 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* [2, 3].

2.1.3. Процедура тестирования

2.1.3.1. Бактерии

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 аукотрофность 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.

2.1.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно внутривентриально, за 5 суток до эвтаназии) [4].

2.1.3.3. Изучаемые концентрации

Максимальная концентрация тестируемого соединения определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность тестируемого соединения может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации. Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная доза может быть в пределах 1000–5000 мкг на чашку. Для нетоксичных водонерастворимых соединений максимальная концентрация определяется как наименьшая нерастворимая, определяемая по преципитации в агаре. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная доза должна подавлять рост бактерий не более чем на 50%, что определяется либо по уменьшению количества спонтанных ревертантов, либо по подавлению роста бактериального газона. В любом случае должно проверяться не менее 5 различных концентраций тестируемого соединения, различающихся, например, в 10 раз.

2.1.3.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный (необработанный или растворитель) и позитивный контроли.

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или диметилсульфоксид, а при необходимости и другие растворители.

Позитивные контроли должны быть специфичны для каждого тестерного штамма. Позитивный контроль для вариантов с метаболической активацией должен соответствовать типу используемой системы экзогенной метаболической активации.

2.1.3.5. Проведение эксперимента

Необходимые для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, проведение работ по получению фракции S9, а также регламент работы с бактериальными культурами описаны в литературе. Исследования параллельно ведут с использованием микросомальной активирующей смеси и без нее для регистрации действия как прямых мутагенов, так и непрямых, активность которых связана с образованием мутагенных метаболитов, учитываемых при работе с микросомальной фракцией.

В контрольных вариантах исследования вместо испытуемого образца вносят соответствующий объем растворителя.

2.1.4. Данные и их представление

2.1.4.1. Обработка результатов

Данные должны быть представлены в виде количества ревертантных колоний на чашку. Как для тестируемого соединения, так и для позитивных и негативных контролей указывается количество колоний для каждой чашки, среднее количество ревертантных колоний на чашку и стандартное отклонение. Если ни в одном из вариантов на данном

штамме (штаммах) не получено статистически значимых результатов, эксперимент прекращают. В случае обнаружения позитивного результата исследование повторяют с целью подтверждения эффекта, причем работу ведут только на том штамме (штаммах), на котором был выявлен эффект. Если максимальный эффект зарегистрирован на одной из промежуточных доз (такая ситуация возможна при работе с фармакологическими средствами, обладающими бактерицидными свойствами), прибегают к дроблению доз. При этом за среднюю точку на шкале доз испытуемого вещества принимают дозу, на которой был выявлен максимальный эффект. В исследование вводят еще 4 варианта: дозы в 2 и 5 раз меньше и больше средней дозы.

Если при проведении повторного исследования эффект не обнаруживается, проводится еще одно дополнительное исследование, результат которого сравнивают с первыми двумя экспериментами. Заключение о наличии или отсутствии мутагенной активности испытуемого соединения делают на основании двух исследований с совпадающими результатами.

Для оценки результатов тестирования могут использоваться соответствующие статистические методы, например метод попарных сравнений Даннета [5].

2.1.4.2. Оценка результатов

Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное зависимость от дозы увеличение количества ревертантов, или воспроизводимый и статистически достоверный позитивный ответ хотя бы для одной экспериментальной точки.

Тестируемое соединение, не вызывающее статистически достоверного зависимого от дозы увеличения количества ревертантов или воспроизводимого и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки, рассматривается как не мутагенное в данном тесте.

Отчет должен включать следующую информацию:

- бактерии: использованные штаммы;
- условия проведения теста: уровни доз и обоснование выбора доз, количество чашек на экспериментальную точку, токсичность, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой культуры;
- среднее количество ревертантных колоний на чашку;
- стандартное отклонение;
- отношения доза–эффект (где возможно).

2.1.4.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение индуцирует генные мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания у данного микроорганизма. Они могут быть специфичны для микроорганизмов, поэтому их выявление не должно рассматриваться в качестве повода для заключения о мутагенности вещества для человека. Однако в этом случае проводится дополнительное исследование по алгоритму, описанному в пункте 2. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение не мутагенно для использованных штаммов *Salmonella typhimurium*.

2.1.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте по учету генных мутаций у бактерий

Название эксперимента: _____

Тестерные микроорганизмы: _____

Вид _____ штаммы _____

Вещество:
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Позитивный контроль _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Способ обработки _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

2.2. Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у дрозофилы

2.2.1. Термины и определения

Летальная мутация — изменение в геноме, проявление которого приводит к смерти его носителя.

Рецессивная мутация — изменение в геноме, которое проявляется в условиях гомозиготности или гемизиготности. Сцепленные с полом гены присутствуют в половых (X или Y) хромосомах. Обсуждаемый метод определяет мутационные события в X-хромосоме.

2.2.2 Цель исследования и принцип метода

С помощью данного метода проводят оценку способности испытуемого вещества и продуктов его метаболизма индуцировать генные мутации в зародышевых клетках дрозофилы.

Рекомендуемый метод, называемый Меллер-5, основан на индукции исследуемыми лекарствами рецессивных летальных мутаций в X-хромосомах самцов дикого типа линии D-32. Эти мутации передаются через самок F₁ самцам второго поколения, не доживающим до стадии имаго.

2.2.3. Процедура тестирования

Биология, морфология, разведение дрозофилы, а также инструменты для работы с ней и приготовление питательных сред подробно описаны в соответствующих руководствах [6].

2.2.3.1. Используемые линии дрозофилы

Для исследований по учету рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ) требуется линия дикого типа с хорошо изученным спонтанным фоном мутабельности, например Canton-S или D-32, а в качестве тестерной линии лучше всего использовать линию BASC. В X-хромосоме мух этой линии имеются 2 инверсии — sc8 и d49, которые полностью исключают возможность кроссинговера между половыми хромосомами, но не нарушают жизнеспособности дрозофилы [6]. Фенотипическими маркерами служат мутации Argicot — абрикосовые глаза и Bag — полосковидные глаза. В подобном рода экспериментах можно пользоваться также тестерной линией C1B.

2.2.3.2. Пути введения и выбор доз

Обычно используют два основных способа введения испытуемых фармакологических средств в организм дрозофилы: ингаляционный и пероральный. Чаще всего используют последний, при введении соединения в корм. В этом случае целесообразно использовать стеклянные пористые фильтры, погруженные в бюксы с веществами, растворенными в 1–5 % сахарном сиропе в исследуемых концентрациях. Если препарат не растворим в воде, можно (при обязательном применении соответствующих контролей с растворителями) растворить его в этиловом спирте или диметилсульфоксиде так, чтобы конечная концентрация этих растворителей в сахарном корме не превышала 2 %. Допускается внесение фармакологических средств непосредственно в корм. Ингаляционные затравки осуществляются в эксикаторах. Расчет «доз» при ингаляционном введении производят на объем эксикатора, а при пероральном — на объем корма. В зависимости от токсичности фармакологического средства длительность экспозиций может колебаться от нескольких часов до нескольких дней (обычно экспозиция составляет 48–72 ч). Комбинация различных концентраций и экспозиций позволяет ориентировочно определять количество («дозу») фармакологического средства, вызывающую примерно 50 % стерильность самцов. Эту «дозу» принимают за максимальную, которую используют в эксперименте. Снижение «дозы» необходимо только в случае исследований фармакологических средств, обладающих выраженным стерилизующим эффектом.

2.2.3.3. Проведение эксперимента

После обработки изучаемым фармакологическим средством самцов линии D-32 скрещивают с виргинными самками тестерной линии BASC (5 самцов, 10 самок). После начала вылета мух первого поколения (F1) отбирают виргинных гетерозиготных самок и индивидуально скрещивают их с самцами F1.

После вылета второго поколения (F2) каждая культура просматривается визуально с целью обнаружения таких, в которых отсутствуют самцы дикого фенотипа (с красными глазами). Общее количество культуральных пробирок определяет число проанализированных X-хромосом самцов, подвергшихся действию изучаемых соединений. Пробирки, в которых отсутствуют самцы дикого типа, отмечают как «летали». Постановка контролей обязательна [7].

2.2.4. Данные и их представление

Результаты исследований представляют в виде табл. 1.

Частоту рецессивных леталей оценивают как отношение числа культур второго поколения без самцов дикого фенотипа к общему числу культур. Всего необходимо поставить не менее 1000 культур F₂ на одну экспериментальную точку.

Для оценки значимости превышения частоты рецессивных леталей в опыте над контролем следует применять точный критерий Фишера для таблиц сопряженности 2×2. Различия между опытом и контролем считаются значимыми при $p < 0.01$ [5].

Таблица 1

Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций на дрозофиле

Препарат	Экспозиция	Число изученных культур в F ₂	Число не фертильных самцов F ₂	Рецессивные сцепленные с полом летальные мутации		Уровень значимости
				Количество	% ±m	
концентрация						

2.2.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте на индукцию рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций у дрозофилы

Название эксперимента: _____
Линии дрозофилы: _____
Вещество: _____
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Способ обработки _____ концентрации _____
Длительность обработки _____
Группы _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

2.3. Учет соматической рекомбинации (мозаицизма) у дрозофилы

2.3.1. Термины и определения

Под соматической рекомбинацией понимают обмен генетическим материалом между гомологичными хромосомами соматических клеток в митозе, приводящий к образованию мозаичных особей. При использовании в качестве маркеров рецессивных генов возможно выявление генных мутаций, делеций, митотических рекомбинаций и генных конверсий.

2.3.2. Цель исследования и принцип метода

Целью данного метода является интегральное выявление рекомбинационных и других мутационных событий, индуцируемых лекарственным веществом или его метаболитами в соматических клетках личинок дрозофилы. В основе метода лежит учет мозаичных пятен, возникающих у мух тестерных линий в результате комплексного нарушения генотипа: митотической рекомбинации, потери хромосом и/или их фрагментов, транслокаций, делеций и генных мутаций. В качестве маркеров возможно использование генов «*y*» и «*sn*³» в трансположении [8].

2.3.3. Процедура тестирования

Биология, морфология, разведение дрозофилы, а также инструменты для работы с ней и приготовление питательных сред подробно описаны в соответствующих руководствах [6].

2.3.3.1. Используемые линии дрозофилы

Для учета соматического мозаицизма в данной тест-системе необходимо поддержание следующих тестерных линий дрозофилы:

линия 1 – *yellow* – генотип *y/y* (*y* – рецессивный ген, обуславливающий развитие желтой окраски тела и щетинок);

линия 2 – *w*, *sn*³ – генотип *w sn*³/*Y* (*w* – *white* – белая окраска глаз, *sn*³ – *singed*³ – извитая скрученная форма щетинок; оба гена рецессивные).

Спонтанный уровень мутаций и рекомбинаций невысок и колеблется у разных линий в пределах от 0.3 до 1.1%.

2.3.3.2. Пути введения и выбор доз

Обычно используют один из двух способов введения испытуемых фармакологических средств в организм дрозофилы: ингаляционный или пероральный (с кормом). Если препарат нерастворим в воде, можно (при обязательной постановке соответствующих контролей) растворить его в этиловом спирте или диметилсульфоксиде так, чтобы конечная концентрация этих растворителей в испытуемом растворе составляла не более 2%. В любом случае в культуру с кормом вносят 200 мкл тестируемого раствора. Возможно распыление нерастворимых в воде соединений по поверхности питательной среды. Ингаляционные затравки осуществляются в эксикаторах, в этом случае расчет доз производят на объем эксикатора.

Токсичность фармакологических средств устанавливают по выживаемости самок F₁, которая на максимальной из использованных концентраций не должна быть меньше 50%. Всего в эксперименте определяют эффект 3 различных концентраций фармакологического средства. В зависимости от токсичности фармакологического средства длительность экспозиции может колебаться от нескольких часов до нескольких дней (обычно экспозиция составляет 48–72 ч).

2.3.3.3. Проведение экспериментов

Девственных самок в количестве 10 особей помещают в пробирку, содержащую стандартную питательную среду вместе с 5 самцами. Через 48–72 ч родителей пересаживают в пробирки со свежей питательной средой, а в прежние пробирки вносят растворы испытуемых фармакологических средств.

Просмотр вылетевших особей начинают с 9–10-го дня после начала эксперимента и продолжают до начала вылета следующего поколения. Просмотр проводят под биноклярным стереоскопическим микроскопом в отраженном свете.

При скрещивании самок линии 1 с самцами линии 2 у гетерозиготных самок первого поколения, имеющих генотип $y^+ / +w sn^3$, регистрируют мутантные щетинки (макрохеты на голове, тораксе и скутеллюме) фенотипа yellow или singed. В протоколе регистрируют общее число просмотренных самок, число самок с одиночными (y, sn^3) и двойными (y, sn^3) пятнами [8].

2.3.4. Данные и их представление

Результаты экспериментов представляют в виде таблицы 2.

Статистическую обработку результатов проводят с использованием χ^2 -критерия, сравнивая частоту появления особей с пятнами в контрольных и опытных сериях [5].

Таблица 2

Учет соматического мозаицизма при использовании маркеров y, w и sn^3 .

Препарат концентрация/ экспозиция	Общее число просмотренных самок	Число самок с мутациями				
		пятен « sn^3 »	пятен « y »	пятен « $y sn^3$ »	всего пятен	% $\pm m^*$

* $m = 1/\sqrt{N}$, где N — число просмотренных особей.

2.3.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте на индукцию соматического мозаицизма у дрозофилы

Название эксперимента: _____

Линии дрозофилы, условия скрещивания: _____

Возраст родителей на момент скрещивания _____
Вещество:
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Способ обработки _____ концентрации _____
Максимальный возраст личинок на момент обработки группы _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

3. Тесты на индукцию хромосомных повреждений *in vivo*

Путь введения исследуемого фармакологического вещества должен соответствовать планируемому в клинике. 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. Применение иных растворителей допускается только при надлежащем обосновании и при условии отсутствия у них в применяемых концентрациях токсических эффектов и химического взаимодействия с исследуемым соединением. Оптимальный объем вводимых растворов фармакологических средств и соответствующих растворителей (для контрольных групп животных) должен составлять при пероральном и внутрибрюшинном способах введения не более 20 мл/кг и при внутримышечном — не более 10 мл/кг массы животного.

Выбор доз для исследований определяется на основе результатов оценки острой токсичности и специфической активности фармакологического вещества. Вещество или лекарственная форма исследуются в двух дозах. Первая соответствует предполагаемой суточной терапевтической дозе для человека, пересчитанной на 1 кг массы или поверхность тела экспериментального животного², а вторая выбирается на основе данных по острой токсичности и составляет 1/10–1/5 ЛД₅₀ для используемого вида млекопитающих. В случае если токсичность исследуемого соединения настолько мала, что дозу ЛД₅₀ невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы определяется 2000 мг/кг.

Проведение экспериментов *in vivo* предусматривает применение генетически однородных животных, чаще половозрелых самцов и самок мышей. Ни одна из инбредных линий не выделяется как предпочтительная. Не исключается применение мышей-гибридов или других видов животных.

² Общие принципы пересчета доз изложены в «Методических указаниях по изучению общетоксического действия фармакологических веществ».

3.1. Учет хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

3.1.1. Термины и определения

Цитогенетическая активность — способность вещества вызывать структурные и численные хромосомные нарушения в соматических и зародышевых клетках.

Аберрации хромосомного типа — структурные нарушения на уровне идентичных локусов обеих хроматид, выявляемые как парные фрагменты и хромосомные обмены.

Аберрации хроматидного типа — структурные нарушения на уровне одной хроматиды, выявляемые как одиночные фрагменты или хроматидные обмены.

Ахроматические пробелы (гепы) — определяемые визуально нарушения целостности окраски хроматиды, не превышающие по размеру ее ширину и не сопровождающиеся сдвигом дистального участка относительно ее оси.

Кластогенез — способность вещества вызывать разрывы хромосом с образованием одиночных и парных фрагментов.

3.1.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической (кластогенной) активности фармакологических веществ в клетках костного мозга млекопитающих.

В основе метода лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках на стадии метафазы. Клетки костного мозга характеризуются высоким уровнем митотической активности, спонтанная частота клеток с хромосомными повреждениями, включая гепы, составляет 1–2% [9].

3.1.3. Процедура тестирования

3.1.3.1. Лабораторные животные

Исследования проводят на самцах и самках мелких лабораторных грызунов, не менее 5 особей в каждой контрольной и экспериментальной группах.

Животные должны содержаться при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

3.1.3.2. 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 суток. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и/или 24 ч после последнего введения в зависимости от фармакокинетических особенностей исследуемого препарата [7].

3.1.3.3. Контроли

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.

3.1.3.4. Приготовление цитогенетических препаратов

Методика выделения клеток костного мозга и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и ранее опубликованных методических указаниях [9, 10]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

3.1.3.5. Микроскопический анализ

Анализируют по 100 метафаз от каждого животного. Анализу подвергаются округлые метафазные пластинки без наложений хромосом с модальным числом 40 (39–41) — для мышей, 42 (41–43) — для крыс. Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов), число клеток с множественными повреждениями и клеток с тотальной фрагментацией хромосом.

3.1.4. Оценка результатов

Доказательством цитогенетической активности исследуемого препарата является дозозависимое и/или воспроизводимое в разных сериях исследования статистически значимое превышение доли клеток с хромосомными aberrациями в получавших исследуемый препарат сериях исследования по сравнению с контролем.

Статистическую обработку проводят согласно общепринятым указаниям [5].

Результаты документируются согласно табл. 3.

Таблица 3

Результаты оценки цитогенетической активности вещества в тесте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

Условия эксперимента	Количество клеток	на 100 исследованных клеток					Количество клеток с хромосомными повреждениями ($M \pm m\%$)	Уровень значимости
		гепы	одиночные фрагменты	двойные фрагменты	обмены	клетки с МП*		

* — клетки с множественными (более 5 на метафазу) повреждениями

3.1.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки цитогенетической активности вещества в тесте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

Название эксперимента: _____

Животные: _____

Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____

Питомник _____

Дата получения _____

Количество _____

Вещество: _____

Название _____

Формула, физико-химические свойства _____

Откуда получено _____

Растворитель _____

Позитивный контроль _____

Анализ данных литературы: _____

Схема эксперимента: _____

Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____

Пути введения _____ дозы _____

Длительность и кратность введения _____

Группы _____

Методика приготовления препаратов _____

Полученные результаты: _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____

Исполнители: _____

Дата сдачи отчета: _____

3.2. Учет микроядер в клетках млекопитающих

3.2.1. Термины и определения

Микроядра — небольшие ДНК-содержащие образования, состоящие из ацентрических фрагментов хромосом или отставших на стадии ана-телофазы хромосом. На стадии телофазы эти фрагменты могут включаться в ядра дочерних клеток или образовывать одиночные или множественные микроядра в цитоплазме.

3.2.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности фармакологических средств в полихроматофильных эритроцитах костного мозга или периферической крови млекопитающих.

Метод основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами. Спонтанная частота клеток с микроядрами составляет 0.1–0.2% [11].

3.2.3. Процедура тестирования

3.2.3.1. Лабораторные животные

Эксперименты проводят на самцах и самках мелких лабораторных грызунов. Предпочтительно использование генетически однородных животных, не менее 6 особей в каждой контрольной и экспериментальной группах.

Животные должны содержаться при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

3.2.3.2. 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 костного мозга через 24 ч после введения или периферической крови через 48 ч после введения.

Во второй серии исследуемый препарат в дозе, соответствующей суточной терапевтической для человека, вводят самцам и самкам ежедневно на протяжении 4–5 суток. Фиксацию клеточного материала осуществляют через 6 и/или 24 ч после последнего введения в зависимости от фармакокинетических особенностей испытуемого препарата [7, 11, 12].

3.2.3.3. Контроли

Негативным контролем является используемый растворитель.

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

3.2.3.4. Приготовление цитогенетических препаратов

Методики выделения клеток и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и методических указаниях [7, 11, 13]. Для окраски препаратов предпочтительнее использование ДНК-специфичных красителей (акридиновый оранжевый, Hoechst 33258+pyronin Y), что позволяет избежать возможной ложноположительной оценки вследствие артефактного окрашивания [12]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

3.2.3.5. Микроскопический анализ

Анализируют 2000 полихроматофильных эритроцитов от каждого животного, соотношение нормо- и полихроматофильных эритроцитов определяют при подсчете 500 эритроцитов.

3.2.4. Оценка результатов

Критерием позитивного результата является воспроизводимое и/или зависимое от дозы значимое увеличение числа полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами, по крайней мере, в одной из получавших препарат групп по сравнению с контрольной. Полученный положительный результат свидетельствует, что вещество индуцирует хромосомные повреждения и/или нарушения митотического аппарата клеток у экспериментальных животных. Результаты исследований представляют в виде табл. 4.

Таблица 4

Результаты оценки цитогенетической активности вещества в тесте на индукцию микроядер в клетках костного мозга млекопитающих

Группа (вещество, доза)	№ мыши	Количество ПХЭ с микроядрами на 1000 ПХЭ		Доля ПХЭ от всех эритроцитов
		На каждую мышь	На группу в целом	

Статистическую обработку проводят согласно общепринятым указаниям [5].

3.2.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки цитогенетической активности вещества в тесте на индукцию микроядер в клетках костного мозга или периферической крови млекопитающих

Название эксперимента: _____
Животные: _____
Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____
Питомник _____
Дата получения _____
Количество _____
Вещество:
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Позитивный контроль _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Пути введения _____ дозы _____
Длительность и кратность введения _____
Группы _____
Методика приготовления препаратов _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

4. Оценка мутагенности в зародышевых клетках

4.1. Метод учета доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей

4.1.1. Термины и определения

Доминантные летальные мутации — генетические изменения, индуцированные в родительских зародышевых клетках и приводящие к гибели первое поколение потомков на эмбриональных стадиях развития. Большая часть доминантных деталей представляет собой численные и структурные aberrации хромосом, частично они могут быть представлены генными мутациями.

4.1.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление влияния исследуемого препарата на генетические структуры зародышевых клеток. Мутагенный эффект проявляется в виде повышенной эмбриональной смертности. Если яйцеклетка оплодотворена сперматозоидом, несущим доминантную леталь, то смерть развивающегося эмбриона может произойти как до, так и после имплантации. Для оценки мутагенных свойств фармакологических средств учитывают постимплантационную смертность.

4.1.3. Процедура тестирования

Обычная схема проведения эксперимента включает обработку фармакологическим средством самцов с последующим спариванием их с интактными самками [9,14,15]

4.1.3.1. Лабораторные животные

Эксперименты проводят на самках и самцах мелких лабораторных грызунов. Предпочтительно использование генетически однородных животных.

Животные должны содержаться при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

4.1.3.2. Проведение эксперимента

Для каждого варианта групп животных, получающих препарат, и контроля (понедельного) следует использовать животных приблизительно одного срока рождения. Самки в течение 2–3 недель после привоза не рекомендуется брать в исследование для исключения неконтролируемых беременностей.

Для выявления возможного мутагенного эффекта фармакологическое средство исследуется в дозах 1/2 и 1/10 ЛД₅₀ при однократном введении. Применяемые дозы не должны снижать фертильность более чем на 50%. В противном случае их уменьшают и повторяют эксперимент. Исследование проводят в течение 3 недель на постмейотических стадиях сперматогенеза. На каждую дозу и контроль берут не менее 15 самцов. Сразу же после затравки к каждому обработанному или контрольному самцу подсаживаются по три виргинных самки. Подсадки самок проводятся еженедельно, с тем, чтобы вести анализ доминантной летальности соответственно стадиям сперматогенеза обработанных самцов. Эмбриональная смертность плодов у самок, забеременевших в 1-ю неделю после введения химического вещества, будет свидетельствовать о мутационных событиях, произошедших в зрелых сперматозоидах, 2-я неделя соответствует поздним сперматозоидам, 3-я неделя — ранним и средним сперматозоидам.

Отсаженных от самцов самок вскрывают на 15–17 день беременности. Большая часть доминантных леталей вызывает смерть эмбрионов при или вскоре после имплантации. Погибшие на этой стадии мертвые эмбрионы выглядят, как темные гомогенные округлые тела диаметром 2.5–3 мм. При вскрытии регистрируют количество живых и мертвых эмбрионов у каждой самки отдельно. Особенное внимание следует обращать на

дистальные отделы матки, так как именно там часто располагаются мертвые эмбрионы, которые в силу своих небольших размеров могут быть не учтены при обычном просмотре матки, растягиваемой двумя пинцетами. Данные вскрытия фиксируют в следующей форме (табл. 5).

Таблица 5

*Форма регистрации первичного экспериментального материала
в тесте на доминантные летальные мутации*

Номер самца	Номер самки	Число живых эмбрионов	Число мертвых эмбрионов

4.1.3.3. Контроли

В качестве позитивных контролей целесообразно использовать фотрин, циклофосфамид или любой другой известный агент, заведомо обладающий мутагенной активностью на зародышевых клетках млекопитающих.

Негативным контролем является используемый растворитель.

4.1.4. Оценка результатов

В итоговую таблицу 6 вносят данные по каждой серии эксперимента (за серию принимают группу самцов, обработанных определенной дозой изучаемого фармакологического средства на данной стадии сперматогенеза), включая число беременных самок и процент фертильности.

Основным показателем уровня доминантных летальных мутаций служит уровень постимплантационных потерь, представляющий собой отношение числа мертвых эмбрионов к сумме живых и мертвых эмбрионов [14, 15]. Он характеризует постимплантационную смертность. Для оценки значимости увеличения этого показателя в группах получавших ЛС по сравнению с контрольным вариантом при работе с линейными животными используют критерий χ^2 для соотношения сумм живых и мертвых эмбрионов. В связи с тем, что при таком подходе будет игнорироваться индивидуальная чувствительность мышей, для снижения доли ложнопозитивных результатов решение о наличии мутагенного эффекта следует принимать на 1% уровне значимости.

Корректным представляется использование двухфакторного дисперсионного анализа.

Для заключения о степени мутагенной активности используют данные постимплантационной смертности на самой чувствительной стадии сперматогенеза.

Таблица 6

*Изучение способности фармакологического средства
индуцировать доминантные летальные мутации в зародышевых клетках мышей*

Стадия сперматогенеза	Доза (мг/кг)	Число беременных самок	Фертильность (%)	Постимплантационная смертность	Значение χ^2 статистик
Зрелые сперматозоиды					
Поздние сперматиды					
Ранние сперматиды					

4.1.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте по учету доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках млекопитающих

Название эксперимента: _____

Животные: _____

Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____
Питомник _____
Дата получения _____
Количество _____
Вещество:
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Позитивный контроль _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Пути введения _____ дозы _____
Длительность и кратность введения _____
Группы _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5. Оценка эффектов препарата у леченых больных

5.1. Учет хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови леченых больных

5.1.1. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности фармакологических средств в клетках периферической крови больных, подвергавшихся лечению исследуемым ЛП.

В основе метода лежит регистрация видимых на стадии метафазы структурных нарушений хромосом в культуре клеток периферической крови, стимулируемых к пролиферации действием митогена.

5.1.2. Процедура тестирования

Для исследования используется цельная гепаринизированная кровь больных, находящихся на стационарном лечении. Взятие крови производится у каждого больного стерильно дважды — до начала лечения и не позднее 24 ч после завершения курса. Численность группы составляет 12–15 человек вне зависимости от пола и возраста. В случае необходимости возможно включение в одну группу больных, находящихся в разных лечебных учреждениях. При этом следует избегать включения в цитогенетическое обследование пациентов, подвергающихся рентгенодиагностическим процедурам и приему заведомо мутагенных лекарств (цитостатики и пр.).

5.1.3. Методика культивирования лимфоцитов периферической крови

5.1.3.1. Подготовка и проведение эксперимента

Взятие крови производится стерильными шприцами с гепарином (30 МЕ/мл). На каждого больного ставится четыре культуры клеток цельной крови; две до начала лечения и две не позднее 24 ч после завершения курса лечения.

Необходимое для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, а также регламент работы с культурами клеток, условия фиксации и подготовка препаратов для цитогенетических анализов описаны ранее [7, 16].

5.1.3.2. Цитогенетический анализ

Перед анализом препараты шифруют, исследование проводится слепым методом. На каждого больного анализируется не менее 200 метафазных пластинок: 100 до и 100 после завершения лечения.

Для анализа отбирают метафазные пластинки правильной формы с хорошим разбором хромосом и модульным числом 46 (45–47).

Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, число клеток с множественными aberrациями, клеток с тотальной фрагментацией хромосом.

5.1.3.3. Статистическая обработка полученных результатов

Заключение о мутагенной активности исследуемого фармакологического средства делают при сравнении долей клеток с aberrациями хромосом у больных до и после лечения с использованием критерия Уилкоксона для разности пар [5].

5.1.4. Отчетность

Сводные данные об индивидуальном уровне хромосомных aberrаций, определенном у каждого больного до и после лечения, представляются в табл. 7.

Обобщение результатов исследования проводят на основе данных, представленных в табл. 8.

Заключение о цитогенетической активности делается по результатам статистического анализа.

5.2. Анализ ДНК-повреждений в клетках периферической крови леченых больных методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет)

5.2.1. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка щелочно-лабильных сайтов и разрывов ДНК в клетках периферической крови больных, принимавших ЛС на этапах его КИ.

В основе метода лежит оценка целостности ДНК в клетках цельной крови больных. Использование цельной крови исключает длительные манипуляции с исследуемыми клетками, что снижает вероятность артефактного повреждения ДНК *ex vivo* и повышает точность анализа [17].

5.2.2. Процедура тестирования

Взятие крови у каждого больного проводят дважды — до начала лечения препаратом и не позднее 24-х ч после завершения курса лечения. Количество больных в группе составляет 12–15 человек вне зависимости от пола и возраста. Из исследования исключают больных, подвергшихся рентгенодиагностическим процедурам или терапии препаратами, заведомо обладающими ДНК-повреждающими свойствами.

Венозную кровь асептически отбирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт. При необходимости допускается замораживание образцов. Для этого цельную кровь смешивают в соотношении 1:1 со средой RPMI-1640, содержащей 10% диметилсульфоксида и 20 мМ EDTA-Na₂, замораживают и хранят в криобирках при –70 °С не более 2 месяцев. Непосредственно перед получением микропрепаратов образцы размораживают в водяной бане при 37 °С в течение 1–2 мин. Время с момента взятия крови до получения микропрепаратов или замораживания образцов не должно превышать 3 ч. Во всех случаях временные интервалы должны быть унифицированы.

Таблица 7

*Уровень хромосомных aberrаций
в лимфоцитах периферической крови больных до и после лечения*

№ больного	Условия взятия крови	№ образца крови	Шифр стекла	Количество проанализированных метафаз	Количество клеток с aberrациями	Aberrации					
						одиночные фрагменты	хроматидные обмены	парные фрагменты	хромосомные обмены	всего aberrаций	пробелы
1	До лечения										
2	После лечения										

Таблица 8

*Средние значения уровня хромосомных aberrаций
в группах: до лечения — после лечения*

Количество больных	Количество проанализированных метафаз	Количество клеток с aberrациями ($x \pm m$)*	Aberrации (количество)					клеток с пробелами
			одиночные фрагменты	хроматидные обмены	парные фрагменты	хромосомные обмены	всего aberrаций ($x \pm m$)*	

* $m = 1/\sqrt{N}$, где N — число просмотренных метафазных пластинок

Необходимое для проведения исследования оборудование и реактивы, а также процедура получения микропрепаратов подробно описаны [18].

5.2.3. Микроскопический анализ

Для окраски микропрепаратов используются флуоресцирующие красители, традиционно применяемые для визуализации ДНК. При анализе ДНК-комет с использованием программно-аппаратного комплекса рекомендуется использование красителя SYBR Green I, позволяющего получить с микропрепаратов яркие высококонтрастные изображения. Микропрепараты анализируют на эпифлуоресцентном микроскопе с соответствующими для конкретного красителя фильтрами при увеличении $\times 200-400$. На каждый микропрепарат рандомизированно анализируют не менее 100 ДНК-комет без наложений хвостов. В анализ не включают апоптотические ДНК-кометы, выявляемые на микропрепаратах в виде слабофлуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным хвостом и практически отсутствующей головой [19].

Программно-аппаратный комплекс для анализа ДНК-комет включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную CCD-камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров ДНК-комет проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК используют показатель % ДНК в хвосте.

При визуальном анализе ДНК-кометы ранжируются на пять условных типов с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4 [18]. Степень поврежденности ДНК при этом выражается как индекс ДНК-комет (ИДК), определяемый по формуле:

$$ИДК = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

где n_0-n_4 — число ДНК-комет каждого типа, Σ — сумма подсчитанных ДНК-комет.

5.2.4. Оценка результатов

Статистическую оценку результатов проводят путем сравнения показателей ДНК-повреждений у больных до и после лечения с использованием критерия Уилкоксона для разности пар [5]. Позитивный результат указывает на то, что исследуемое фармакологическое средство индуцирует ДНК-повреждения в клетках периферической крови человека.

Дополнительно к основному анализу проводят регистрацию ДНК-комет апоптотических клеток с целью определения потенциальной апоптогенной активности исследуемого препарата. Рекомендуются также провести сравнительную оценку показателей у больных до и после лечения с референсными показателями для здоровых людей.

5.2.5. Отчетность

Данные о больных и индивидуальных показателях ДНК-повреждений, определенных до и после лечения, документируются согласно таблице 9.

Таблица 9

Уровень ДНК-повреждений
в клетках периферической крови больных до и после лечения

№ п/п	Ф.И.О. больного	Диагноз	№ больницы, отделения	Условия взятия крови	Дата взятия крови	№ образца крови	Шифр микропрепарата	Проанализировано клеток	Показатель (% ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				До лечения					
				После лечения					

Обобщенные результаты исследования приводят согласно таблице 10.

Таблица 10

Средние значения уровней ДНК-повреждений
в группах: до лечения – после лечения

Условия	Количество больных	Проанализировано клеток	Средний показатель по группе (% ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)	Уровни значимости
До лечения				
После лечения				

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Дата проведения исследования (начало, окончание, отдельные исследования) _____

Данные о больных (лечебное учреждение, диагноз, длительность заболевания, возраст, и т.д.) _____

Лекарственный препарат:

Название _____ Производитель _____

Длительность применения, дозы _____

Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____

Полученные результаты _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____

Заключение по препарату _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

Заключение

Заключение о наличии у исследуемого фармакологического вещества мутагенных свойств выносится, если дозозависимый и/или воспроизводимый мутагенный эффект зарегистрирован хотя бы в одном эукариотическом тесте.

Результаты исследований фармакологического вещества на мутагенность являются частью материалов, оцениваемых в аспекте пользы и риска при решении вопроса о возможности КИ. Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воздействий. — М.: Медицина, 1998. — 328 с.
2. Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем: Методические указания. — М., 1985. — 34 с.
3. Gatehouse, D. G., Haworth T., Cebula E. et al. Report from the working group on bacterial mutation assays: International workshop on standardization of genotoxicity test procedures // *Mutat Res*, 1994, 312, 217-233.
4. Белицкий Г.А., Фоншейн Л.М., Худолей В.В. и др. Сокол как индуктор микросомальных ферментов, активирующих проканцерогены // *Экспериментальная онкология*, 1987. — №3. — С. 20–23.
5. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность: Методические указания. — Вильнюс, 1989.
6. Медведев Н. Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
7. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды, 51. — Женева, ВОЗ, 1989. — 212 с.
8. Методические рекомендации по применению соматического мутагенеза у *Dr. melanogaster* в качестве тест-системы для ускоренного определения канцерогенов. / МЗ СССР. — М., 1982.
9. Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах: Методические указания. — М.: Медицина, 1977. — 12 с.
10. Preston R.J., Dean B.J., Galloway S. et al. Mammalian *in vivo* cytogenetic assays. Analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells// *Mutation Research*, 1987, 189, 157–165.
11. Оценка мутагенной активности химических веществ микроядерным методом (методические рекомендации). — М., 1984, 17 с.
12. Hayashi M., MacGregor J.T., Gatehouse D.G. et al. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay: II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing and automated scoring // *Environ Mol Mutagen.*, 2000, 35, 234–252.
13. Mavournin K.H., Blakey D.H., Cimino M.C. et al. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program // *Mutat Res*, 1990, 239, 29–80.
14. Ehling U.H., Machemer L., Buselmaier W., Dýcka J., Frohberg H., Kratochvilova J., Lang R., Lorke D., Müller D., Peh J., Röthrborn G., Roll R., Schulze-Schencking M., Wiemann H.// Standard protocol for the dominant lethal test on male mice set up by the work group «Dominant Lethal Mutations of the ad hoc Committe Chemogenetics» // *Arch Toxicol*. 1978, 39, 173–185.
15. Оценка мутагенности новых лекарственных средств: Методические рекомендации. М., 1994. — 20 с.
16. Метод учета хромосомных aberrаций как биологический индикатор влияния факторов внешней среды на человека: Методические рекомендации. — М., 1994. — 32 с.

17. Chuang C.H., Hu M.L. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay *in vivo* and white blood cells for *in vitro* assay // *Mutat Res.*, 2004; 564, 75–82.
18. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. — М., 2006. — 27 с.
19. Collins A.R., Oscoz A.A., Brunborg G. et al. The comet assay: topical issues // *Mutagenesis* 2008, 23(3):143–151.

ГЛАВА 6

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ ДНК-ПОВРЕЖДЕНИЙ МЕТОДОМ ЩЕЛОЧНОГО ГЕЛЬ-ЭЛЕКТРОФОРЕЗА ОТДЕЛЬНЫХ КЛЕТОК В ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

*Составители: член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев; д. м. н., проф. В.А. Меркулов;
к. б. н. А.К. Жанатаев; к. м. н. В.А. Никитина, к. м. н. Е.С. Воронина;
академик РАМН С.Б. Середенин*

Введение

Использование биомаркеров при доклинической оценке токсичности, изучении патогенетических механизмов и механизмов формирования фармакологических эффектов приобретает все большее распространение [1]. Целостность ДНК, регистрируемая методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток (метод ДНК-комет), является одним из наиболее перспективных биомаркеров. Его применение обосновывается современными представлениями о ведущей роли первичных ДНК-повреждений в нарушениях клеточной пролиферации, дифференцировки, гибели клеток и мутагенезе, т.е. процессах, лежащих в основе развития патологий любого генеза, и примерах успешного применения в сфере медико-биологических исследований [2–8].

В настоящих рекомендациях изложены методические основы и особенности проведения исследований по оценке ДНК-повреждений в системах *in vitro* и *in vivo* с использованием метода ДНК-комет (comet-assay).

1. Общие положения

Метод основан на регистрации подвижности в электрическом поле ДНК и/или фрагментов ДНК клеток, заключенных в агарозный гель [9, 10]. Процедура проведения метода включает получение гель-слайдов (подложки), получение микропрепаратов клеток, лизис, щелочную денатурацию, электрофорез, нейтрализацию/фиксацию, окрашивание и микроскопический анализ [9]. Для получения гель-слайдов используют стандартные предметные стекла, которые покрывают 1% агарозным гелем. Исследуемые клетки вносят в агарозный гель и наносят на подготовленные гель-слайды. После затвердевания геля клетки подвергают лизису, в процессе которого происходит диссоциация клеточных структур и выпетливание хроматина в поры агарозы. Препараты подвергаются щелочной денатурации ($\text{pH} > 13$), в результате которой щелочно-лабильные сайты в ДНК реализуются в одностранные разрывы. При электрофорезе под влиянием электрического поля ДНК в виде петель и отдельных фрагментов мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы (рис.1), параметры которого зависят от количества разрывов в исследуемой ДНК. После завершения щелочного электрофореза микропрепараты нейтрализуют/фиксируют, окрашивают и микроскопируют под флуоресцентным микроскопом. Измерения могут быть выполнены визуально, непосредственно под микроскопом, либо с сохраненных цифровых изображений. Использование компьютерного анализа цифровых изображений расширяет исследовательские возможности метода. В этом случае могут быть измерены также такие показатели, как общее содержание ДНК в ДНК-комете и процентное содержание в хвосте кометы. Преимуществами метода является высокая чувствительность, дифференцированная оценка ДНК-

повреждений на уровне отдельных клеток, минимальное количество материала для исследования, применимость к любым типам клеток, содержащих ДНК. Метод обладает приемлемой стоимостью и пропускной способностью, но вместе с тем требует высококвалифицированного подхода к проведению [11].

2. Проведение тестов

2.1. Тесты *in vitro*

2.1.1. Клеточные культуры

Для оценки генотоксических свойств соединений *in vitro* методом ДНК-комет в качестве тест-объекта используют традиционно применяемые в генотоксикологических исследованиях клетки первичных и перевиваемых клеточных культур животных и человека: лимфоциты периферической крови и фибробласты человека, гепатоциты грызунов, перевиваемые клетки китайского хомячка (CHL, V79, CHO), клетки мышинной лимфомы L5178Y и др. Среди данных тест-объектов целесообразно использовать лимфоциты периферической крови человека, что обусловлено рядом их преимуществ по сравнению с другими клетками: простота процедуры получения материала; высокая синхронизированность популяций клеток, широкая изученность биологических процессов. Кроме того, лимфоциты периферической крови являются непролиферирующими клетками, что снижает вероятность получения ложноположительных результатов при исследовании соединений, влияющих на синтез ДНК путем нарушения клеточного метаболизма.

2.1.2. Растворители

В качестве растворителя используется деионизированная вода, диметилсульфоксид (ДМСО) или этиловый спирт в конечной концентрации не более 1%. При необходимости допускается использование других растворителей в концентрациях, не вызывающих токсического эффекта. Во всех экспериментах контроля на растворители и растворы исследуемых соединений следует готовить *ex tempore*.

2.1.3. Метаболическая активация

Для метаболической активации используется микросомальная фракция S9 печени крыс, предобработанных АроХлором 1254 или соволом (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 суток до эвтаназии).

2.1.4. Контроли

В качестве негативного контроля используется растворитель, вносимый в эквивалентных объемах. В тестах без метаболической активации в качестве позитивного контроля используют мутагены прямого действия: метилметансульфонат [CAS № 66-27-3], этилнитрозомочевину [CAS № 759-73-9] или 4-нитрохиолин-*N*-оксид [CAS № 56-57-5]. В тестах с метаболической активацией используют непрямые мутагены: бензо[а]пирен [CAS № 50-32-8], диметилбензатрацен [CAS № 57-97-6] или циклофосфамид [CAS № 50-18-0].

2.1.5. Исследуемые концентрации

Исследование начинают с определения цитотоксичности *in vitro*. В качестве максимальной исследуемой концентрации принимается $1/2 LC_{50}$. Если $1/2 LC_{50}$ превышает 10 мМ, то в качестве максимальной концентрации принимается последняя. Две последующие концентрации для исследования составляют $1/10$ и $1/100$ от максимальной. Принимая во внимание возможность увеличения токсичности соединения при его биотрансформации, оценку токсичности проводят параллельно в условиях с метаболической активацией.

2.1.6. Проведение эксперимента

2.1.6.1. Выделение лимфоцитов

Для исследования кровь берут у здоровых доноров в возрасте от 20 до 40 лет, не работающих в сфере химического производства, не контактирующих с источниками ионизирующего излучения, не болевших за последние 3–6 месяцев вирусными заболеваниями и не проходивших за последние 6 месяцев рентгенодиагностическое обследование. Из локтевой вены асептически отбирают около 2 мл крови и переносят в стерильные пробирки, содержащие 200 мкл раствора гепарина (250 МЕ/мл). Возможно также использование коммерчески доступных готовых систем забора крови, содержащих антикоагулянт. Цельную кровь смешивают с равным объемом среды RPMI-1640 (без L-глутамина) и осторожно наслаивают на 3 мл градиентной смеси фиколла Ficoll-Paque (или аналогичную) плотностью 1,077 и центрифугируют при 400 g в течение 40 мин. Образующее на разделе фаз «кольцо» из мононуклеаров аккуратно отбирают пипеткой и дважды отмывают средой RPMI-1640 центрифугированием при 400 g в течение 10 мин. После второй отмывки осадок разводят в среде RPMI-1640 до концентрации клеток $1-5 \times 10^5$ /мл и помещают до использования в холодильник при 4 °С.

2.1.6.2. Оценка токсичности

При оценке токсичности жизнеспособность клеток определяют методом комбинированной окраски этидиум бромидом и акридиновым оранжевым.

Готовится $100 \times$ стоковый раствор красителей. 50 мг этидиум бромид и 15 мг акридинового оранжевого растворяют в 1 мл 95% этилового спирта. Добавляют 40 мл деионизированной воды, хорошо перемешивают, делят на аликвоты по 1 мл, замораживают и хранят при -20 °С.

Готовится рабочий раствор красителей, для чего 10 мкл стокового раствора разводят в 990 мкл ФСБ. Полученный рабочий раствор хранится в течение месяца при 4 °С в защищенном от света месте.

В микроцентрифужные пробирки с 350 мкл среды RPMI-1640 вносят 100 мкл суспензии лимфоцитов и 50 мкл раствора исследуемого соединения соответствующей концентрации и инкубируют в течение 3 ч при 37 °С. Параллельно ставят контроль с растворителем. Аналогично проводят тест с метаболической активацией. Фракцию S9 вносят в реакционную среду в конечной концентрации 2%.

По окончании инкубации 25 мкл суспензии клеток переносят в микроцентрифужные пробирки, добавляют 25 мкл рабочего раствора красителей и инкубируют при 37 °С в течение 5 мин. 25 мкл клеточной суспензии наносят на предметные стекла и накрывают покровным стеклом (25×25 мм). Препараты анализируют на флуоресцентном микроскопе с набором фильтров для FITC. На каждые 100 клеток подсчитывается количество живых (зеленая флуоресценция) и мертвых (оранжевая флуоресценция в ядре) клеток.

2.1.6.3. Процедура тестирования

Тестирование параллельно ведут с использованием микросомальной фракции S9 и без нее, для регистрации действия как прямых мутагенов, так и непрямых, активность которых связана с образованием генотоксичных метаболитов. В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный и позитивный контроли. Для исключения случайностей методического плана и вариантов с резко измененной индивидуальной чувствительностью каждый эксперимент рекомендуется проводить в двух повторностях на лимфоцитах двух разных доноров.

В микроцентрифужные пробирки с 700 мкл среды RPMI-1640 вносят 200 мкл суспензии лимфоцитов и 100 мкл раствора исследуемого соединения соответствующей концентрации и инкубируют в течение 3 ч при 37 °С. Параллельно ставят контроль с растворителем. В исследованиях с метаболической активацией инкубационная смесь содержит

600 мкл среды RPMI-1640, 200 мкл клеточной суспензии, 100 мкл раствора исследуемого соединения и 100 мкл микросомальной фракции S9 в конечной концентрации в среде 2%. Для позитивного контроля в исследованиях без метаболической активации в инкубационную среду вносят метилметансульфонат в конечной концентрации 4 мкг/мл, в исследованиях с метаболической активацией — циклофосфамид в конечной концентрации 20 мкг/мл.

По окончании инкубации реакционная смесь центрифугируется при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок ресуспендируют в 1 мл среды RPMI-1640. Центрифугирование повторяют, после удаления надосадочной жидкости клетки ресуспендируют 1 мл охлажденного ФСБ [рН 7.5], содержащего 20 мМ EDTA-Na₂ и 10% ДМСО. Клеточные суспензии до получения микропрепаратов (пункт 3.3.) помещают в холодильник (при 4 °С).

2.2. Тесты *in vivo*

2.2.1. Лабораторные животные

Эксперименты предпочтительно проводить на мелких лабораторных грызунах — мышах или крысах, половозрелых самцах или самках. Во избежание большого разброса в оцениваемых показателях необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не превышает $\pm 10\%$. Ни одна из инбредных линий не выделяется как предпочтительная.

Животных содержат в соответствии с действующими Санитарными правилами по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев), на стандартной диете, при 12-часовом световом режиме, в условиях свободного доступа к воде и пище. Полученные из питомника животные рандомизированно распределяются в группы по 5–10 особей и до использования в эксперименте проходят карантин и акклиматизацию в течение 10–14 дней.

Каждая контрольная и получающая ЛС группа должна содержать не менее 5 особей. При наличии на момент исследования данных об отсутствии существенных межполовых различий в токсических эффектах исследуемого соединения эксперименты проводят на животных одного пола. В противном случае исследование следует проводить на животных обоих полов.

2.2.2. Растворители

Исследуемые соединения растворяют в деионизированной воде или физиологическом растворе. Водонерастворимые соединения вводят с Твином-80 или используют в качестве растворителя 1% раствор этилового спирта или ДМСО. Для перорального введения водонерастворимых соединений предпочтительно использовать 1% водную суспензию крахмала или растительное масло (оливковое). Применение иных растворителей допускается только при надлежащем обосновании и при условии отсутствия у них в применяемых концентрациях токсических эффектов и химического взаимодействия с исследуемым соединением. Все растворы и суспензии необходимо готовить непосредственно перед применением.

2.2.3. Контроли

В качестве негативного контроля используют животных, которым вводят растворитель в эквивалентных количествах. Животным позитивного контроля вводят соединение, заведомо обладающее выраженным генотоксическим действием, проявляющимся в большинстве органов и тканей и выявляемым с использованием метода ДНК-комет: метилметансульфонат (40–80 мг/кг) [CAS № 66-27-3], *N*-нитрозодиметиламин (80–140 мг/кг) [CAS № 62-75-9], *N*-этил-*N*-нитрозомочевина (15–50 мг/кг) [CAS № 759-73-9]. Ввиду высокой чувствительности метода все манипуляции (способ введения, время экс-

позиции, условия содержания до момента эвтаназии и т.д.) с животными негативного контроля и получающих ЛС групп должны быть идентичными.

2.2.4. Способ введения

Способ введения исследуемого соединения должен соответствовать планируемому пути поступления вещества в организм человека. В большинстве случаев используется пероральный способ введения. Оценка генотоксичности может быть проведена при внутрибрюшинном, внутримышечном, подкожном, ингаляционном и наочном способах введения, а также при введении с кормом или питьевой водой. Максимальный одно-временный объем вводимого раствора или соответствующего растворителя зависит от массы тела животного и определяется из расчета не более 20 мл/кг при пероральном и внутрибрюшинном введениях, не более 10 мл/кг при внутримышечном и подкожном. За исключением соединений, обладающих раздражающим действием или едких при высоких концентрациях, разница во вводимых объемах растворов для всех используемых доз соединения должна быть минимальна.

2.2.5. Исследуемые дозы

Препарат исследуют в дозах, соответствующих ЭД₅₀, 10 и 100 ЭД₅₀, но не выше 1/2 ЛД₅₀. Если ЭД₅₀ не определено, соединение испытывается в трех дозах при однократном введении: в наивысшей дозе, соответствующей 1/10–1/5 ЛД₅₀, и более низких дозах с десятикратным интервалом между ними. В случае если токсичность исследуемого соединения настолько мала, что дозу ЛД₅₀ невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы определяется 2000 мг/кг.

2.2.6. Схема эксперимента

Приемлемы схемы экспериментов с однократным и многократным введением исследуемого соединения. Эксперименты проводят при однократном введении исследуемого соединения. Животные подвергаются эвтаназии через 3–6 и 18–24 ч после введения. Более короткая экспозиция (<3 ч) оправдана для нестабильных, быстро абсорбируемых и метаболизируемых соединений, более длительная экспозиция (>24 ч) — для соединений, требующих большего времени для биотрансформации. При получении позитивного результата при одном из сроков экспозиции эксперименты далее не проводятся. Целью многократного введения является оценка генотоксического действия соединений, обладающих кумулятивным эффектом. В этом случае исследуемое соединение вводится ежедневно в течение 7–14 дней. Животные подвергаются эвтаназии через 3 ч после последнего введения.

2.2.7. Выбор органов и тканей для анализа

При выборе органов/тканей для анализа в первую очередь необходимо ориентироваться на данные о токсикокинетических и токсикодинамических свойствах исследуемого соединения, а также на планируемый путь поступления вещества в организм человека. В частности, для ингаляционных форм основным органом-мишенью для анализа служат легкие, для адсорбентов, не способных всасываться в кровь из ЖКТ, — толстая кишка. При отсутствии таких данных анализ проводят в следующих органах/тканях: а) в печени, являющейся основным органом биотрансформации ксенобиотиков; б) в костном мозге, являющемся активно пролиферирующей тканью, клетки которой находятся на разных стадиях клеточного цикла; в) в клетках крови, осуществляющей транспорт ксенобиотиков и/или их метаболитов; г) в толстой кишке — органе-мишени для веществ и/или их метаболитов, выводимых из организма через ЖКТ; д) в головном мозге, являющемся высокочувствительным к действию непрямым генотоксикантов; е) в мочевом пузыре — органе, в котором ксенобиотики и/или их метаболиты задерживаются перед выведением из организма и могут подвергаться биотрансформации.

2.2.8. Выделение клеток

Выделение клеток является одним из ключевых моментов при методе ДНК-комет в экспериментах *in vivo* [9, 11]. Длительные манипуляции при получении суспензии клеток могут приводить к искажению результатов вследствие продолжающихся в клетках процессов, в частности, ДНК-репарации. Исходя из этого, целесообразно использовать методы выделения клеток, требующие минимального времени, но вместе с тем позволяющие получать приемлемой чистоты клеточные суспензии. Не рекомендуется использование методов ферментативной обработки протеазами (трипсин и/или коллагеназа), которые приводят к увеличению спонтанного уровня ДНК-повреждений при выделении клеток, за исключением случаев, когда не применимы иные методы. Ниже приведены рекомендуемые методики получения клеточных суспензий различных органов/тканей.

Методом цервикальной дислокации животное подвергают эвтаназии, вскрывают и по возможности быстро выделяют анализируемые органы/ткани. Кровь отбирают в микропробирки, содержащие 20 мкл 100 мМ раствора EDTA-Na₂. Печень, почки, легкие и головной мозг (150–200 мг ткани) измельчают на льду, переносят в стеклянные пробирки с 3 мл охлажденного до 4 °С ФСБ [рН 7,5], содержащего 20 мМ EDTA-Na₂ и 10% ДМСО, дважды отмывают от клеток крови и интенсивно раздавливают в новой порции буфера. Пробирки выдерживают 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов ткани, после чего 1,5 мл верхнего слоя переносят в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок клеток разводят в 1 мл охлажденного буфера. Бедренные кости очищают от мышц, срезают эпифизы и вымывают клетки костного мозга 3 мл (по 1,5 мл на кость) того же буфера. 1,5 мл суспензии клеток переносят в микроцентрифужную пробирку и центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок клеток разводят в 2 мл охлажденного ФСБ. Органы ЖКТ (пищевод, преджелудок, желудок, тонкая и толстая кишка) выворачивают слизистой оболочкой наружу и тщательно промывают в охлажденном ФСБ. Образцы помещают на лед, аккуратно разрезают вдоль, соскабливают скальпелем слизистую, переносят в пробирку с 1,5 мл буфера и гомогенизируют. Гомогенат центрифугируют при 1000 g 10 мин, супернатант удаляют и осадок ресуспендируют в 1,5 мл ФСБ. Центрифугирование повторяют, после удаления супернатанта осадок ресуспендируют в 500 мкл буфера. Мочевой пузырь вскрывают, промывают в ФСБ, гомогенизируют в 0,5 мл того же буфера, центрифугируют при 1000 g 10 мин, супернатант удаляют и осадок ресуспендируют в 250 мкл буфера. С семенников удаляют оболочку, выделяют семенные каналы и тщательно промывают в 5 мл ФСБ. Буфер удаляют, семенные каналы раздавливают в 3 мл свежего буфера и интенсивно встряхивают. Пробирки выдерживают 5 мин при комнатной температуре для осаждения крупных фрагментов семенных канальцев, после чего верхний слой жидкости переносят в микроцентрифужные пробирки и центрифугируют при 1000 g в течение 10 мин. Супернатант удаляют, осадок клеток разводят в 1 мл охлажденного ФСБ. Клеточные суспензии доводят до конечной концентрации клеток $(1-5) \times 10^5$ /мл и до получения микропрепаратов помещают в холодильник (при 4 °С).

2.3. Получение и анализ микропрепаратов

2.3.1. Буферы и растворы

— Лизирующий раствор. Готовится основной лизирующий раствор — 10 мМ Tris-HCl [рН 10], 2,5 М NaCl, 100 мМ EDTA-Na₂. Раствор хранится при комнатной температуре не более месяца. Непосредственно перед экспериментом готовится рабочий лизирующий раствор путем добавления к основному лизирующему раствору Triton X-100 и ДМСО до конечных концентраций 1 и 10% соответственно. Раствор перед использованием охлаждают до 4 °С.

— Раствор для электрофореза. Готовятся основные 10 М раствор NaOH (раствор А) и 200 мМ раствор EDTA-Na₂ (раствор Б). Растворы хранятся при комнатной темпера-

туре не более двух месяцев. Непосредственно в день эксперимента готовится рабочий раствор для электрофореза — 300 мМ NaOH, 1 мМ EDTA-Na₂, (pH>13). Раствор перед применением охлаждают до 4 °С.

- Раствор для фиксации. 70% раствора этилового спирта.
- SYBR Green I (10000× в 50% глицерине).
- TE-буфер. 10 мМ Tris-HCl [pH 7,5], 1 мМ EDTA-Na₂.

2.3.2. Подготовка геле-слайдов

Используются традиционно применяемые в световой микроскопии предметные стекла с шероховатой на ¼ поверхность. Во избежание искажений фона флуоресценции не рекомендуется использование полностью шероховатых стекол. На водяной бане готовят 1 % раствор универсальной агарозы ($T_{пл} < 65\text{ °С}$). Прозрачность полученного агарозного геля контролируют на свету. Не рекомендуется использование для плавления агарозы микроволновой печи. На поверхность плитки, нагретой до 65 °С, кладут предметные стекла так, чтобы вся не шероховатая поверхность находилась на поверхности плитки. На плитку также ставят флакон с агарозным гелем. 150 мкл агарозного геля дозатором наносят на край стекла противоположный шероховатому. Наконечником дозатора плашмя растягивают гель по всей не шероховатой поверхности и на 3–5 мм по шероховатой. Обязательно контролируют полное заполнение всей поверхности агарозой. Не допускается образование пузырей. После затвердевания агарозы (1–2 ч) на шероховатой поверхности делается пометка (только грифельным карандашом) для запоминания локализации слоя агарозы. Гель-слайды хранят в сухом темном месте.

2.3.3. Получение микропрепаратов и геле-электрофорез

Проводится подготовка рабочих растворов в соответствии с пунктом 3.3.1. Готовится 1 % раствор легкоплавкой агарозы ($T_{пл} < 42\text{ °С}$) в ФСБ. Полученный гель разливают на аликвоты по 240 мкл в микроцентрифужные пробирки, помещенные в микротермостат при 42 °С. На подготовленные предметные стекла с агарозой грифельным карандашом по шероховатой поверхности наносится шифр. Стекла раскладывают на плитке с нагретой до 42 °С поверхностью. В микроцентрифужные пробирки с агарозным гелем вносят 60 мкл клеточной суспензии (аналогично 60 мкл цельной крови) и 2–3 раза прокачивают дозатором. В центральную часть нагретого на плитке предметного стекла наносят 60 мкл полученного агарозного геля с клетками и накрывают покровным стеклом под углом так, чтобы не было пузырей. Предметные стекла кладут на поверхность емкости со льдом и оставляют на 10 мин для затвердевания геля. Аккуратно снимают покровные стекла (тянут за край) и предметные стекла помещают в стеклянную кювету (тип Шиффендеккер).

Далее все манипуляции проводят только в затемненном помещении при свете желтой или зеленой лампы.

В кювету с предметными стеклами заливают предварительно охлажденный до 4 °С лизирующий раствор, накрывают кювету фольгой и помещают в холодильник. Проводят лизис не менее 1 ч. Допускается нахождение препаратов в лизирующем растворе до 24 ч. По окончании лизиса стекла вынимают из раствора, дают стечь жидкости под углом и раскладывают на поверхности камеры для горизонтального электрофореза. Стекла должны лежать точно перпендикулярно краю емкости шероховатым краем в сторону минуса, не шероховатым — плюса. Камеру заполняют раствором для электрофореза на 2–3 мм выше поверхности предметных стекол. Стекла не должны изменить положение при внесении жидкости для электрофореза. Микропрепараты выдерживают 20 мин без включенного аппарата для электрофореза. Проводят электрофорез в течение 20 мин при напряженности поля 1 В/см и силе тока ~300 мА. Параметры электрофореза регулируются добавлением или удалением электрофорезного раствора при включенном аппарате. По окончании электрофореза удаляют из углублений камеры большую часть раствора для электрофореза так, чтобы показались стекла. Пинцетом вытаскивают стекла, дают

стечь жидкости под углом и помещают в стеклянную кювету и заливают раствором для фиксации. Проводят фиксацию в течение 15 мин. Микропрепараты высушивают при комнатной температуре (1–2 ч) и хранят до анализа в сухом темном месте.

2.3.4. Окрашивание и микроскопический анализ

Для окраски микропрепаратов используются флуоресцирующие красители, применяемые для визуализации ДНК — этидийм бромид или пропидийм иодид, 4,6-диамидино-2-дифенилиндол (DAPI), SYBR Green I, YOYO-1 или акридиновый оранжевый. При анализе ДНК-комет с использованием программно-аппартного комплекса рекомендуется использование красителя SYBR Green I, позволяющего получить с микропрепаратов яркие высококонтрастные изображения. Готовят рабочий раствор SYBR Green I. Для этого 1 мкл концентрата красителя разводят в 10 мл охлажденного ТЕ-буфера. Рабочий раствор хранится не более 2 недель при 4°C в защищенном от света месте. 200 мкл рабочего раствора красителя наносят на половину предметного стекла и проводят окраску в течение 20 мин. По окончании окраски остающийся на микропрепаратах краситель не удаляется.

Микропрепараты анализируют на эпифлуоресцентном микроскопе с соответствующими для конкретного красителя фильтрами (при окраске SYBR Green I используются фильтры для FITC) при увеличении $\times 200$ –400. Перед проведением анализа микропрепараты шифруют двойным слепым методом. На каждый микропрепарат рандомизированно анализируют не менее 100 ДНК-комет без наложений хвостов. В анализ не включают апоптотические клетки, выявляемые на микропрепаратах в виде слабофлуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным «хвостом» и практически отсутствующей «головой», так называемые «ежики» (hedgehogs) [11] (рис. 1).

Программно-аппаратный комплекс для анализа ДНК-комет включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную ССD-камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет [13]. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров ДНК-комет проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК используют показатели: длина хвоста, процентное содержание ДНК в хвосте (% ДНК в хвосте) или их произведение — момент хвоста (tail moment). Принимая во внимание, что показатель длины хвоста ДНК-комет в значительной степени зависит от экспериментальных условий (плотность агарозы, напряженность электрического поля, температура электрофорезного буфера и т.д.), для повышения воспроизводимости результатов, а также возможности сопоставления данных между исследователями и лабораториями, рекомендуется использовать при оценке ДНК-повреждений показатель % ДНК в хвосте.

При визуальном анализе ДНК-кометы ранжируются на пять условных типов (рис.1) с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4. Степень поврежденности ДНК при этом выражается как индекс ДНК-комет (ИДК), определяемый по формуле:

$$\text{ИДК} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

где n_0 – n_4 — число ДНК-комет каждого типа, Σ — сумма подсчитанных ДНК-комет.

2.4. Оценка результатов

2.4.1. Тесты *in vitro*

Статистическую оценку результатов проводят по каждой экспериментальной точке путем сравнения показателей поврежденности ДНК в получающих ЛС и контрольной группах с использованием непараметрических **критерия Даннета** (% ДНК в хвосте, момент хвоста, длина хвоста) или **критерия Краскела-Уоллиса** (индекс ДНК-комет).

Данные двух повторностей объединяются и определяется среднее, если 95% доверительные интервалы перекрываются. Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки. Позитивный результат в данном тесте указывает на то, что исследуемое соединение индуцирует ДНК-повреждения в данном типе клеток в условиях *in vitro*.

2.4.2. Тесты *in vivo*

Статистическую оценку результатов проводят по каждому органу путем сравнения среднегрупповых показателей поврежденности ДНК в получавших ЛС и контрольной группах с использованием непараметрических **критерия Даннета** (%ДНК в хвосте, момент хвоста, длина хвоста) или **критерия Краскела-Уоллиса** (индекс ДНК-комет). Критерием положительного результата является статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК при одном из сроков экспозиции или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки. Полученный положительный результат свидетельствует о том, что исследуемое соединение проявляет *in vivo* ДНК-повреждающее действие в данном органе-мишени.

Метод ДНК-комет дает, как правило, четкие положительные или отрицательные результаты. При получении неоднозначно трактуемых результатов следует обратить внимание на возможный цитотоксический эффект соединения, свидетельством которого является бимодальное распределение ДНК-комет с низкой и высокой степенью поврежденности ДНК. Кроме того, результаты исследования могут считаться неоднозначными при выявлении генотоксического эффекта соединения в низкой дозе при отсутствии такового в более высоких дозах. В этих случаях исследование необходимо повторить, с параллельной оценкой цитотоксичности соединения.

При получении положительных результатов рекомендуется оценить также орган- и тканеспецифичность ДНК-повреждающего действия соединения, сопоставляя следующие параметры по каждому органу:

- наличие или отсутствие ДНК-повреждающего эффекта;
- минимальная действующая доза;
- наличие и характер дозозависимого эффекта;
- степень превышения эффекта в группе получавших ЛС по сравнению с контрольной.

2.5. Отчетность

2.5.1. Тесты *in vitro*

Результаты исследований документируются согласно таблице 1.

Таблица 1

Результаты оценки ДНК-повреждающей активности соединения *in vitro* методом ДНК-комет

Условия эксперимента (вещество, концентрация)	Количество жизнеспособных клеток (%)		Количество проанализированных клеток		Показатель (%ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)		Средний показатель по двум повторам	Уровни значимости
	п1*	п2	п1	п2	п1	п2		
1	2	3	4	5	6	7	8	9

* — повторность

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Протокол предоставления результатов оценки ДНК-повреждающей активности соединения *in vitro* методом ДНК-комет

Название эксперимента _____
Тест-объект _____
Вещество:
название _____
формула, № по CAS, физико-химические свойства _____
откуда получено _____ чистота _____
растворитель _____
позитивный контроль _____
Анализ литературных данных:
Схема проведения эксперимента:
дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
концентрации _____
количество повторностей на концентрацию _____
система метаболической активации _____
проведения методики и анализа микропрепаратов _____
Полученные результаты _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы _____
Заключение по соединению _____
Исполнители _____
Дата сдачи отчета _____

2.5.2. Тесты *in vivo*

Результаты исследований документируются согласно таблице 2.

Таблица 2

Результаты оценки ДНК-повреждающей активности соединения методом ДНК-комет на млекопитающих *in vivo*

Условия эксперимента (вещество, доза)	№ животного	Проанализировано клеток	Показатель (% ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)	Средний показатель по группе	Уровни значимости
1	2	3	4	5	6

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Протокол предоставления результатов оценки ДНК-повреждающей активности соединения методом ДНК-комет на млекопитающих *in vivo*

Название эксперимента _____
Животные
вид _____ линия _____
пол _____ масса _____
питомник _____
дата получения _____
количество _____

Вещество:
название _____
формула, № по CAS, физико-химические свойства _____
откуда получено _____ чистота _____
растворитель _____
позитивный контроль _____
Анализ литературных данных:
Схема проведения эксперимента:
дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
путь введения _____ дозы _____
обоснование выбора доз _____
длительность, кратность введения _____
группы _____
Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____
Полученные результаты _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы _____
Заключение по соединению _____
Исполнители _____
Дата сдачи отчета _____

2.6. Оценка ДНК-повреждений в клетках периферической крови здоровых доноров и леченых больных

Практика генотоксикологических исследований показывает, что нередко возникают ситуации, когда в отдельных тестах получают неоднозначные, но воспроизводимые результаты. В этих случаях на заключительных этапах КИ проводят оценку уровня хромосомных aberrаций в лимфоцитах периферической крови больных, подвергавшихся лечению ЛП. Метод ДНК-комет может явиться важным дополнительным тестом, поскольку позволяет провести оценку во всех типах клеток крови, являющихся потенциальной мишенью генетических эффектов фармакологического средства. Использование цельной крови исключает длительные манипуляции с исследуемыми клетками, что снижает вероятность артефактного повреждения ДНК *ex vivo* и повышает точность анализа [14].

2.6.1. Процедура тестирования

Взятие крови у каждого больного проводят дважды — до начала лечения препаратом и не позднее 24-х ч после завершения курса лечения. Количество больных в группе составляет 12–15 человек вне зависимости от пола и возраста. Из исследования исключают больных, подвергшихся рентгенодиагностическим процедурам или терапии препаратами, заведомо обладающими ДНК-повреждающими свойствами.

Венозную кровь асептически отбирают в стерильные пробирки, содержащие антикоагулянт. Процедура получения и анализ микропрепаратов ДНК-комет клеток периферической крови человека идентичны описанным выше, за исключением пункта 3.3.3., где цельную кровь вносят в агарозный гель из расчета 40 мкл крови на 500 мкл геля. При необходимости допускается замораживание образцов. Для этого цельную кровь смешивают в соотношении 1:1 со средой RPMI-1640, содержащей 10% ДМСО и 20 мМ EDTA-Na₂, замораживают и хранят в криопробирках при –70 °С не более 2 месяцев. Непосредственно перед получением микропрепаратов образцы размораживают в водяной бане при 37 °С в течение 1–2 мин и проводят эксперимент с пункта 3.3.3. Время с момента взятия крови до получения микропрепаратов или замораживания образцов не должно превышать 3 ч. Во всех случаях временные интервалы должны быть по возможности унифицированы.

2.6.2. Оценка результатов

Статистическую оценку результатов проводят путем сравнения показателей ДНК-повреждений у больных до и после лечения с использованием **критерия Уилкоксона** для разности пар. Позитивный результат указывает на то, что исследуемое фармакологическое средство индуцирует ДНК-повреждения в клетках периферической крови человека.

Дополнительно к основному анализу проводят регистрацию ДНК-комет апоптотических клеток (пункт 3.3.4.) с целью определения потенциальной апоптогенной активности исследуемого препарата. Рекомендуется также провести сравнительную оценку показателей у больных до и после лечения с референсными показателями для здоровых людей [15].

2.6.3. Отчетность

Данные о больных и индивидуальных показателях ДНК-повреждений, определенных до и после лечения, документируются согласно таблице 3.

Таблица 3

Данные о больных и индивидуальных показателях ДНК-повреждений, определенных до и после лечения

№ п/п	Ф.И.О. больного	Диагноз	№ больницы, отделения	Условия взятия крови	Дата взятия крови	№ образца крови	Шифр микропрепарата	Проанализировано клеток	Показатель (%ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
				до лечения					
				после лечения					

Обобщенные результаты исследования приводят согласно таблице 4.

Таблица 4

Обобщенные результаты исследования

Условия	Количество больных	Проанализировано клеток	Средний показатель по группе (%ДНК, индекс ДНК-комет и т.д.)	Уровни значимости
До лечения				
После лечения				

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Протокол предоставления результатов оценки методом ДНК-комет ДНК-повреждающей активности лекарственного препарата в клетках крови леченых больных

Дата проведения исследования (начало, окончание, отдельные исследования) _____

Данные о больных (лечебное учреждение, диагноз, длительность заболевания, возраст и т.д.) _____

Лекарственный препарат:

Название _____

Производитель _____
Длительность применения, дозы _____
Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____
Полученные результаты _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы _____
Заключение по препарату _____
Исполнители _____
Дата сдачи отчета _____

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Дурнев А.Д., Середенин С.Б. // Мутагены: скрининг и фармакологическая профилактика воз- действий. — М.: Медицина, 1998. — 328 с.
2. Su TT. Cellular responses to DNA damage: one signal, multiple choices // Annu Rev Genet. 2006; 40:187–208.
3. Mercer J., Mahmoudi M., Bennett M. DNA damage, p53, apoptosis and vascular disease // Mutat. Res. 2007, 621(1-2):75–86.
4. Kulkarni A, Wilson DM. The involvement of DNA-damage and -repair defects in neurological dysfunction // Am J Hum Genet., 2008; 82(3):539–66.
5. de Villartay J.P., Fischer A., Durandy A. The mechanisms of immune diversification and their disorders // Nature Rev. Immunol., 2003; 12:962–72.
6. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки гено- токсических свойств природных и синтетических соединений: Методические рекомендации. — М., 2006. — 27 с.
7. Speit G., Hartmann A. The comet assay — a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: D.S. Henderson (Ed.), Methods in Molecular Biology, vol. 113, DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems, 2nd ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006, pp. 275–286.
8. Dusinska M., Collins A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions // Mutagenesis, 2008, Mar.7, pp. 1–15.
9. Collins AR, Oscoz AA, Brunborg G et al. The comet assay: topical issues // Mutagenesis 2008, 23(3):143–151.
10. Klaude M., Eriksson S., Nygren J. and Ahnrtrom G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. Mutation Research, 1996, 363:89–96.
11. Hartmann A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. Mutagenesis, 2003, v.18, 1:45–51.
12. Hartmann A. et al. Use of *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations. Mutagenesis, 2004, 19:51–59.
13. Konca K., Lankoff A., Banasik A. A cross-platform public domain PC image-analysis program for the comet assay / Mutation Research, 2003, 534(1–2): 15–20.
14. Chuang C.H., Hu M.L. Use of whole blood directly for single-cell gel electrophoresis (comet) assay *in vivo* and white blood cells for *in vitro* assay / Mutat. Res. 2004; 564(1): 75–82.
15. Moller P. Assessment of reference values for DNA damage detected by the comet assay in human blood cell DNA / Mutat. Res. 2006, 612(2):84–104.

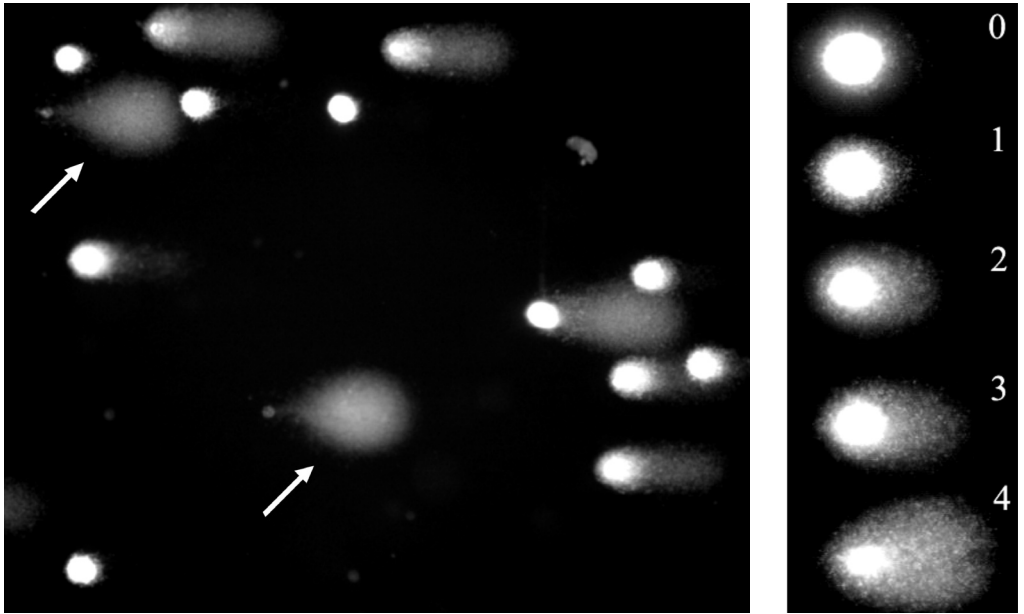


Рис.1. Слева: Цифровое изображение препарата ДНК-комет. Стрелками указаны ДНК-кометы апоптотических клеток. Справа: ДНК-кометы клеток с различной степенью поврежденности ДНК. Указаны числовые значения для каждого типа ДНК-комет, используемые при визуальном анализе микропрепаратов

ГЛАВА 7

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОЦЕНКЕ КАНЦЕРОГЕННОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В КРАТКОСРОЧНЫХ ТЕСТАХ

Составители: д. м. н., проф. Г.А. Белицкий; член-корр. РАМН, проф. А.Д. Дурнев; д. б. н., проф. Ю.А. Ревазова; д. м. н., проф. В.А. Меркулов; д. б. н. С.К. Абилев; д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; д. м. н. О.Л. Верстакова; член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова; д. м. н., проф. В.С. Журков; д. б. н. Л.П. Сычева, к. б. н. А.К. Жанатаев

Введение

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.

1. Общие положения

КСТ для выявления потенциальной канцерогенности основаны на современных данных о механизмах химического канцерогенеза [2, 3]. Полный объем понятия «канцерогенные соединения» включает в себя все вещества, способные увеличивать в популяции количество опухолей различных локализаций по сравнению с соответствующим контролем. Сюда входят не только полные канцерогены, способные вызывать опухоли без дополнительных воздействий, но также иницирующие агенты, промоторы и коканцерогены. Процесс химического канцерогенеза в настоящее время условно подразделяют на две стадии: инициацию и промоцию. На первой в генетическом аппарате клетки возникают стойкие изменения; во второй, в основном за счет эпигенетических эффектов, создаются условия для преимущественной пролиферации трансформированных клеток. На стадии инициации наиболее существенным событием является повреждение ДНК высокорепликативными метаболитами канцерогенов, которое приводит к возникновению точечных мутаций, перестановке блоков генов и т.д. Предполагается, что в тех случаях, когда эти события затрагивают протоонкогенные участки, последние могут активироваться и иницировать злокачественную трансформацию клетки. К такому же результату приводит инактивация генов-супрессоров (ангионкогенов). Высокая степень причинной связи между мутагенезом и канцерогенезом, а также высокая частота совпадения канцерогенных и мутагенных свойств среди различных химических соединений привели к созданию многочисленных тестов, в которых показателем предполагаемой бластомогенной

активности служит способность вызывать повреждения ДНК, генные и хромосомные мутации.

Промоторы в биологически активных концентрациях не повреждают ДНК, а оказывают плейотропное действие на клетки, изменяя, в частности, структуру и функции клеточных мембран, нарушая проницаемость межклеточных контактов. Соответственно, имеются КСТ, предназначенные для выявления этих особенностей.

Одним из интегральных показателей канцерогенной активности агента может служить его способность озлокачивать клетки в культуре, что используется в ряде КСТ.

Для литературного поиска и анализа структурного сходства между фармакологическими веществами и известными канцерогенами используются, во-первых, представительная база данных о мутагенных и канцерогенных свойствах широкого круга химических соединений, и, во-вторых, специальные компьютерные программы. Для анализа взаимосвязи между мутагенной активностью и химической структурой можно использовать программы CASE, MULTICASE и ЭММА.

Настоящие методические рекомендации должны быть пересмотрены через определенное время и модифицированы в соответствии с прогрессом знаний о молекулярных механизмах химического канцерогенеза.

2. Принципы формирования батарей КСТ и минимальная батарея КСТ

Большинство КСТ моделирует отдельные стадии канцерогенеза, поэтому наиболее успешным является их использование в виде батареи, т.е. набора тестов. Подобные батареи должны отвечать ряду требований КСТ, включаемые в одну батарею, должны быть взаимодополняющими, т.е. отличаться или по конечному эффекту (повреждение ДНК, генные мутации, хромосомные aberrации, неопластическая трансформация, нарушение метаболической кооперации и др.), или по уровню биологической организации объекта исследования (прокариоты, эукариоты, системы *in vitro*, *in vivo*). При этом последовательность исследований предполагает движение от простых к сложным и от кратких экспериментов к более длительным.

Отбираемые в батарею тесты должны быть надежно верифицированы на соединениях с известной канцерогенной активностью. По степени верификации различают рутинные, «укоренившиеся» тесты, на которых было исследовано не менее 1000 соединений, «развитые» — не менее 100 и «развивающиеся» — до 100. Эти тесты при приемлемой стоимости и достаточной работоспособности должны быть высокочувствительными, специфичными и обладать большой пропускной способностью.

Для выявления одних и тех же эффектов существует ряд равноценных методов, которые могут взаимозаменяться. В ряде случаев, в зависимости от особенностей тестируемого соединения, одним методам следует отдавать предпочтение перед другими. Таким образом, батарея КСТ не является жестко фиксированной. Действующим началом большинства известных канцерогенов являются высокоактивные метаболиты, поэтому необходимым компонентом ряда КСТ является система адекватной метаболической активации исследуемых препаратов.

Исходя из приведенных соображений и реально освоенных методов, в настоящее время представляется приемлемой следующая минимальная батарея КСТ:

А. 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.

Б. Цитогенетические тесты:

— индукция хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*;

— индукция микроядер в клетках костного мозга млекопитающих *in vivo*.

В. 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 флуориметрии или щелочной элюции.

Г. Тесты на промоторную активность:

— ГФРТ-тест на нарушение метаболической кооперации в смешанной культуре соматических клеток млекопитающих.

Д. Прямые экспресс-тесты, регистрирующие опухолеобразующий потенциал тестируемых веществ:

— тест на трансформацию клеток в культуре или индукцию опухолей у гидробионтов.

3. Правила продвижения исследуемых веществ по батарее КСТ и интерпретация результатов исследований

Результаты исследования препарата в батарее КСТ позволяют сделать заключение о наличии или отсутствии канцерогенных свойств. Это заключение носит вероятностный характер, в сущности, так же, как и предсказание канцерогенной опасности вещества для человека на основании экспериментов по индукции опухолей у животных.

При оценке результатов тестирования исходят из того, что положительный эффект имеет преимущество перед отрицательным, а данные, полученные в экспериментах *in vivo*, более весомы, чем аналогичные, полученные *in vitro*. Согласно этому правилу, интегральный положительный результат системы КСТ с гораздо большей степенью вероятности свидетельствует о потенциальной канцерогенной опасности препарата, чем общий отрицательный результат — о ее полном отсутствии.

С точки зрения прогноза канцерогенности существенное значение имеют результаты, полученные в системе мутагенной оценки при учете генных мутаций (на бактериях и дрозофиле) и/или хромосомных aberrаций (в клетках костного мозга мышей).

При этом могут встречаться 4 варианта сочетаний результатов (табл. 1).

Таблица 1

№ варианта	Положительные (+) и отрицательные (–) ответы при использовании методов учета	
	генных мутаций на бактерии или дрозофиле	хромосомных aberrаций в клетках костного мозга мышей
1	+	+
2	+	–
3	–	+
4	–	–

В случае варианта 1 делается заключение о канцерогенной опасности и препарат не подвергается дальнейшим исследованиям. В остальных трех случаях ставятся уточняющие эксперименты, среди которых наиболее информативен полиорганный учет повреждений ДНК (ДНК-комет) методом щелочного электрофореза *in vivo*. Допустимо также использование репарационного теста на *E. coli* или индукции SOS-ответа у бактерий, регистрация внепланового синтеза ДНК в культуре клеток млекопитающих или повреждений ДНК с помощью щелочной элюции.

С учетом результатов 1 этапа исследований могут получиться следующие варианты сочетаний ответов (табл. 2).

Таблица 2

№ варианта	Положительные (+) и отрицательные (-) ответы при использовании методов учета		
	генных мутаций	хромосомных aberrаций	повреждений ДНК
1	+	-	+
2	+	-	-
3	-	+	+
4	-	+	-
5	-	-	+
6	-	-	-

В случае вариантов 1, 3 и 6 дальнейшие исследования прекращают. В случаях 1 и 3 делается заключение о наличии, а в случае 6 — об отсутствии канцерогенной опасности. Для отдельных групп препаратов (например, гормонов), несмотря на отрицательные ответы во всех трех группах использованных тестов (вариант 6), может оказаться необходимым применение одного из прямых экспресс-тестов на опухолеобразование: трансформацию клеток в культуре или индукцию опухолей у гидробионтов.

В случаях 2, 4 и 5 переходят к следующему этапу исследований. Стратегия работы на этом этапе связана с подтверждением или отрицанием способности исследуемого препарата индуцировать определенный тип генетических эффектов.

В случае варианта 2 (см. табл. 2) проводится дополнительный учет генных мутаций с помощью альтернативного метода, способного зарегистрировать этот тип эффектов. Если на первом этапе был использован, например, учет генных мутаций на бактериях, на данном (третьем) этапе работы применяются методы тестирования генных мутаций на дрозофиле или в культуре соматических клеток млекопитающих и наоборот.

В случае варианта 4 (см. табл. 2) эффект, полученный путем индукции перестроек хромосом или в клетках костного мозга мышей, проверяется на клетках костного мозга крыс.

В случае варианта 5 (см. табл. 2) эффект, полученный с использованием бактерий (репарационный тест на *E. coli* или индукция SOS-ответа), проверяется с помощью методов учета повреждений ДНК в клетках млекопитающих *in vitro* и *in vivo* (метод «ДНК-комет», индукция внепланового синтеза ДНК или учет повреждений ДНК с помощью щелочной элюции).

При получении на данном этапе работы положительного результата в вариантах 2, 4 и 5 делается заключение о возможности наличия у исследуемого агента канцерогенной активности, связанной с индукцией определенного типа генетических эффектов. При получении отрицательного результата переходят к заключительному этапу исследований, связанному с использованием одного из прямых экспресс-тестов определения канцерогенной активности: учет опухолевой трансформации клеток в культуре или индукции опухолей у гидробионтов. Заключение об отсутствии или наличии канцерогенной активности у исследуемого вещества делается на основании соответственно отрицательного или положительного ответа, полученного в одном из этих методов.

Исследования на промоторную активность проводятся не всегда. Они обязательны лишь в случае, если ЛП предназначен для контингентов, ранее экспонированных к иницирующим злокачественный рост воздействиям: ионизирующей радиации, противоопухолевой терапии, лечению пуваленом в комбинации с УФ-облучением по поводу псориаза и др.

4. Краткосрочные скрининговые тесты для прогноза канцерогенности фармакологических препаратов и вспомогательных средств

4.1. Мутационный тест на *Salmonella typhimurium* (тест Эймса)

4.1.1. Термины и определения

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. В данном тесте эти мутации могут происходить или в сайте исходной мутации, или в другом сайте бактериальной хромосомы.

4.1.2. Цель исследования и принцип метода

Данный метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ или их метаболитов индуцировать генные мутации у индикаторных штаммов *Salmonella typhimurium*.

Фармакологические средства с выраженной антибактериальной активностью изучать в тесте Эймса нецелесообразно.

Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метаболической активации или без метаболической активации. 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 гистидин-зависимых штаммов *Salmonella typhimurium* [35].

4.1.3. Процедура тестирования

4.1.3.1. Бактерии

В качестве тестерных организмов используются штаммы *Salmonella typhimurium*. Минимальный набор состоит из штаммов TA97, TA98 и TA100. При необходимости могут использоваться и другие штаммы.

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.

4.1.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 сут до эвтаназии) [1].

4.1.3.3. Изучаемые концентрации

Максимальная концентрация тестируемого соединения определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность тестируемого соединения может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации. Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная концентрация может быть в пределах 1000–5000 мкг на чашку. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная концентрация должна подавлять рост бактерий не более чем на 50%, что определяется либо по уменьшению количества спонтанных ревертантов, либо по подавлению роста

бактериального газона. В любом случае должно проверяться не менее 5 различных концентраций тестируемого соединения, различающихся, например, в 10 раз.

4.1.3.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный (необработанный или растворитель) и позитивный контроли.

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или метилсульфоксид, а при необходимости и другие растворители.

Позитивные контроли должны быть специфичны для каждого тестерного штамма. Позитивный контроль для вариантов с метаболической активацией должен соответствовать типу используемой системы экзогенной метаболической активации.

4.1.3.5. Проведение эксперимента

Необходимые для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные среды и растворы, проведение работ по получению фракции S9, а также регламент работы с бактериальными культурами описаны в литературе.

Исследование параллельно ведут с использованием микросомальной активирующей смеси и без нее для регистрации действия как прямых мутагенов, так и непрямых, активность которых связана с образованием мутагенных метаболитов, учитываемых при работе с микросомальной фракцией.

В контрольных вариантах исследования вместо испытуемого образца вносят соответствующий объем растворителя.

4.1.4. Данные и их представление

4.1.4.1. Обработка результатов

Данные должны быть представлены в виде количества ревертантных колоний на чашку. Как для тестируемого соединения, так и для позитивных и негативных контролей указывается количество колоний в каждой чашке, среднее количество ревертантных колоний на чашку и стандартное отклонение. Если ни в одном из вариантов на данном штамме (штаммах) не получено статистически значимых результатов, эксперимент прекращают. В случае обнаружения позитивного результата исследование повторяют с целью подтверждения эффекта, причем работу ведут только на том штамме (штаммах), на котором был выявлен эффект. Если максимальный эффект зарегистрирован на одной из промежуточных концентраций (такая ситуация возможна при работе с фармакологическими средствами, обладающими бактерицидными свойствами), прибегают к «дроблению» концентраций. При этом за среднюю точку на шкале концентраций исследуемого вещества принимают концентрацию, на которой был выявлен максимальный эффект. В исследование вводят еще 4 варианта: концентрации в 2 и 5 раз меньше и больше средней.

Если при проведении повторного исследования эффект не обнаруживается, проводится еще одно дополнительное исследование, результат которого сравнивают с первыми двумя экспериментами. Заключение о наличии или отсутствии мутагенной активности испытуемого соединения делают на основании двух исследований с совпадающими результатами.

Для оценки результатов тестирования могут использоваться соответствующие статистические методы, например метод попарных сравнений Даннета [Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность, 1989].

4.1.4.2. Оценка результатов

Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное зависящее от дозы увеличение количества ревертантов, или воспроизводимый и статистически достоверный позитивный ответ по крайней мере для одной экспериментальной точки.

Тестируемое соединение, не вызывающее статистически достоверного зависимо от концентрации увеличения количества ревертантов или воспроизводимого и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки, рассматривается как не мутагенное в данном тесте.

Отчет должен включать следующую информацию:

- бактерии: использованные штаммы;
- условия проведения теста: уровни доз и обоснование выбора доз, количество чашек на экспериментальную точку, токсичность, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой культуры;
- среднее количество ревертантных колоний на чашку;
- стандартное отклонение;
- отношения «концентрация—эффект», где возможно.

4.1.4.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение индуцирует генные мутации типа замены пар оснований или сдвига рамки считывания у данного микроорганизма. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение не мутагенно для использованных штаммов *Salmonella typhimurium*.

4.1.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки мутагенной активности вещества в тесте по учету генных мутаций у бактерий

Название эксперимента: _____
Тестерные микроорганизмы: _____
Вид _____
Штаммы _____
Вещество:
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Позитивный контроль _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Способ обработки _____ дозы _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.2. Учет рецессивных сцепленных с полом летальных мутаций дрозофилы

5.2.1. Термины и определения

Летальная мутация — изменение в геноме, проявление которого приводит к смерти его носителя.

Рецессивная мутация — изменение в геноме, которое проявляется в условиях гомозиготности или гемизиготности.

Сцепленные с полом гены присутствуют в половых (X или Y) хромосомах. Обсуждаемый метод определяет мутационные события в X-хромосоме.

5.2.2. Цель исследования и принцип метода

С помощью данного метода проводят оценку способности испытуемого вещества и продуктов его метаболизма индуцировать генные мутации в зародышевых клетках дрозофилы.

Рекомендуемый метод, называемый Меллер-5, основан на индукции исследуемыми лекарствами рецессивных летальных мутаций в X-хромосоме самцов дикого типа линии D-32. Эти мутации передаются через самок F_1 самцам второго поколения, не доживающим до стадии имаго.

5.2.3. Процедура тестирования

5.2.3.1. Используемые линии дрозофилы

Для исследований по учету рецессивных, сцепленных с полом летальных мутаций (РСПЛМ) требуется линия дикого типа с хорошо изученным спонтанным фоном мутабельности, например Canton-S или D-32, а в качестве тестерной линии лучше всего использовать линию BASC: в X-хромосоме мух этой линии имеются 2 инверсии *sc8* и *σ49*, которые полностью исключают возможность кроссинговера между половыми хромосомами, но не нарушают жизнеспособности дрозофилы [6]. Фенотипическими маркерами служат мутации *Apricot* — абрикосовые глаза и *Var* — полосковидные глаза. В подобного рода экспериментах можно использовать и другие тестерные линии.

5.2.3.2. Пути введения и выбор доз

Обычно используют два основных способа введения исследуемых фармакологических средств в организм дрозофилы: ингаляционный и пероральный (с пищей). Чаще всего используют последний, при введении соединения в корм. В этом случае целесообразно использовать стеклянные пористые фильтры, погруженные в бюксы с веществами, растворенными в 1–5% сахарном сиропе в исследуемых концентрациях. Если препарат нерастворим в воде, можно (при обязательном применении соответствующих контролей с растворителями) растворить его в этиловом спирте или диметилсульфоксиде так, чтобы конечная концентрация растворителей в сахарном корме не превышала 2%. Допускается внесение фармакологических средств непосредственно в корм. Ингаляционные затравки осуществляются в эксикаторах. Расчет доз при ингаляционном введении производят на объем эксикатора, а при пероральном — на объем корма.

В зависимости от токсичности фармакологического средства длительность экспозиции может колебаться от нескольких часов до нескольких дней (обычно экспозиция составляет 48–72 ч). Комбинация различных концентраций и экспозиций позволяет ориентировочно определять количество («дозу») фармакологического средства, вызывающую примерно 50%-ную стерильность самцов. Эту «дозу» принимают за максимальную, которую используют в эксперименте. Снижение «дозы» необходимо только в случае исследований фармакологических средств, обладающих выраженным стерилизующим эффектом.

5.2.3.3. Проведение эксперимента

После обработки изучаемым фармакологическим средством самцов линии D-32 скрещивают с виргинными самками тестерной линии BASC (5 самцов × 10 самок). После начала вылета мух первого поколения (F_1) отбирают виргинных гетерозиготных самок и индивидуально скрещивают их с самцами F_1 .

После вылета второго поколения (F_2) каждая культура просматривается визуально с целью обнаружения таких, в которых отсутствуют самцы дикого фенотипа (с красными глазами). Общее количество культуральных пробирок определяет число проанализированных X-хромосом самцов, подвергшихся действию изучаемых соединений. Пробирки, в которых отсутствуют самцы дикого типа, отмечают как «рецессивные летальные мутации». Постановка контролей обязательна [14].

5.2.4. Данные и их представление

Результаты опытов представляют в виде таблицы (табл. 3).

Частоту рецессивных летальных мутаций оценивают как отношение числа культур второго поколения без самцов дикого фенотипа к общему числу культур. Всего необходимо поставить не менее 1000 культур F_2 на одну экспериментальную точку.

Для оценки значимости превышения частоты рецессивных летальных мутаций в опыте над контролем следует применять точный критерий Фишера для таблиц сопряженности 2×2 .

Таблица 3

Учет рецессивных, сцепленных с полом, летальных мутаций на дрозофиле

Препарат/ Концентрация	Экспозиция	Число исследованных культур	Число нефертильных самцов F_2	Рецессивные, сцепленные с полом, летальные мутации		Уровень значимости
				количество	$M \pm m \%$	

5.2.5. Отчетность

Название эксперимента: _____

Линии дрозофилы: _____

Вещество: _____

Название _____

Формула, физико-химические свойства _____

Откуда получено _____

Растворитель _____

Анализ данных литературы: _____

Схема эксперимента: _____

Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____

Способ обработки _____ концентрации _____

Длительность обработки _____

Группы _____

Полученные результаты: _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____

Исполнители: _____

Дата сдачи отчета: _____

5.3. Учет соматической рекомбинации (мозаицизма) у дрозофилы

5.3.1. Термины и определения

Под соматической рекомбинацией понимают обмен генетическим материалом между гомологичными хромосомами соматических клеток в митозе, приводящий к образованию мозаичных особей. При использовании в качестве маркеров рецессивных генов

возможно выявление генных мутаций, делеций, митотических рекомбинаций и генных конверсий.

5.3.2. Цель исследования и принцип метода

Целью данного метода является интегральное выявление рекомбинационных и других мутационных событий, индуцируемых фармакологическим средством или его метаболитами в соматических клетках личинок дрозофилы. В основе метода лежит учет мозаичных пятен, возникающих у мух тестерных линий в результате комплексного нарушения генотипа: митотической рекомбинации, потери хромосом и/или их фрагментов, транслокации, делений и генных мутаций. В качестве маркеров возможно использование генов «*y*» и «*sn₃*» в транс-положении [3].

5.3.3. Процедура тестирования

Биология, морфологии, разведение дрозофилы, а также инструмент для работы с ней и приготовление питательных сред подробно описаны в соответствующих руководствах [6].

5.3.3.1. Используемые линии дрозофилы

Для учета соматического мозаицизма в данной тест-системе необходимо поддержание следующих тестерных линий дрозофилы:

линия 1 — yellow — генотип *y/y* (*y* — рецессивный ген, обуславливающий развитие желтой окраски тела и щетинок);

линия 2 — *w, sn₃* — генотип *w sn₃/Y* (*w* — white — белая окраска глаз, *sn₃* — *singed* — извитая скрученная форма щетинок; оба гена рецессивные).

Спонтанный уровень мутаций и рекомбинаций невысок и колеблется у разных линий в пределах от 0,3 до 1,1 %

5.3.3.2. Пути введения и выбор «доз»

Обычно используют один из двух способов введения исследуемых фармакологических средств в организм дрозофилы: ингаляционный или пероральный (с кормом). Если препарат не растворим в воде, можно (при обязательной постановке соответствующих контролей) растворить его в этиловом спирте или диметилсульфоксиде так, чтобы конечная концентрация этих растворителей в исследуемом растворе составляла не более 2%. В любом случае в культуру с кормом вносят 200 мкл тестируемого раствора. Возможно распыление нерастворимых в воде соединений по поверхности питательной среды. Ингаляционные затравки осуществляются в эксикаторах, в этом случае расчет доз производят на объем эксикатора.

Токсичность фармакологических средств устанавливают по выживаемости самок F_1 , которая на максимальной из использованных концентраций не должна быть меньше 50%. Всего в эксперименте определяют эффект трех различных концентраций фармакологического средства. В зависимости от токсичности фармакологического средства длительность экспозиций может колебаться от нескольких часов до нескольких дней (обычно экспозиция составляет 48–72 ч).

5.3.3.3. Проведение экспериментов

Виргинных самок в количестве 10 особей помещают в пробирку, содержащую стандартную питательную среду, вместе с 5 самцами. Через 48–72 ч родителей пересаживают в пробирку со свежей питательной средой, а в прежние пробирки вносят растворы испытуемых фармакологических средств.

Просмотр вылетевших особей начинают с 9–10-го дня после начала эксперимента и продолжают до начала вылета следующего поколения. Просмотр проводят под бинокулярным стереоскопическим микроскопом в отраженном свете.

При скрещивании самок линии 1 с самцами линии 2 у гетерозиготных самок первого поколения, имеющих генотип $y + +/+ w sn_3$, регистрируют мутантные щетинки (макрорехты на голове, тораксе и скутеллюме) фенотипа yellow или singed. В протоколе регистрируют общее число просмотренных самок, число самок с одиночными (y, sn) и двойными (y, sn) пятнами [3].

5.3.4. Данные и их представление

Результаты экспериментов представляют в виде таблицы (табл. 4).

Таблица 4

Учет соматического мозаицизма при использовании маркеров «y» и «w, sn₃»

Препарат/ Концентрация/ Экспозиция	Общее число просмотренных самок	Число самок с мутациями				
		пятен «sn»	пятен «y»	пятен «y, sn»	всего пятен	%±M

$M = 1\sqrt{N}$, где N — число просмотренных особей.

Статистическую обработку результатов проводят с использованием χ^2 -критерия, сравнивая частоту появления особей с пятнами в контрольных и опытных сериях [15].

5.3.5. Отчетность

Название эксперимента: _____
 Линии дрозофилы, условия скрещивания: _____
 Возраст родителей на момент скрещивания _____
 Вещество:
 Название _____
 Формула, физико-химические свойства _____
 Откуда получено _____
 Растворитель _____
 Анализ данных литературы: _____
 Схема эксперимента: _____
 Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
 Способ обработки _____ концентрации _____
 Максимальный возраст личинок на момент обработки _____
 Группы _____
 Полученные результаты: _____
 Публикации (по результатам работы) _____
 Список цитированной литературы: _____
 Исполнители: _____
 Дата сдачи отчета: _____

5.4. Учет aberrаций хромосом в клетках костного мозга млекопитающих

5.4.1. Термины и определения

Цитогенетическая активность — способность вещества вызывать структурные и численные хромосомные нарушения в соматических и зародышевых клетках.

Аберрации хромосомного типа — структурные нарушения на уровне идентичных локусов обеих хроматид, выявляемые как парные фрагменты или хроматидные обмены.

Аберрации хроматидного типа — структурные нарушения на уровне одной хроматиды, выявляемые как одиночные фрагменты или хроматидные обмены.

Ахроматические пробелы (гепы) — определяемые визуально нарушения целостности окраски хроматиды, не превышающие по размеру ее ширины и не сопровождающиеся сдвигом дистального участка относительно ее оси.

5.4.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности фармакологических средств в клетках костного мозга млекопитающих.

В основе метода лежит регистрация видимых структурных нарушений хромосом в клетках на стадии метафазы. Клетки костного мозга характеризуются высоким уровнем митотической активности, спонтанная частота клеток с хромосомными повреждениями, включая гепы, составляет 1–2.5% [6].

5.4.3. Процедура тестирования

5.4.3.1. Лабораторные животные

Эксперименты проводят на самцах и самках мелких лабораторных грызунов. Предпочтительно использование генетически однородных животных, не менее 5 особей в каждой контрольной и экспериментальной группах.

Животные должны содержаться при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

5.4.3.2. 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 исследуемый 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 [14].

5.4.3.3. Контроль

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.

5.4.3.4. Приготовление цитогенетических препаратов

Методики выделения клеток костного мозга и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и ранее опубликованных методических указаниях [5, 14]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

5.4.3.5. Микроскопический анализ

Анализируют 100 метафаз от каждого животного. Анализу подвергаются округлые метафазные пластинки без наложений хромосом с модальным числом 40 (39–41) — для мышей, 42 (41–43) — для крыс. Учитывают число одиночных и парных фрагментов, хроматидных и хромосомных обменов, ахроматических пробелов (гепов), число клеток с множественными повреждениями и клеток с тотальной фрагментацией хромосом.

5.4.4. Оценка результатов

Доказательством цитогенетической активности исследуемого препарата является дозозависимое и/или воспроизводимое в разных сериях эксперимента статистически зна-

чимое превышение доли клеток с хромосомными aberrациями в получавших ЛС сериях исследования по сравнению с контролем.

Статистическую обработку проводят согласно общепринятым рекомендациям.

Результаты документируются согласно табл. 5.

Таблица 5

Результаты оценки цитогенетической активности вещества в тесте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

Условия эксперимента	Количество клеток	На 100 исследованных клеток					клеток с хромосомными повреждениями (M±m%)	уровень значимости
		гепы	одиночные фрагменты	парные фрагменты	обмены	клетки с множественными повреждениями		

5.4.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки цитогенетической активности вещества в тесте по учету хромосомных aberrаций в клетках костного мозга млекопитающих

Название эксперимента: _____
 Животные: _____
 Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____
 Питомник _____
 Дата получения _____
 Количество _____
 Вещество:
 Название _____
 Формула, физико-химические свойства _____
 Откуда получено _____
 Растворитель _____
 Позитивный контроль _____
 Анализ данных литературы: _____
 Схема эксперимента: _____
 Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
 Пути введения _____ дозы _____
 Длительность и кратность введения _____
 Группы _____
 Методика приготовления препаратов _____
 Полученные результаты: _____
 Публикации (по результатам работы) _____
 Список цитированной литературы: _____
 Исполнители: _____
 Дата сдачи отчета: _____

5.5. Учет микроядер в клетках костного мозга млекопитающих

5.5.1. Термины и определения

Микроядра — небольшие ДНК-содержащие образования, состоящие из ацентрических фрагментов хромосом или отставших на стадии анателофазы хромосом. На стадии телофазы эти фрагменты могут включаться в ядра дочерних клеток или образовывать одиночные или множественные микроядра в цитоплазме.

5.5.2. Цель исследования и принцип метода

Выявление и количественная оценка потенциальной цитогенетической активности фармакологических средств в полихроматофильных эритроцитах костного мозга млекопитающих.

Метод основан на микроскопической регистрации клеток с микроядрами. Спонтанная частота клеток с микроядрами составляет 0,1–0,2%.

5.5.3. Процедура тестирования

5.5.3.1. Лабораторные животные

Эксперименты проводят на самцах и самках мелких лабораторных грызунов. Предпочтительно использование генетически однородных животных, не менее 6 особей в каждой контрольной и экспериментальной группе.

Животные должны содержаться при 12-часовом световом режиме в условиях свободного доступа к воде и пище.

5.5.3.2. 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].

5.5.3.3. Контроли

Негативным контролем является используемый растворитель.

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

5.5.3.4. Приготовление цитогенетических препаратов

Методики выделения клеток и приготовления препаратов для цитогенетического анализа подробно описаны в соответствующих руководствах и методических указаниях [10]. Полученные препараты (два стекла от каждого животного) шифруют и подвергают микроскопическому цитогенетическому анализу.

5.5.3.5. Микроскопический анализ

Анализируют 2000 полихроматофильных эритроцитов от каждого животного, соотношение нормо- и полихроматофильных эритроцитов определяют при подсчете 500 эритроцитов.

5.5.4. Оценка результатов

Критерием позитивного результата является воспроизводимое и/или зависящее от дозы значимое увеличение числа полихроматофильных эритроцитов (ПХЭ) с микроядрами по крайней мере в одной из получавших ЛС групп по сравнению с контрольной. Полученный положительный результат свидетельствует, что вещество индуцирует хромосомные повреждения и/или нарушения митотического аппарата клеток у экспериментальных животных. Результаты исследований представляют в виде табл. 6. Статистическую обработку проводят согласно общепринятым рекомендациям.

*Результаты оценки цитогенетической активности вещества в тесте
на индукцию микроядер в клетках костного мозга млекопитающих*

Группа (вещество, доза)	№ мыши	Количество ПХЭ с микроядрами на 1000 ПХЭ		Доля ПХЭ от всех эритроцитов
		На каждую мышь	На группу в целом	

5.5.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки цитогенетической активности вещества в тесте на индукцию микроядер в клетках костного мозга млекопитающих

Название эксперимента: _____

Животные: _____

Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____

Питомник _____

Дата получения _____

Количество _____

Вещество:

Название _____

Формула, физико-химические свойства _____

Откуда получено _____

Растворитель _____

Позитивный контроль _____

Анализ данных литературы: _____

Схема эксперимента: _____

Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____

Пути введения _____ дозы _____

Длительность и кратность введения _____

Группы _____

Методика приготовления препаратов _____

Полученные результаты: _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____

Исполнители: _____

Дата сдачи отчета: _____

5.6. Репарационный тест на *Escherichia coli*

5.6.1. Термины и определения

Репарационный тест на *E. coli* является бактериальной тест-системой для учета дифференциальной выживаемости бактерий при действии химических соединений и/или их метаболитов, индуцирующих в геноме этого организма повреждение ДНК, репарируемые в ходе эксцизионной и пострепликативной репарации.

5.6.2. Цель исследования и принцип метода

Данный метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ и/или их метаболитов индуцировать повреждения ДНК у индикаторных штаммов *E. coli*.

Репарационный тест на *E. coli* основан на регистрации дифференциальной выживаемости бактерий дикого типа и мутантных бактерий, дефектных по определенным этапам репарации ДНК. Бактерии обрабатываются тестируемым соединением с системой метабо-

лической активации или без метаболической активации в жидкой среде. После инкубации в течение определенного периода времени регистрируется наличие бактериального роста у разных тестерных штаммов при одних и тех же концентрациях тестируемого соединения.

При наличии у тестируемого соединения ДНК-повреждающего действия бактериальный рост наблюдается только у штамма дикого типа.

5.6.3. Процедура тестирования

5.6.3.1. Бактерии

В качестве тестерных организмов используются штаммы *E. coli* В/г WP2 (дикий тип по репарации ДНК), WP67 (*polA*) и CM571 (*recA*).

5.6.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно, внутривентриально, за 5 сут до экзтаназии).

5.6.3.3. Изучаемые дозы (концентрации)

Максимальная концентрация тестируемого соединения определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность тестируемого соединения может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации. Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная концентрация может быть в пределах 1000–5000 мкг/мл. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная концентрация должна подавлять рост и бактерий дикого типа и мутантных бактерий. В любом случае должно проверяться не менее 5 различных концентраций тестируемого соединения, различающихся, например, в 10 раз. При отсутствии эффекта рекомендуется повторить тест с использованием более дробных концентраций.

5.6.3.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный (необработанный или растворитель) и позитивный контроли.

В качестве растворителя используется дистиллированная вода или, в случае водонерастворимых соединений, диметилсульфоксид (конечная концентрация в инкубационной смеси не должна быть более 2,5%).

5.6.3.5. Проведение эксперимента

Необходимые для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, проведение работ по получению фракции S9, а также регламент работы с бактериальными культурами описаны в литературе [19, 24].

Исследование параллельно ведут с использованием микросомальной активирующей смеси и без нее для регистрации действия как прямых, так и непрямых мутагенов.

В контрольных вариантах исследования вместо испытуемого образца вносят соответствующий объем растворителя.

5.6.4. Данные и их представление

5.6.4.1. Обработка результатов

Наличие или отсутствие роста отмечается в таблице символами «+» или «-».

5.6.4.2. Оценка результатов

Производится визуально по мутности и изменению цвета индикатора. Отчет должен включать следующую информацию:

- бактерии: использованные штаммы;
- условия проведения теста: уровни концентраций и обоснование выбора концентраций, количество культур на экспериментальную точку, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой культуры;
- среднее значение определений на экспериментальную точку;
- стандартное отклонение;
- отношения доза–эффект, где возможно.

5.6.4.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение индуцирует повреждения ДНК у данного микроорганизма. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение не индуцирует повреждения ДНК у *E. coli*.

5.6.5. Отчетность

Название эксперимента: _____
 Тестерные микроорганизмы: _____
 Вид _____ штаммы _____
 Вещество: _____
 Название _____
 Формула, физико-химические свойства _____
 Откуда получено _____
 Растворитель _____
 Позитивный контроль _____
 Анализ данных литературы: _____
 Схема эксперимента: _____
 Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
 Способ обработки _____ дозы _____
 Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
 Система метаболической активации _____
 Полученные результаты: _____
 Публикации (по результатам работы) _____
 Список цитированной литературы: _____
 Исполнители: _____
 Дата сдачи отчета: _____

5.7. SOS-хромотест на *Escherichia coli*

5.7.1. Термины и определения

SOS-хромотест на *E. coli* является бактериальной тест-системой для учета индукции SOS-функций при действии химических соединений и/или их метаболитов, вызывающих нарушения репликации и/или повреждения ДНК в геноме этого организма.

5.7.2. Цель исследования и принцип метода

Данный метод предназначен для выявления способности фармакологических веществ и/или их метаболитов индуцировать SOS-функции у индикаторных штаммов *E. coli* [34].

В SOS-хромотесте используют штамм *E. coli* PQ37, в геноме которого ген *lacZ* (структурный ген фермента бета-галактозидазы) находится под контролем промотора гена *sfIA*, определяющего одну из SOS-функций клетки к контролируемого генеральным репрес-

соров SOS-системы. Экспрессия гена *sfIA* индуцируется после повреждения ДНК или остановки репликации как часть SOS-ответа клетки *E. coli*. SOS-экспрессии колориметрически определяются по активности бета-галактозидазы.

5.7.3. Процедура тестирования

5.7.3.1. Бактерии

В качестве тестерных организмов используется штамм *E. coli* PQ37. Возможно использование других штаммов.

5.7.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных Арохлором 1254 или соволом (300 мг/кг, однократно, внутрибрюшинно, за 5 суток до эвтаназии).

5.7.3.3. Изучаемые концентрации

Максимальная концентрация тестируемого соединения определяется его токсичностью и растворимостью. Токсичность тестируемого соединения может изменяться при использовании экзогенной метаболической активации. Для нетоксичных хорошо растворимых соединений максимальная концентрация может быть в пределах 1000–5000 мкг/мл. Для тестируемых соединений с бактерицидной активностью максимальная концентрация должна подавлять рост бактерий не более чем на 50%. В любом случае должно проверяться не менее 10 различных концентраций тестируемого соединения, различающихся, например, в 2 раза.

5.7.3.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательны одновременно проводимые негативный (необработанный или растворитель) и позитивный контроли на штамм (например, 4-нитрохиолин-1-оксид) и систему метаболической активации (например, 2-аминоантрацен). В качестве растворителя используется изотонический раствор натрия хлорида с 10% диметилсульфоксидом (конечная концентрация в инкубационной смеси не должна быть более 2,5%).

5.7.3.5. Проведение эксперимента

Необходимые для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, проведение работ по получению фракции S9, а также регламент работы с бактериальными культурами с использованием анализатора «Bioscreen» описаны в [28].

Исследование параллельно ведут с использованием микросомальной активирующей смеси и без нее для регистрации действия как прямых, так и непрямых мутагенов. В контрольных вариантах исследования вместо испытуемого образца вносят соответствующий объем растворителя.

В автоматизированном варианте SOS-хромотеста ферментативная реакция определяется в кинетическом режиме в течение 30 мин. Тест можно проводить с помощью автоматизированного микробиологического анализатора «Bioscreen» фирмы «Labsystems» (Финляндия), управляемого ПК по программе «SOS Chromotest».

5.7.4. Данные и их представление

5.7.4.1. Обработка результатов

Обработка результатов проводится по программе, предложенной фирмой «Labsystems». Программа обработки результатов определяет для каждой концентрации исследуемого вещества отношение активности бета-галактозидазы к активности щелочной фосфатазы, нормализует эти отношения на начальный момент времени и вычисляет фактор индукции.

Затем автоматически строятся кривые зависимости фактора индукции от концентрации исследуемого вещества и определяется наклон кривой на ее линейном участке.

5.7.4.2. Оценка результатов

Результаты анализируют по программе «SOS Data Processing», описанной в инструкции к прибору. Получают кривые развития окраски в каждой пробе, дозозависимые кривые для каждого исследуемого вещества и контролей и кривые изменения фактора индукции в зависимости от концентрации вещества. По их линейной части определяют SOS-индуцирующий потенциал (SOSIP).

Отчет должен включать следующую информацию:

- бактерии: использованные штаммы;
- условия проведения теста: уровни концентраций и обоснование выбора концентраций, количество культур на экспериментальную точку, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой культуры;
- отношения доза–эффект.

5.7.4.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение индуцирует SOS-функции у *E. coli*. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение не индуцирует повреждения ДНК, приводящие к индукции SOS-функции у данного штамма микроорганизмов.

5.7.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки генотоксической активности вещества в SOS-хромостесте

Название эксперимента: _____
Тестерные микроорганизмы: _____
Вид _____ штаммы _____
Вещество: _____
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Позитивный контроль _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Способ обработки _____ дозы _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.8. Метод определения внепланового (репаративного) синтеза ДНК

5.8.1. Термины и определения

Внеплановый синтез ДНК обозначает синтез ДНК в процессе эксцизионной репарации.

5.8.2. Цель исследования и принцип метода

Для оценки потенциальной способности фармакологических препаратов индуцировать повреждения ДНК используют прямые методы, основанные на непосредственном измерении количества повреждений, и косвенные, сущность которых сводится к оценке активности ферментов репарации повреждений ДНК. Внеплановый (или репаративный) синтез ДНК осуществляется путем вырезания дефектных участков ДНК и застройки их вновь синтезированными последовательностями нуклеотидов [14].

5.8.3. Процедура тестирования

5.8.3.1. Клеточные культуры

Можно использовать первичные фибробласты человека, лимфоциты периферической крови человека, первичные гепатоциты крыс и др.

5.8.3.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, преобразованных соволом (300 мг/кг, однократно, внутривентриально, за 5 сут до экзтаназии).

5.8.3.3. Изучаемые дозы (концентрации)

Используется двухэтапная схема тестирования. Используются следующие конечные концентрации: 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 мкг/мл. При обнаружении эффекта только при действии одной концентрации вещества эксперимент повторяют в диапазоне концентраций, в 2 и 5 раз больших и меньших (2-й этап).

5.8.3.4. Контроли

В каждом исследовании обязательной является постановка негативного контроля, которым является растворитель.

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или диметилсульфоксид в конечной концентрации 1%, а при необходимости — другие растворители, которые используют в концентрациях, не вызывающих токсического эффекта.

В качестве позитивных контролей используют диметилнитрозамин, тиометансульфонат и др.

5.8.3.5. Проведение эксперимента

Последовательность операций, связанных с подготовкой и проведением экспериментов, а также процедура оценки полученных данных и квалификация результатов исследований описаны в соответствующих руководствах [14].

Уровень активности ферментов репарации, индуцированный действием исследуемого вещества, оценивают по включению [³H]-тимидина в ДНК используемых культур клеток в присутствии ингибитора репликативного синтеза ДНК — оксимочевины.

Радиоактивность измеряют с помощью жидкостно-сцинтилляционного счетчика. Показателем уровня индукции репаративной активности служит «индекс метки».

5.8.4. Данные и их представление

5.8.4.1. Обработка результатов

В каждом случае определение индекса радиоактивной метки проводят усреднением результатов, полученных в двух независимых аналогичных пробах. Статистическую обработку результатов экспериментов проводят с использованием одностороннего гомокадического t-критерия Стьюдента.

5.8.4.2. Оценка результатов

Согласно критериям Международной программы по стандартизации краткосрочных тестов на канцерогенность, достаточным свидетельством генотоксичности вещества в данном тесте является наличие дозовой зависимости, в которой достоверность превышения величин в группе обработанных исследуемым ЛС над контрольными должна быть $< 0,1$ и, по крайней мере в одной точке, $< 0,5$ [36]. Результаты документируются согласно табл. 7.

5.8.4.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение или его метаболиты индуцируют внеплановый (репаративный) синтез ДНК. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение и его метаболиты не проявляют соответствующей активности.

Таблица 7

Оценка уровня репаративного синтеза ДНК, индуцированного фармакологическим веществом

Вариант	Вещество	Концентрация, мкг/мл	% поврежденных клеток	Индекс метки (имп/мин/млн клеток)	P ≤

5.8.5. Отчетность

Название эксперимента: _____
Клеточная линия: _____
Вещество:
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.9. Метод «ДНК-комет» в клетках млекопитающих *in vivo*

5.9.1. Цель исследования и принцип метода

Цель метода — выявление и количественная оценка способности исследуемого соединения индуцировать ДНК-повреждения в различных органах и тканях млекопитающих.

Метод основан на регистрации подвижности в постоянном электрическом поле ДНК и/или фрагментов ДНК клеток, заключенных в агарозный гель. При этом ДНК мигрирует к аноду, формируя электрофоретический след, напоминающий хвост кометы, длина и содержание ДНК в котором зависят от количества одно- и двуниевых разрывов ДНК и щелочно-лабильных сайтов [21]. Метод позволяет оценивать повреждения ДНК на уровне отдельных клеток, обладает высокой чувствительностью, требует минимального ко-

личества экспериментального материала, применим ко всем типам клеток, содержащим ДНК и превосходит по указанным параметрам традиционно применяемые для оценки ДНК-повреждений методы щелочной элюции и FADU [26, 35]. На сегодняшний день метод ДНК-комет верифицирован в исследованиях соединений с известной мутагенной и канцерогенной активностью.

5.9.2. Лабораторные животные

Исследования проводят на мелких лабораторных грызунах — мышах или крысах, половозрелых самцах или самках. Во избежание большого разброса в оцениваемых показателях необходимо использовать генетически однородных животных, отклонение по массе тела и возрасту которых на момент эксперимента не превышает $\pm 10\%$. Ни одна из инбредных линий не выделяется как предпочтительная.

Каждая контрольная и получающая ЛС группа должна содержать не менее 5 особей. При наличии на момент исследования данных об отсутствии существенных межполовых различий в токсических эффектах исследуемого соединения эксперименты проводят на животных одного пола. В противном случае исследование следует проводить на животных обоих полов.

5.9.3. Растворители

Исследуемые соединения растворяют в деионизированной воде или физиологическом растворе. Водонерастворимые соединения вводят с Твином-80 или используют в качестве растворителя 1% раствор этилового спирта или ДМСО. Для перорального введения водонерастворимых соединений предпочтительно использовать 1% водную суспензию крахмала или растительное масло (оливковое). Применение иных растворителей допускается только при надлежащем обосновании и при условии отсутствия у них в применяемых концентрациях токсических эффектов и химического взаимодействия с исследуемым соединением. Все растворы и суспензии необходимо готовить непосредственно перед применением.

5.9.4. Выбор доз

Препарат исследуют в дозах, соответствующих ED_{50} , 10 и 100 ED_{50} , но не выше $1/2 LD_{50}$. Если ED_{50} не определено, соединение испытывается в трех дозах при однократном введении: в наивысшей дозе, соответствующей $1/10-1/5 LD_{50}$, и более низких дозах с десятикратным интервалом между ними. В случае если токсичность исследуемого соединения настолько мала, что дозу LD_{50} невозможно определить по техническим причинам, в качестве максимальной дозы определяется 2000 мг/кг.

5.9.5. Проведение эксперимента

Способ введения исследуемого соединения должен соответствовать планируемому пути поступления вещества в организм человека. В большинстве случаев используется пероральный способ введения. Оценка может быть проведена при внутрибрюшинном, внутримышечном, подкожном, ингаляционном и накожном способах введения, а также при введении с кормом или питьевой водой. Максимальный одновременный объем вводимого раствора или соответствующего растворителя зависит от массы тела животного и определяется из расчета не более 20 мл/кг при пероральном и внутрибрюшинном введении, не более 10 мл/кг при внутримышечном и подкожном. За исключением соединений, обладающих раздражающим действием или едких при высоких концентрациях, разница во вводимых объемах растворов для всех используемых доз соединения должна быть минимальна.

Эксперименты проводят при однократном введении исследуемого препарата с эквотаназией животных через 3–6 и 18–24 ч после введения. Более короткая экспозиция (<3 ч) оправдана для нестабильных, быстро абсорбируемых и метаболизируемых со-

единений, более длительная экспозиция (>24 ч) — для соединений, требующих большего времени для биотрансформации. При получении позитивного результата при одном из сроков экспозиции эксперименты далее не проводятся. Целью многократного введения может явиться оценка генотоксического действия соединений, обладающих кумулятивным эффектом. В этом случае исследуемое соединение вводится ежедневно в течение 7–14 дней. Животные подвергаются эвтаназии через 3 ч после последнего введения.

5.9.6. Контроли

В качестве негативного контроля используют животных, которым вводят растворитель в эквивалентных количествах. Животным позитивного контроля вводят соединение, заведомо обладающее выраженным генотоксическим действием, проявляющимся в большинстве органов и тканей и выявляемым с использованием метода ДНК-комет: метилметансульфонат (40–80 мг/кг) [CAS № 66-27-3], N-нитрозодиметиламин (80–140 мг/кг) [CAS № 62-75-9], N-этил-N-нитрозомочевина (15–50 мг/кг) [CAS № 759-73-9]. Ввиду высокой чувствительности метода все манипуляции (способ введения, время экспозиции, условия содержания до момента эвтаназии и т.д.) с животными негативного контроля и получающей ЛС групп должны быть идентичными.

5.9.7. Приготовление микропрепаратов

При выборе органов/тканей для анализа в первую очередь необходимо ориентироваться на данные о токсикокинетических и токсикодинамических свойствах исследуемого соединения, а также на планируемый путь поступления вещества в организм человека. В частности, для ингаляционных форм основным органом-мишенью для анализа служат легкие, для адсорбентов, не способных всасываться в кровь из ЖКТ, — толстая кишка. При отсутствии таких данных анализ проводят в следующих органах/тканях: а) в печени, являющейся основным органом биотрансформации ксенобиотиков; б) в костном мозге, являющемся активно пролиферирующей тканью, клетки которой находятся на разных стадиях клеточного цикла; в) в клетках крови, осуществляющей транспорт ксенобиотиков и/или их метаболитов; г) в толстой кишке — органе-мишени для веществ и/или их метаболитов, выводимых из организма через ЖКТ; д) в головном мозге, являющемся высокочувствительным к действию нейротоксикантов; е) в мочевом пузыре — органе, в котором ксенобиотики и/или их метаболиты задерживаются перед выведением из организма и могут подвергаться биотрансформации.

Необходимое для проведения исследования оборудование и реактивы, а также методики получения суспензий клеток исследуемых органов/тканей и приготовления микропрепаратов подробно описаны в «Методических рекомендациях по оценке ДНК-повреждений методом щелочного гель-электрофореза отдельных клеток в фармакологических исследованиях» настоящего Руководства.

Полученные микропрепараты шифруют двойным слепым методом и подвергают микроскопическому анализу.

5.9.8. Микроскопический анализ

Для окраски микропрепаратов используются флуоресцирующие красители, традиционно применяемые для визуализации ДНК. При анализе ДНК-комет с использованием программно-аппаратного комплекса рекомендуется использование красителя SYBR Green I, позволяющего получить с микропрепаратов яркие высококонтрастные изображения. Микропрепараты анализируют на эпифлуоресцентном микроскопе с соответствующими для конкретного красителя фильтрами при увеличении ×200–400. На каждый микропрепарат рандомизированно анализируют не менее 100 ДНК-комет без наложений хвостов. В анализ не включают ДНК-кометы апоптотических клеток, вы-

являемых на микропрепаратах в виде слабо флуоресцирующих ДНК-комет с широким диффузным хвостом и практически отсутствующей головой, так называемые «ежики» (hedgehogs) [35].

Программно-аппаратный комплекс для анализа ДНК-комет включает совмещенную с микроскопом высокочувствительную ССД-камеру и специализированное программное обеспечение, что позволяет проводить цифровую регистрацию и обработку параметров ДНК-комет. В зависимости от имеющегося программного обеспечения анализ параметров ДНК-комет проводится в режиме «реального времени» либо с сохраненных цифровых изображений. В качестве показателя поврежденности ДНК используют показатели: длина «хвоста», процентное содержание ДНК в хвосте (% ДНК в хвосте) или их произведение — «момент хвоста» (tail moment). Для повышения воспроизводимости результатов, а также возможности сопоставления данных между экспериментаторами и лабораториями, рекомендуется использовать при оценке ДНК-повреждений показатель «% ДНК в хвосте».

При визуальном анализе ДНК-кометы ранжируются на пять условных типов с соответствующим для каждого числовым значением от 0 до 4 [13, 35]. Степень поврежденности ДНК при этом выражается как индекс ДНК-комет (ИДК), определяемый по формуле:

$$\text{ИДК} = (0n_0 + 1n_1 + 2n_2 + 3n_3 + 4n_4) / \Sigma,$$

где n_0 – n_4 — число ДНК-комет каждого типа, Σ — сумма подсчитанных ДНК-комет.

5.9.9. Оценка результатов

Статистическую оценку результатов проводят по каждому органу путем сравнения среднегрупповых показателей поврежденности ДНК в получавших ЛС и контрольной группах с использованием непараметрических критерия Даннета («% ДНК в хвосте», «момент хвоста», «длина хвоста») или критерия Краскела-Уоллиса (индекс ДНК-комет). Критериями положительного результата являются статистически достоверное, дозозависимое увеличение показателя поврежденности ДНК при одном из сроков экспозиции или статистически достоверный, воспроизводимый эффект по крайней мере для одной экспериментальной точки. Полученный положительный результат свидетельствует о том, что исследуемое соединение проявляет *in vivo* ДНК-повреждающее действие в данном органе-мишени.

Метод ДНК-комет дает, как правило, четкие положительные или отрицательные результаты. При получении неоднозначно трактуемых результатов следует обратить внимание на возможный цитотоксический эффект соединения, свидетельством которого является бимодальное распределение ДНК-комет с низкой и высокой степенью поврежденности ДНК. Кроме того, результаты исследования могут считаться неоднозначными при выявлении ДНК-повреждающего эффекта соединения в низкой дозе при отсутствии такового в более высоких дозах. В этих случаях исследование необходимо повторить с параллельной оценкой цитотоксичности соединения.

При получении положительных результатов рекомендуется оценить также органо- и тканеспецифичность ДНК-повреждающего действия соединения, сопоставляя следующие параметры по каждому органу:

- наличие или отсутствие ДНК-повреждающего эффекта;
- минимальная действующая доза;
- наличие и характер дозозависимого эффекта;
- степень превышения эффекта в получавшей ЛС группе по сравнению с контрольной.

5.9.10. Отчетность

Результаты исследования документируются согласно таблице 8.

*Итоговая таблица результатов оценки ДНК-повреждающей активности соединения
методом ДНК-комет в клетках млекопитающих in vivo*

Условия эксперимента (вещество, доза)	№ животного	Проанализировано клеток	Показатель (% ДНК в хвосте; индекс ДНК-комет)	Средний показатель по группе	Уровни значимости
1	2	3	4	5	6

Отчет предоставляется в соответствии со следующим протоколом:

Название эксперимента _____
 Животные:
 Вид _____ линия _____ пол _____ масса _____
 Питомник _____ дата получения _____
 Количество _____
 Вещество:
 название _____
 формула, № по CAS, физико-химические свойства _____
 откуда получено _____ чистота _____
 растворитель _____
 позитивный контроль _____
 Анализ литературных данных:
 Схема проведения эксперимента:
 дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
 путь введения _____ дозы _____
 Обоснование выбора доз _____
 длительность, кратность введения _____
 группы _____
 выбор органов/тканей для анализа _____
 Условия проведения методики и анализа микропрепаратов _____
 Полученные результаты: _____
 Публикации (по результатам исследований) _____
 Список цитированной литературы: _____
 Заключение по соединению: _____
 Исполнители: _____
 Дата сдачи отчета: _____

5.10. Метод определения однонитевых разрывов ДНК клеток млекопитающих методом щелочной элюции

5.10.1. Цель исследования и принцип метода

Метод основан на определении кинетики прохождения через мембранные фильтры однонитевых фрагментов ДНК, которые образуются при денатурации ДНК в присутствии щелочи. Скорость элюции ДНК определяется скоростью денатурации ДНК, которая зависит от числа разрывов или щелочнолабильных сайтов, индуцированных исследуемым соединением или его метаболитами.

5.10.2. Процедура тестирования

5.10.2.1. Клеточные культуры

Используют культуры постоянных клеточных линий, например клетки легкого китайского хомячка линии V-79, клетки яичника китайского хомячка СНО или культуры мышинных клеток L.

5.10.2.2. Метаболическая активация

В качестве экзогенной метаболической активации используется фракция S9 печени крыс, предобработанных соволом (300 мг/кг, однократно, внутривнутрино, за 5 сут до эвтаназии).

5.10.2.3. Изучаемые концентрации

Используется двухэтапная схема тестирования. Используются следующие конечные концентрации: 0,1; 1,0; 10,0 и 100,0 мкг/мл. При обнаружении эффекта только при действии одной концентрации вещества эксперимент повторяют в диапазоне концентраций, в 2 и 5 раз больших и меньших (2-й этап).

5.10.2.4. Контроли

В каждом эксперименте обязательной является постановка негашеного контроля, которым является растворитель.

В качестве растворителя используются дистиллированная вода или диметилсульфоксид в конечной концентрации 1%, а при необходимости — другие растворители, которые используют в концентрациях, не вызывающих токсического эффекта.

В позитивных контролях используют диметилнитрозамин, метилметансульфонат и др.

5.10.2.5. Проведение эксперимента

Последовательность операций, связанных с подготовкой и проведением эксперимента, а также процедура оценки полученных данных и квалификация результатов исследований описаны в соответствующих руководствах [37].

Для проведения эксперимента клетки тестерной линии предварительно культивируют в среде Игла или RPMI 1640 с 15% инактивированной сывороткой крупного рогатого скота, содержащей меченый тритием тимидин до появления монослоя. Затем культуры инкубируют с исследуемым веществом. По истечении срока инкубации клетки снимают с подложки и переносят на мембранные фильтры, где проводят процедуру лизиса с последующей промывкой выделенной ДНК. Затем проводят щелочную элюцию ДНК и отбор элюатов без фракционирования. Содержание ДНК в элюатах определяют в кислотонерастворимой фракции, которую сорбируют на мембранные фильтры. Радиоактивность меченого тритием тимидина, оставшуюся на фильтрах, определяют на сцинтиляционном счетчике.

Исследование параллельно ведут с использованием микросомальной активирующей смеси и без нее для регистрации действия как прямых мутагенов, так и непрямых, активность которых связана с образованием мутагенных метаболитов, учитываемых при работе с микросомальной фракцией.

5.10.3. Данные и их представление

5.10.3.1. Обработка результатов

Полученные результаты выражают в виде % ДНК, оставшейся на фильтре. При этом используют следующую формулу: $F = A_F / (A_F + A_E)$, где F — % ДНК (активность в имп/мин), оставшейся на фильтре после элюции; A_F — активность, оставшаяся на фильтре; A_E — активность, обнаруженная в элюате, в пересчете на полный его объем.

Для расчетов используют среднее арифметическое всех независимых параллелей эксперимента в том случае, если их результаты не различаются больше чем на 3σ.

5.10.3.2. Оценка результатов

Наличие у изучаемого вещества ДНК-повреждающего действия регистрируют при обнаружении достоверных различий между % оставшейся на фильтре ДНК в контрольных и обработанных ЛС вариантах.

Достоверность различий определяют с использованием критерия Стьюдента.

Если ни в одном из вариантов не получено позитивных результатов, эксперимент прекращают. Таким же образом поступают, если обнаружен эффект с четкой дозовой зависимостью. Если эффект получен только на одной концентрации, эксперимент повторяют с использованием схемы 2-го этапа.

Отчет должен включать следующую информацию:

- использованные клетки;
- условия проведения теста: уровни концентраций и обоснование выбора концентраций, количество повторностей на экспериментальную точку, состав среды, тип и состав системы метаболической активации, методика обработки, негативные контроли;
- индивидуальные результаты для каждой параллели;
- средние значения всех показателей;
- стандартное отклонение;
- уровень значимости различий с сериями негативного контроля.

5.10.3.3. Интерпретация результатов

Позитивные результаты в этом тесте указывают на то, что тестируемое соединение или его метаболиты индуцируют однонитевые разрывы ДНК или щелочлабильные сайты. Негативные результаты в этом тесте указывают на то, что в данных условиях тестируемое соединение и его метаболиты не проявляют соответствующей активности.

5.10.4. Отчетность

Протокол представления результатов определения однонитевых разрывов ДНК клеток млекопитающих методом щелочной элюции

Название эксперимента: _____
Клеточная линия: _____
Вещество:
Название _____
Формула, физико-химические свойства _____
Откуда получено _____
Растворитель _____
Анализ данных литературы: _____
Схема эксперимента: _____
Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____
Количество повторностей, количество чашек на дозу _____
Система метаболической активации _____
Полученные результаты: _____
Публикации (по результатам работы) _____
Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.11. Тест на угнетение метаболической кооперации в смешанной культуре клеток для скрининга опухолевых промоторов

5.11.1. Термины и определения

TG_S — клетки, чувствительные к токсическому аналогу пуриновых оснований 6-тиогуанину.

TG_R — клетки, резистентные к 6-тиогуанину вследствие отсутствия у них фермента гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (ГФРТ).

В контексте данного метода промотор — агент, нарушающий проницаемость межклеточных контактов в культуре соматических клеток млекопитающих.

5.11.2. Цель исследования и принцип метода

Опухолевые промоторы снижают метаболическую кооперацию, которая сдерживает пролиферацию трансформированных (инициированных) клеток.

Цель метода — выявление способности изучаемого агента нарушать проницаемость щелевых контактов клеток для молекул фермента (ГФРТ), превращающего 6-тиогуанин в нуклеотид, включающийся в ДНК [23]. Тест применим для соединений, растворимых в питательной среде для культивирования клеток млекопитающих.

Метод основан на том, что выживаемость TG_R -клеток в смешанной культуре с TGs-клетками на среде с 6-тиогуанидином резко снижается, так как в TGs-клетках образуется нуклеотид 6-тиогуанина, который через щелевые контакты поступает в TG_R -клетки и отравляет их. Внесение в культуру агента, способного разобщать клеточные контакты, уменьшает поступление в резистентные клетки токсичного 6-тиогуанина, что приводит к возрастанию выживаемости TG_R -клеток в смешанной культуре.

5.11.3. Процедура тестирования

Основным эффектом в тесте на угнетение метаболической кооперации является увеличение выживаемости резистентных к 6-тиогуанину клеток при их совместном культивировании с чувствительными вследствие угнетения межклеточного обмена токсичным метаболитом 6-тиогуанином.

5.11.3.1. Культура клеток

В тесте используют клетки легкого китайского хомячка линии V-79 дикого типа (TG_R -клетки) и мутантные (TGs-клетки) из банка клеток, замороженных в жидком азоте на ранних пассажах.

5.11.3.2. Изучаемые концентрации

Для выбора концентраций испытуемого вещества до постановки основного эксперимента изучается его цитотоксическое действие. На 10 чашек высевают по 5×10^5 – 10^6 TG_R -клеток. Через 4 ч после посева в среду добавляют тестируемое вещество в логарифмически снижающихся концентрациях, начиная с концентрации 100 мг/мл или 10% раствора вещества в среде, если оно жидкое. Через 72 ч культуры клеток микроскопируют. Концентрация, приводящая к гибели более 75% клеток или вызывающая выраженные морфологические изменения у 75% клеток считается токсичной. В основном исследовании клетки экспонируют с последовательно уменьшающимися концентрациями вещества, начиная с концентрации, равной половине токсичной дозы.

5.11.3.3. Контроли

В качестве позитивного контроля используют известный промотор — 12-О-тетрадеcanoилфорбол-13-ацетат (ТФА) в концентрации 5–100 мг/мл.

5.11.3.4. Проведение исследования

Необходимые для проведения эксперимента оборудование, посуда, реактивы, питательные смеси и растворы, проведение работ по получению фракции S9, а также регламент работы с культурами клеток описаны [17, 22, 23].

Для того чтобы разделить специфическое разобщающее и неспецифическое токсическое действие тестируемого соединения, параллельно с изучением влияния соединения на метаболическую кооперацию проводят изучение его цитотоксического действия.

5.11.4. Данные и их представление

5.11.4.1. Критерии адекватности постановки исследования

1. Эффективность клонирования TG_R -клеток в смешанной культуре в контроле с растворителем не должна превышать 30% от эффективности клонирования TG_R -клеток в отсутствие TGs -клеток в контроле с растворителем.
2. Выживаемость TGR -клеток в смешанной культуре при обработке промотором ТФА (положительный контроль) должна быть более чем в 2 раза выше, чем в контроле с растворителем.
3. Цитотоксическое действие хотя бы 1–2 изучаемых концентраций тестируемого соединения не должно быть выше 30%.

5.11.4.2. Оценка результатов

Данные представляют в виде количества колоний на чашку во всех группах опыта и контроля. Указывают количество колоний для каждой чашки, среднее количество на чашку и стандартное отклонение.

Эксперимент повторяют не менее 5 раз.

Определяют цитогенетическое действие всех изученных концентраций тестируемого соединения. Вычисляют в % относительную эффективность клонирования TG_R -клеток по отношению к контролю с растворителем (ЭК). Концентрации тестируемого соединения, вызвавшие снижение ЭК более чем на 30% по сравнению с контролем, при оценке влияния соединения на метаболическую кооперацию не рассматривают.

Абсолютное количество колоний TG_R -клеток, выявленное в чашках каждой группы, умножают на соответствующую данной группе ЭК.

Значимость различий выживаемости TG_R -клеток в смешанной культуре, обработанной тестируемым соединением, оценивают при помощи критерия Стьюдента.

Критериями положительного ответа являются:

- наличие достоверного увеличения относительной эффективности клонирования TG_R -клеток в культурах, обработанных тестируемым соединением, по сравнению с контролем;
- высокая воспроизводимость результата (не менее чем в трех опытах из трех);
- существование зависимости «доза–эффект».

5.11.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки способности соединения к угнетению метаболической кооперации в смешанной культуре клеток

Название эксперимента: _____

Культура клеток: _____

Вещество: _____

Название _____

Формула, физико-химические свойства _____

Откуда получено _____

Позитивный контроль _____

Растворитель _____

Анализ данных литературы: _____

Схема эксперимента: _____

Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____

Количество повторностей, количество чашек на дозу _____

Система метаболической активации _____

Полученные результаты: _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____
Исполнители: _____
Дата сдачи отчета: _____

5.12. Тест на неопластическую трансформацию клеток грызунов в культуре ткани

5.12.1. Термины и определения

Неопластической трансформацией является процесс, в результате которого нормальные клетки приобретают способность расти в виде опухолей при перевивке их сингенным животным.

5.12.2. Цель исследования и принцип метода

Целью исследования является выявление способности испытуемого соединения превращать в культуре ткани нормальные клетки в злокачественные. Принцип метода состоит в том, что в системе быстро размножающихся соматических клеток малигнизирующие способности канцерогенов проявляются быстрее.

5.12.3. Процедура тестирования

5.12.3.1. Культура клеток

Культуры соматических клеток длительно пассируют на среде, содержащей тестируемое соединение. Клетки, не обладающие собственной системой метаболической активации проканцерогенов, выращивают на монослой облученных клеток, обладающих высокой активностью метаболизирующих ферментов, или обрабатывают смесью S9 из постмитохондриальной фракции печени крыс. Колонии трансформированных клеток морфологически отличаются от нормальных по внешнему виду и ростовым потребностям, а также по способности давать опухоли при перевивке сингенным животным. Сравнивают количество трансформированных колоний в культурах, обработанных тестируемым соединением со спонтанным уровнем.

5.12.3.2. Метаболическая активация

Для метаболической активации проканцерогенов готовят «кормилку», которая представляет собой монослой у-облученных клеток (10 000 рад) эмбриональных фибробластов или необлученную свежеприготовленную культуру гепатоцитов взрослой крысы или мыши. Клетки «кормилки» нежизнеспособны, но они кондиционируют среду и обеспечивают метаболическую активацию проканцерогенов, к которой клетки иммортализованных линий не способны. Оптимальной является «кормилка» из первичной культуры гепатоцитов взрослых грызунов. Эмбриональные клетки первых пассажей от эмбрионов III триместра беременности также пригодны, но спектр активирующих цитохромов у них ограничен.

5.12.3.3. Изучаемые концентрации

Для изучения канцерогенности испытуемого вещества в качестве максимальной используют минимальную токсическую дозу. Для ее определения используемые для скрининга клетки сажают в лунки пластиковых плат в концентрации, обеспечивающей 30% монослая через 48 ч. Для быстрорастущих клеток эти параметры могут быть другими, их подбирают экспериментально. Через 48 ч после посева в лунках культуральную среду заменяют средой, содержащей различные концентрации испытуемого вещества (обычно вначале с шагом 1/10, а затем 1/2, по две лунки на каждую концентрацию). Водорастворимые вещества непосредственно перед опытом растворяются в культуральной среде. Нерастворимые в воде вещества обычно растворяют в диметилсульфоксиде. Обяза-

тельно наличие контроля на растворитель и чистого контроля без каких-либо добавок (минимум по 2 лунки). Учет результатов проводят от 3-го до 7-го дня после добавления испытуемого вещества по характеру гибели клеток.

5.12.3.4. Контроли

В каждом эксперименте необходимо наличие контролей. Негативный контроль: необработанная культура и растворитель. В качестве позитивного контроля может быть использован 20-метилхолантрен либо другой известный канцероген, предпочтительно того же ряда, что и тестируемое соединение, исследованный ранее в культуре клеток.

5.12.3.5. Проведение эксперимента

В чашки Петри диаметром 50–60 мм на приготовленную «кормилку» высевает от 300 до 1000 клеток-мишеней и через 24 ч добавляют испытуемое вещество в концентрациях с шагом 1/2, с максимальной концентрацией, которая оказалась минимально токсичной в тесте на токсичность. Контролями служат чашки с растворителем в максимальной для данной серии концентрации (в случае ДМСО не более 0,5%), чашки без какого-либо воздействия и чашки с заранее известным канцерогеном в работающей концентрации (положительный контроль). При работе с эмбриональными клетками хомяка клетки выращивают в течение 9 сут без замены среды, после чего культуру отмывают любым солевым раствором и окрашивают принятым в лаборатории методом. При работе с клетками иммортализованных клеточных линий культуру отмывают от канцерогена через 24–48 ч или позже, а затем клетки культивируют 4–6 недель без пересева, сменяя среду 1–2 раза в неделю. После этого чашки промывают и окрашивают, как и в тесте с использованием эмбриональных клеток хомяка.

5.12.4. Данные и их представление

5.12.4.1. Оценка результатов

Данные представляют в виде количества трансформированных колоний на чашку. Как для тестируемого соединения, так и для позитивных и негативных контролей указывают число колоний для каждой чашки, среднее количество трансформированных колоний для каждой чашки и стандартное отклонение.

Все результаты должны быть подтверждены в независимом эксперименте. Для оценки результатов тестирования используют соответствующие статистические методы.

О трансформирующем действии испытуемого вещества судят по характеру колоний клеток или очагов роста. Колонии трансформированных клеток при достаточном навыке легко распознаются по их монослойному росту, отсутствию однонаправленной ориентированности. Такие колонии состоят из резко поляризованных, перекрещивающихся, расположенных в несколько слоев клеток. Окраска их более интенсивна за счет многослойности. Клеточные штаммы, полученные из клеток таких линий, обладают пониженной чувствительностью к концентрации сыворотки в культуральной среде, образуют колонии в полужидком агаре, а при прививке сингенным животным приводят к росту у этих животных опухолей. Показателем активности испытуемого вещества является соотношение колоний трансформированных клеток и нетрансформированных клеток.

Критериями позитивного результата являются или статистически достоверное, зависящее от дозы, увеличение количества трансформированных колоний, или воспроизводимый и статистически достоверный позитивный ответ, по крайней мере для одной экспериментальной точки.

5.12.4.2. Интерпретация результатов

Тестируемое соединение, не вызывающее статистически достоверного, зависящего от дозы увеличения количества трансформированных колоний или воспроизводимого

и статистически достоверного позитивного ответа для какой-либо экспериментальной точки, рассматривается как неканцерогенное в данном тесте.

5.12.5. Отчетность

Протокол представления результатов оценки способности соединения к неопластической трансформации клеток грызунов в культуре ткани

Название эксперимента: _____

Культура клеток: _____

Вещество: _____

Название _____

Формула, физико-химические свойства _____

Откуда получено _____

Позитивный контроль _____

Растворитель _____

Анализ данных литературы: _____

Схема эксперимента: _____

Дата проведения (начало, окончание, отдельные эксперименты) _____

Дозы (концентрации), обоснование выбора доз, количество чашек на экспериментальную точку, токсичность, состав среды, тип системы метаболической активации, методика обработки, позитивные и негативные контроли _____

Индивидуальные результаты для каждой культуры, среднее количество трансформированных колоний на чашку, стандартное отклонение, отношение доза–эффект, где возможно _____

Полученные результаты: _____

Публикации (по результатам работы) _____

Список цитированной литературы: _____

Исполнители: _____

Дата сдачи отчета: _____

Заключение

Общее заключение по результатам экспериментов выносится в соответствии с принципами, изложенными в разделе 4. Применение лекарств с канцерогенной активностью в общеклинической практике недопустимо, за исключением назначений по жизненным показаниям.

Работу по использованию КСТ, так же как и экспертную оценку результатов, должны проводить специалисты, имеющие достаточные профессиональные навыки по применению методов, составляющих систему тестирования.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Белицкий Г.А., Фонштейн Л.М., Худолей В.В. и др. // Совол как индуктор микросомальных ферментов, активирующих проканцерогены / Экспериментальная онкология, 1987. — № 3. — С. 20–23.
2. Белицкий Г.А., Худолей В.В. / Вопросы онкологии, 1986. — № 4. — С. 3–11.
3. Белицкий Г.А., Шарупич Е.Г., Хованская Е.М. // Методические рекомендации по применению соматического мутагенеза у *Drosophila melanogaster* в качестве тест-системы для ускоренного определения канцерогенов. — М., 1982. — 24 с.

4. Малашенко А.М., Суркова Н.И., Семенов Х.Х. Определение мутагенности химических соединений (генетический скрининг) на лабораторных мышах: Методические указания. — М., 1977. — 12 с.
5. Медведев Н.Н. Практическая генетика. — М.: Наука, 1968. — 294 с.
6. Метод определения разрывов ДНК как тест-система для выявления мутагенного потенциала химических веществ: Методическое указание. — М., 1980. — 11 с.
7. Методические рекомендации по исследованию канцерогенных свойств фармакологических и лекарственных средств // Ведомости Фармакологического комитета. — 1998. — № 1. — С. 21–24.
8. Методические рекомендации по проверке мутагенных свойств у новых лекарственных препаратов. — М., 1981. — 56 с.
9. Оценка мутагенности новых лекарственных средств. — М., 1992. — 31 с.
10. Оценка мутагенной активности химических веществ микроядерным методом (методические рекомендации). — М., 1984. — 17 с.
11. Оценка мутагенных свойств фармакологических средств // Ведомости Фармакологического комитета, 1998. — № 4. — С. 32–39.
12. Применение метода щелочного гель-электрофореза изолированных клеток для оценки генотоксических свойств природных и синтетических соединений. Методические рекомендации. — М., 2006. — 27 с.
13. Руководство по краткосрочным тестам для выявления мутагенных и канцерогенных химических веществ. Гигиенические критерии состояния окружающей среды 51. — Женева: ВОЗ, 1989. — 212 с.
14. Статистическая обработка данных тестирования на мутагенность: Методические указания. — Вильнюс, 1989.
15. Тестирование химических соединений на предполагаемую канцерогенную активность по реакции репаративного синтеза ДНК в культуре клеток: Методические рекомендации. — М., 1982. — 21 с.
16. Тест-система для оценки способности индуцировать генные мутации у млекопитающих: Методическое указание. — М., 1977. — 17 с.
17. Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Бобринев Е.В. и др. Методические рекомендации по применению теста Эймса *Salmonella*/микросомы. — М., 1983. — 25 с.
18. Фонштейн Л.М., Абилов С.К., Бобринев Е.В. и др. // Методы первичного выявления генетической активности загрязнителей среды с помощью бактериальных тест-систем (методическое указание). — М., 1985. — 34 с.
19. Ashby J. Two million rodent carcinogens? The role of SAR and QSAR in their detection // *Mutat. Res.*, 1994, 305, 3–12.
20. Collins A.R. // The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations / *Molecular Biotechnology*, 2004, 26, 29–26.
21. Barrett G. C., Kakunaga T., Kuroki T. et al. *In vitro* assays that may be predictive of tumour – promoting agents. — In: Long-term and Short-term Assays for Carcinogens: A Critical Appraisal / Montesano R., Bartsch H., Vainio H. et al. (Eds) IARC Sci. Publ. № 83. — Lyon, 1986. — P. 287–302.
22. Bradley M.O., Bhuyan B., Francis M.C et al. Mutagenesis by chemical agents in V79 Chinese hamster cells: a review and analysis of the literature; a Report of the Gene-Tox Program // *Mutat. Res.*, 1981, 87, 81–142.
23. Bridges B.A. Simple bacterial systems for detecting mutagenic agents // *Labor. Practice.* — 1972, 21, 413–429.
24. Fournie J.W., Hawkins W.E., Krol R.M., Wolf M.J. Preparation of whole small fish for histological evaluation. — In: Ostanter G. K. (Ed.) // *Techniques in Aquatic Toxicology*, 1996, CRC Lewis Publisher. — P. 557–587.
25. Hartmann A. et al. // Use of *in vivo* comet assay for mechanistic genotoxicity investigations / *Mutagenesis*, 2004, 19, 51–59.
26. Hawkins W.E., Walker W. W., Overstreet R M. Carcinogenicity Test Using Aquarium Fish // *Toxicology Methods.* — 1995. — Vol. 5. — P. 225–263.
27. Huttunen T. Bioscreen Application Manual, SOS-Chromotest with Bioscreen, Labsystems Oy, Helsinki.
28. Kajiwara Y., Ajimi S., Hosokawa A., Maekawa K. // Improvement of carcinogen detection in the BALB/3T3 cell transformation assay by using a rich basal medium supplemented with low concentration of serum and some growth factors. *Mutat. Res.*, 1997, 393, 81–90.

29. Kerckaert G.A., LeBoeuf R.A., Isfort R.J. // Use of the Syrian hamster embryo cell transformation assay for determining the carcinogenic potential of heavy metal compounds / *Fundam. Appl. Toxicol.*, 1996, 34, 67–72.
30. Klopman G. // Artificial intelligence approach to structure-activity studies. Computer automated structure evaluation of biological activity of organic molecules // *J. Am. Chem. Soc.*, 1984, 106, 7315–7321.
31. Klopman G., Rosenkranz H. // Structure-activity relations: maximizing the usefulness of mutagenicity and carcinogenicity databases / *Environ. Health Perspect.*, 1991, 96, 67–75.
32. Maron D.M., Ames B.N. // Revised methods for the Salmonella mutagenicity test / *Mutat. Res.*, 1983, 113, 173–215.
33. Quillardet P., Huisman O., D'Ari R., Hofnung M. // The SOS chromotest: direct assay of the expression of gene *sfiA* as a measure of genotoxicity of chemicals. / *Biochimie*, 1982, 64, 797–801.
34. Speit G., Hartmann A. The comet assay – a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: D.S. Henderson (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, vol. 113, DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems, 2nd ed., Humana Press Inc., Totowa, NJ, 2006, pp. 275–286.
35. Venitt S., Bartsch H., Becking G., Fuchs R.P., Hofnung M., Malaveille C., Matsushima T., Rajewsky M.R., Roberfroid M., Rosenkranz H.S. // Short-term assays to predict carcinogenicity. Short-term assays using bacteria / *IARC Sci Publ.* 1986; (83): 143–61.
36. Venitt S., Bartsch H., Becking G., Fuchs R.P., Hofnung M., Malaveille C., Matsushima T., Rajewsky M.R., Roberfroid M., Rosenkranz H.S. // Short-term assays to predict carcinogenicity. The host-mediated assay / *IARC Sci Publ.* 1986, 83, 163–165.
37. Westerfield G.M. // *The zebrafish book* / Univ. Oregon, Eugene – Oregon, 1993, 260 p.

ГЛАВА 8

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИССЛЕДОВАНИЮ КАНЦЕРОГЕННЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ В ХРОНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ НА ЖИВОТНЫХ

*Составители: д. м. н., проф. Л.Н. Пылев; О.В. Смирнова; д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев;
д. м. н., проф. В.Н. Анисимов; д. м. н., проф. Г.Б. Плисс; д. м. н., проф. М.А. Забежинский;
д. м. н., проф. Г.Я. Литатов*

Введение

Исследование потенциальной канцерогенной активности ЛС и фармакологических веществ (ФВ) на стадии разработки имеет много общего с методическими принципами изучения канцерогенности вообще химических веществ и биологических продуктов.

Имеющиеся отличия в подходах при исследовании канцерогенности химических веществ и ЛС состоят в необходимости учета при тестировании последних некоторых таких особенностей, как:

- назначение пациентам с различной патологией, включая генетические повреждения и гормональные нарушения;
- применение ЛС в фиксированных диапазонах доз и длительности введения (иногда пожизненно);
- использование у людей различного возраста (включая детский и старческий);
- назначение беременным и кормящим женщинам;
- использование в качестве профилактических и косметических средств;
- неконтролируемое применение при безрецептурном отпуске.

Необходимо разделение ЛС на принципиально новые, не имеющие химических аналогов; вновь синтезируемые в известных химических рядах; воспроизводимые; выделенные из растений; полученные биотехнологическими и генноинженерными методами.

Несмотря на ряд ограничений и критических замечаний, только хронические эксперименты на лабораторных животных остаются единственными для обоснованного заключения о канцерогенной опасности для человека ЛС.

В связи с возрастающими требованиями к безопасности ЛС на стадии их доклинического токсикологического изучения возникла необходимость пересмотра и уточнения некоторых положений «Методических рекомендаций по исследованию канцерогенных свойств фармакологических веществ» (1988, 2000, 2005 гг.).

1. Принципы и критерии отбора лекарственных средств и фармакологических веществ для изучения канцерогенных свойств в хронических экспериментах на лабораторных животных

Большая длительность и высокая стоимость хронических экспериментов на животных по тестированию канцерогенных свойств веществ выдвигают необходимость проведения отбора наиболее подозрительных соединений для проведения их исследований в первую очередь.

1.1. Тестирование на канцерогенность

При решении вопроса о тестировании ЛС на канцерогенность в хроническом эксперименте необходимо принимать во внимание, что: **обязательному тестированию на канцерогенность должны подвергаться впервые полученные ЛС, 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;
- 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.

Тестирование на канцерогенность не обязательно для ЛС, предлагаемых:

- для лечения злокачественных новообразований у взрослых;
- для лечения заболеваний, представляющих непосредственную угрозу для жизни;
- воспроизводимые ЛС, если имеются достаточно обоснованные сведения, подтверждающие отсутствие канцерогенных свойств аналога.

1.2. Критерии для установления первоочередности исследований

Критериями для установления первоочередности исследований могут также служить:

- структурное сходство с известными канцерогенами и мутагенами или их метаболитами;

- наличие цитостатических, алкилирующих, гормоноподобных, ростостимулирующих свойств;

- наличие данных о положительных реакциях в краткосрочных тестах на мутагенность или в тестах ДНК-повреждений;

- наличие данных о канцерогенном риске при применении в клинической практике аналогов;

- наличие ограниченных сведений о канцерогенности ЛС или его аналогов для человека или экспериментальных животных по ранее проведенным исследованиям.

Наличие у ЛС мутагенных свойств придает при отборе данному критерию особую значимость. В то же время по мутагенности судить о канцерогенных свойствах соединения не следует, к тому же имеются так называемые негенотоксичные канцерогены. При наличии у соединения мутагенных свойств даже в нескольких тестах можно сугубо предположительно думать о его канцерогенности. Однако этого недостаточно для утверждения о наличии этих свойств и принятия каких-либо законодательных и социальных мероприятий по критерию канцерогенности. Отсутствие мутагенных свойств не позволяет предполагать отсутствие канцерогенности. Аналогичную ситуацию мы имеем и в тестах ДНК-повреждений.

Упомянутые принципы и критерии отбора имеют различную значимость, все они служат как для выявления ЛС, нуждающихся в изучении в первую очередь, так и для обоснования необходимости исследования соединения.

Практика показывает, что обычно часть упомянутых критериев отсутствует, особенно когда речь идет о новых ЛС. В таком случае возрастает значимость оставшихся критериев и важным является опыт исследователя.

2. План эксперимента

ЛС сложного состава изучается либо целиком, либо в некоторых случаях только его действующее вещество. Необходимость исследования канцерогенных свойств составляющих обсуждается после завершения эксперимента с основным соединением в случае выявления его канцерогенных свойств.

При тестировании на канцерогенность следует стремиться к созданию условий, обеспечивающих максимальное проявление у ЛС этих свойств, исходя из концепции, что такое возможно при использовании максимально переносимой дозы (МПД). В соответствии с международным определением МПД является дозой, не приводящей в субхроническом эксперименте к гибели животного или торможению массы тела более чем на 10%.

Следует использовать минимум два вида (см. раздел 5) экспериментальных животных (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.

3. Определение максимально переносимой дозы (МПД)

Определение МПД включает два этапа и проводится на каждом виде животных обоего пола при каждом методе введения.

3.1. Острая токсичность

Понятие острой токсичности включает вредное действие соединения, проявляющееся при однократном или кратковременном его применении. Задачей эксперимента является определение LD_{10} , LD_{16} , LD_{50} , LD_{84} вещества, используя метод пробит-анализа по Литчфилду и Уилкоксона.

3.2. Определение МПД в субхроническом исследовании

Эксперимент проводят на 10 животных 6–8 недельного возраста обоего пола (при каждом методе введения, дозе и каждом виде). Максимальная доза находится на уровне LD_{16} , следующая — LD_{10} , а каждая последующая доза в 1,5–2 раза ниже предыдущей. При этом следует принимать во внимание рекомендуемые для человека путь введения и терапевтические дозы (максимально разовую и суточную) в пересчете на единицу массы тела (мг/кг). ЛС вводят животным в течение 6–8 недель и затем 2 недели наблюдают за их состоянием. Критерием токсического эффекта является гибель животных или торможение нарастания массы тела. За МПД принимается максимальная доза ЛС, не приводящая к гибели животного и вызывающая торможение прироста массы тела менее чем на 10%. При тестировании на канцерогенность МПД соединения может изменяться, но не в сторону увеличения.

4. Пути введения

Путь введения ЛС животным может быть одним, но, по возможности, соответствовать или приближаться к способу введения ЛС в организм человека. Увеличение числа путей введения — желательно.

Наиболее распространенным и адекватным является введение испытуемого соединения животным перорально (зондом, с пищей или питьевой водой). Вещество вводят ежедневно, через зонд — 5 раз в неделю. Дозу рассчитывают в мг/кг и ppm массы тела или потребляемой пищи.

При наличии каких-либо особенностей во введении ЛС человеку путь введения может быть другим (подкожный, накожный, внутривенный, внутримышечный, внутрибрюшинный, трансплацентарный и др.). Режим введения ЛС при этом подбирается индивидуально для каждого метода в соответствии со схемами их использования в медицинской практике. Необходимо соблюдение условий, приближенных к GLP.

5. Лабораторные животные

Для тестирования ЛС на канцерогенность наиболее часто используют крыс и мышей. Обязательным является линейность животных и их чувствительность к канцерогенным соединениям. Можно рекомендовать крыс Вистар и мышей гибридов F₁ (СВАхС₅₇В1₆).

Тестирование следует начинать на молодых (8–12-недельных) животных. Следует при их содержании соблюдать условия, приближенные к GLP.

Стандартизация корма животных является обязательным условием экспериментов по тестированию на канцерогенность.

Взвешивание животных должно проводиться в начале исследования еженедельно в течение первых двух месяцев, два раза в месяц — последующих двух и раз в месяц — последующих двух месяцев.

В связи с вариабельностью в частоте спонтанных опухолей каждый эксперимент должен иметь адекватные по возрасту и числу контрольные группы животных.

6. Продолжительность исследования

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.

7. Вскрытие животных, гистологическая обработка и морфологическое исследование

Павшие или подвергнутые эвтаназии животные, получавшие ЛС, и контрольных групп подвергаются тщательному патологоанатомическому исследованию. Все внутренние органы фиксируют в 10% растворе нейтрального формалина, который заменяют через 7 дней. Фиксация продолжается в течение минимум 1,5 месяцев, после чего производится вырезка кусочков для гистологической обработки (промывка, проводка через спирты, заливка в парафин, резка на микротоме и окраска срезов). Окраску препаратов проводят общепринятыми методами (прежде всего гематоксилин-эозином). Морфологическое исследование должно проводиться специалистом, обладающим знаниями в области патологии и онкологии экспериментальных животных.

8. Документация и обработка результатов

Ход экспериментов подробно протоколируется в журнале, на павшее или подвергнутое эвтаназии животное заводится протокол вскрытия с указанием пола, сроков эксперимента, степени посмертных изменений, данных вскрытия, взятых на гистологическую обработку органов, гистологического номера с шифром (серия, год и др.), а также результатов морфологического изучения препаратов. В журнале приводится подробное описание изучаемого ЛС, методики эксперимента, регистрируется изменение в ходе исследования массы тела каждого животного, обосновывается корректировка доз и режима введения ЛС.

Корректировка доз и режима введения ЛС проводится в зависимости от частоты гибели животных и торможения массы их тела. Увеличивать МПД нельзя. Осмотр животных проводят ежедневно.

По результатам исследования составляются таблицы с указанием метода введения ЛС, пола животного, общего и эффективного числа животных, количества и процента опухолей (общего и у каждого пола и по отдельным их локализациям). Указываются сроки обнаружения первой опухоли и средний латентный период.

За эффективное число животных (из которого исчисляется процент опухолей) принимается количество животных, переживших время возникновения (выявления) первой опухоли. Оно исчисляется отдельно для каждого пола и всех животных в группе и может

быть общим для всего эксперимента (отдельно для каждого вида) при отсутствии между группами выраженных различий в смертности. При наличии последних возможно в качестве эффективного числа использовать исходное количество животных или эффективное для каждой группы. Для выявления различий в выживаемости (смертности) животных составляются таблицы по получавшим ЛС и контрольным группам.

Статистическая обработка результатов проводится различными общепринятыми методами: по Стьюденту-Фишеру, по χ^2 , дозовому тренду и методу Пето для случайных и фатальных опухолей.

Заключение

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.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Галицкий В.А. Канцерогенез и механизмы внутриклеточной передачи сигналов // Вопросы онкологии, 2003. — Т. 49. — № 3. — С. 278–293.
2. Emmert S, Leibel D, Runger TM. Syndromes with genetic instability: model diseases for (skin) cancerogenesis. *J Dtsch Dermatol Ges.* 2006 Sep;4(9): 721–31. Review. English, German.
3. Konturek PC, Kania J, Burnat G, Hahn EG, Konturek SJ. Prostaglandins as mediators of COX-2 derived carcinogenesis in gastrointestinal tract. *J Physiol Pharmacol.* 2005 Sep;56 Suppl 5: 57–73. Review.
4. Wald M. Exogenous proteases confer a significant chemopreventive effect in experimental tumor models. *Integr Cancer Ther.* 2008 Dec;7(4):295-310. Review.
5. Steimer JL, Dahl SG, De Alwis DP, Gundert-Remy U, Karlsson MO, Martinkova J, Aarons L, Ahr HJ, Clairambault J, Freyer G, Friberg LE, Kern SE, Kopp-Schneider A, Ludwig WD, De Nicolao G, Rocchetti M, Troconiz IF. Modelling the genesis and treatment of cancer: the potential role of physiologically based pharmacodynamics. *Eur J Cancer,* 2010 Jan; 46(1): 21–32.
6. Li J. J., Li S. A., Oberley T. D., Parsons J. A. Carcinogenic activities of various steroid al and non steroid al estrogen s in the hamster kidney: relation to hormonal activity and cell proliferation // *Cancer Res.*, 1995. Vol. 55. P. 4347–4351.

ГЛАВА 9

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ПОЛУЧЕННЫХ НА ОСНОВЕ БИОТЕХНОЛОГИЙ

*Составители: академик РАН и РАМН Р.М. Хаитов; член-корр. РАМН,
проф. Т.А. Гуськова; д. м. н., проф. Л.П. Алексеев; д. б. н., проф. А.Н. Мурашев*

Введение

Впервые лекарственные препараты на основе биотехнологии были получены в начале 1980-х годов. Методические указания по доклиническому изучению безопасности новых фармакологических средств, полученных методом генетической инженерии, были утверждены Министерством здравоохранения СССР в 1988 году в качестве официального документа.

В настоящее время имеется большой опыт применения ЛС, полученных на основе биотехнологии.

Оценка безопасности ЛС, полученных на основе биотехнологии базируется на общих принципах комплексного изучения токсичности потенциальных ЛС. Однако традиционные подходы к изучению токсичности ЛП, полученных на основе биотехнологии, могут быть неприемлемы в связи с уникальностью и разнообразием структурных и биологических свойств последних, которые могут включать видовую специфику, иммуногенность и непредсказуемую плеiotропическую активность (влияние одного гена на несколько фенотипических признаков). В этих случаях необходимо выявить области несоответствия и оценить степень их важности по отношению к общей оценке безопасности.

В основу данных рекомендаций положены методические указания, утвержденные МЗ СССР в 1988 году, а также международные гармонизированные требования к доклинической оценке безопасности ЛП, произведенных на основе биотехнологии, принятые управляющими органами Совета Европы, Японии и США в 1997 году.

1. Особенности проведения доклинической оценки общей токсичности фармакологических средств, полученных на основе биотехнологии

Программа и объем доклинических исследований ЛП, полученных на основе биотехнологии и являющихся аналогами известных препаратов — биосимилярами, определяются требованиями к известным препаратам, изготовленным по новой технологии и должны включать в себя исследования безопасности на адекватных *in vitro* и *in vivo* моделях. Эти же требования в ряде случаев могут применяться по отношению к препаратам, полученным на основе биотехнологии, но не имеющим природных аналогов. Биопрепараты, сходные по строению и фармакологическим свойствам с препаратами, которые на протяжении длительного времени применяются в клинической практике и о которых имеется достаточно информации по оценке их безопасности, могут быть изучены в ограниченном объеме.

2. Экспериментальное изучение. Общие подходы

Данные методические рекомендации предназначены для доклинической оценки безопасности ЛП различного назначения (профилактические, терапевтические и диагно-

стические, вводимые в организма человека), полученных на основе биотехнологии. Они применимы к ЛС, полученным с использованием различных систем, включая бактерии, дрожжи, насекомых, растения и клетки млекопитающих. Принципы, заложенные в данных методических рекомендациях, применимы также к ДНК-рекомбинантным протеинам, пептидам, синтезированным химическим путем, эндогенным протеинам, полученным из человеческих тканей и лекарствам на основе олигонуклеотидов.

Данные методические рекомендации не относятся к оценке безопасности традиционных бактериальных или вирусных вакцин, вакцин ДНК, а также клеточной или генной терапии.

2.1. Требования к исследуемому препарату

Особенности, связанные с технологией производства. Процесс получения препаратов на основе биотехнологии связан с возможностью присутствия примесей в основной субстанции. Это может быть загрязнение остатками бактериальных или дрожжевых клеток, клеток насекомых, растений и млекопитающих, что может повлечь за собой аллергические и другие иммунопатологические реакции. Неблагоприятная реакция, связанная с загрязнением компонентами нуклеиновых кислот, существует в теории, однако включает в себя потенциальную интеграцию в геном. Для продукции, полученной с использованием клеток насекомых, растений и животных, существует повышенный риск вирусной контаминации. Система оценки безопасности таких препаратов должна быть построена таким образом, чтобы можно было выявить возможные побочные эффекты как основной субстанции, так и примесей. Однако предпочтительнее проводить процесс очистки для того, чтобы удалить примеси и загрязняющие вещества, а не устанавливать программу оценки их токсичности. В любом случае препарат должен иметь достаточно установленных характеристик для того, чтобы можно было выбрать оптимальный метод доклинического изучения его безопасности. Качество препарата, представленного для токсикологических исследований, должно быть сравнимо с препаратом, передаваемым на КИ. Однако необходимо уделять внимание тому, чтобы в ходе исследовательских программ происходили допустимые изменения в производственном процессе с целью улучшения качества препарата. Потенциальное влияние подобных изменений для экстраполяции на людей результатов, полученных на животных, должно быть учтено.

Все изменения, связанные с технологией производства или изменением показателей качества препарата, должны быть отражены в программе исследования. В некоторых случаях могут потребоваться дополнительные исследования (например, фармакокинетика, фармакодинамика и др.). Кроме того, должно быть обоснование выбранного метода исследований.

2.2. Выбор экспериментальных животных

Учитывая видовую специфику многих ЛП, полученных с использованием биотехнологии, важное значение при изучении их токсичности имеет выбор подходящего вида животных. Биологическая активность вместе с видовой и/или тканевой спецификой многих ЛП, производимых с использованием биотехнологий, часто делает невозможным использование в токсикологических исследованиях обычных видов животных (крысы и собаки). Программы оценки безопасности таких препаратов должны предусматривать использование подходящих видов. В опытах *in vitro* клетки млекопитающих могут быть использованы для предсказания определенных аспектов действия *in vivo* и количественной оценки относительной чувствительности различных видов (включая человека) к препаратам, полученным на основе биотехнологии. Такие исследования могут проводиться, например, в целях определения рецепторов, с которыми они взаимодействуют, и быть полезными при выборе оптимальных видов животных для токсикологических исследований *in vivo*. Обобщенные результаты исследований *in vitro* и *in vivo* помогают провести экстраполяцию на человека данных, полученных на животных.

В случае моноклональных антител иммунологические свойства препарата должны быть изучены детально, в первую очередь, учитывая происхождение антител, поскольку последние могут быть животного происхождения, а именно, нативные мышинные, химерные (мышь/человек), а также нативные человеческие и гуманизированные (генно-инженерные). Для нативных мышинных антител, несущих мышинные иммуноглобулины, исследования на мышах имеют ограниченное значение, поскольку могут предоставить информацию только о неспецифической цитотоксичности.

При оценке токсичности химерных и гуманизированных антител, несущих рекомбинантные (человек/мышь) белки, следует использовать методы оценки токсичности, применяемые к иммуноглобулинам человеческого происхождения. Целесообразно также определение наличия мышинных белков иммунохимическими методами. В настоящее время использование нативных мышинных и нативных человеческих антител в качестве ЛП весьма ограничено, а наибольшее распространение получили химерные и гуманизированные моноклональные антитела.

Программы оценки безопасности ЛС обычно должны предусматривать использование двух подходящих видов животных. Однако в определенных случаях может быть достаточным использование одного вида. Например, в случае, когда был определен только один подходящий вид, либо в случаях, когда биологическое действие биофармацевтического препарата хорошо известно. Кроме того, даже в тех случаях, когда для оценки токсичности с проведением краткосрочных исследований необходимо использование двух видов животных, для такой оценки с проведением долгосрочных исследований может быть достаточным использование одного вида. Например, когда токсикологические характеристики препарата, полученные при проведении краткосрочных исследований на двух видах животных, являются схожими.

Данные, полученные при изучении токсичности на животных неподходящих видов, могут ввести в заблуждение и не должны приниматься в расчет. При отсутствии подходящих видов животных следует изучить возможность использования трансгенных животных, имеющих рецепторы, близкие к человеческим, либо использования гомологического белка. Информация, полученная при использовании трансгенных животных, имеющих сходные с человеческими рецепторы, оптимизируется, когда взаимодействие препарата и рецептора имеет физиологические последствия, схожие с ожидаемыми для человека. Хотя полезная информация может быть получена при использовании гомологических белков, но она недостаточна для решения вопроса о безопасности проведения КИ. В случае невозможности использования трансгенных животных моделей или гомологических белков необходимо проведение ограниченных токсикологических исследований с использованием одного подходящего вида, например, с помощью изучения токсичности при введении препарата в течение не менее 14 дней при оценке состояния гомеостаза животных в полном объеме.

В последние годы достигнут значительный прогресс в разработке на животных моделей заболеваний, близких заболеваниям человека. Эти модели включают экспериментальные и спонтанные заболевания, а также трансгенных животных. Они могут обеспечивать дальнейшие исследования по оценке безопасности препаратов (например, оценка нежелательного провоцирования развития заболевания). В определенных случаях исследования, проводимые с использованием животных моделей заболеваний, могут выступать альтернативой изучению токсичности с использованием обычных животных. При использовании таких моделей заболеваний в целях изучения безопасности должно быть представлено научное обоснование.

2.3. Число и пол животных

Число животных, используемых в расчете на одну дозу препарата должно быть достаточным для оценки его токсического воздействия на организм животных. Недостаточное количество животных в группе может привести к невозможности наблюдения за

обратимостью выявленных токсических эффектов. Ограничения количества изучаемого препарата, которые часто проявляются при проведении исследований с использованием крупных животных (собаки, приматы), могут быть частично компенсированы повышением частоты и продолжительности наблюдения за животными.

При оценке общетоксического действия препаратов должны использоваться оба пола экспериментальных животных.

2.4. Выбор дозы, способов и частоты введения

Принадлежность большинства препаратов, полученных с помощью биотехнологии, к классу эндогенных веществ, содержащихся в организме в определенных количествах и участвующих в процессах естественного метаболизма, требует особого внимания в выборе доз при проведении токсикологических исследований. С одной стороны, должен быть соблюден принцип использования высоких доз, обеспечивающий необходимый запас надежности оценки безопасности. С другой стороны, при проведении экспериментов по оценке безопасности аналогов эндогенных веществ (в особенности при исследовании их общетоксического и иммунотропного действия) наиболее информативными могут оказаться результаты, полученные при введении экспериментальным животным терапевтических доз, обеспечивающих проявление специфической биологической активности препарата. Возможны ситуации, когда при использовании очень высоких доз некоторые эффекты исчезают или модифицируются. Диапазон используемых доз должен быть определен с учетом этих особенностей.

Определение среднесмертельных доз (LD_{50}) для препаратов, полученных с помощью биотехнологии, как правило, невозможно в связи с их низкой токсичностью при однократном введении животным. В связи с этим рационально отказаться от определения LD_{50} для тех фармакологических средств, которые не вызывают гибели получавших ЛС животных на уровне доз, характеризующих их принадлежность к классу практически нетоксичных веществ.

При исследовании общетоксических свойств ЛС, полученных на основе биотехнологии, в хроническом эксперименте необходимо сохранить общепринятый набор из 3-х доз, поскольку зависимость доза–эффект является одним из основных критериев вредности при оценке результатов доклинической оценки безопасности препарата. При этом следует учитывать, что эти препараты могут быть рекомендованы для клинического использования как в дозах, восполняющих естественный дефицит вещества в организме, так и в дозах, многократно превышающих его содержание в биологических субстратах организма. Наименьшая доза может быть равной терапевтической дозе для вида лабораторных животных, используемых в эксперименте, или максимальной суточной для человека с учетом пересчета ее на данный вид животных. Наибольшая доза препарата должна вызывать те или иные токсические эффекты у животных, чтобы показать наиболее чувствительные органы (органы-мишени) к изучаемому ЛС, полученному с помощью биотехнологии. Средняя доза препарата должна занимать промежуточное положение, чтобы определить безопасную зону его хронического воздействия.

Способ и частота введений экспериментальным животным фармакологических средств, полученных на основе биотехнологии, должны быть максимально приближены к указанным в инструкции для клинического изучения или применений. Способ введения препарата экспериментальным животным, отличный от используемого в клинической практике, может быть применен только при технической невозможности введения препарата животным данного вида. Следует учитывать фармакокинетику и биодоступность препарата у используемых видов животных. Например, в случае более быстрого метаболизма препарата у данного вида животных по сравнению с человеком частота введений препарата лабораторным животным может быть увеличена по сравнению с частотой, предлагаемой для использования этого препарата в клинике. Необходимо также учитывать объем вводимого вещества и его концентрацию.

2.5. Длительность введения

Длительность введения препаратов экспериментальным животным должна соответствовать длительности применения в клинике. Для большинства ЛП, произведенных на основе биотехнологии, эта продолжительность обычно составляет 1–3 месяца. Для биологических ЛП, предназначенных для кратковременного использования (например, менее 7 дней) введение в течение 2 недель считается достаточным. Для биологических ЛП, предназначенных для лечения хронических болезней, достаточной продолжительностью исследований считается 6 месяцев, хотя в некоторых случаях более длительные или короткие исследования возможны при соответствующем научном обосновании.

Когда это возможно, эти исследования должны включать себя и изучение токсикокинетики.

Период восстановления (последствие препарата) должен быть включен в план изучения для того, чтобы определить устранение или усиление токсического эффекта. Длительность восстановительного периода определяется тяжестью токсического эффекта, оказываемого биологическими ЛП. Группа выздоравливающих животных должна находиться под наблюдением, пока не будет выявлена полная обратимость выявленной патологии.

При изучении острой и хронической токсичности необходимо оценивать состояние тканей в области введения или нанесения препарата у экспериментальных животных с обязательным гистологическим исследованием. При пероральном введении ЛС необходимо проведение гистологических исследований ЖКТ на всем протяжении.

3. Особенности изучения иммунотоксичности фармакологических средств, полученных на основе биотехнологии

Многие ЛП для людей, произведенные с использованием биотехнологий, являются иммуногенными для животных. Следовательно, при изучении иммунотоксичности для обеспечения правильной интерпретации полученных результатов должна быть дана характеристика антителообразования, а в случае необходимости — и других компонентов иммунного ответа. В частности, при интерпретации данных должно быть рассмотрено воздействие образования антител на параметры фармакокинетики (фармакодинамика, степень охвата и/или серьезность побочных эффектов, активация комплемента или возникновение новых токсических эффектов). Следует также уделить внимание оценке возможных патологических изменений иммунной системы, включая появление иммунных комплексов и аутоантител.

Обнаружение антител не должно служить единственным основанием для раннего прекращения доклинического изучения безопасности или изменения его продолжительности, если только иммунная реакция не нейтрализует фармакологический и/или токсикологический эффект биофармакологического препарата у большинства животных. Часто иммунная реакция на биофармакологические препараты бывает различной, подобно тому, как это наблюдается у людей.

На основании индуцирования образования антител у животных нельзя спрогнозировать потенциал для образования антител у людей. У человека могут вырабатываться сывороточные антитела против человеческих белков, и часто терапевтическая реакция в их присутствии сохраняется. Случаи серьезных анафилактических реакций на рекомбинантные белки у людей редки. В этой связи результаты тестов на анафилактическую реакцию у морских свинок, обычно дающие позитивный результат для препаратов, содержащих белок, не могут служить основанием для прогнозирования реакции у людей; считается, что такие исследования имеют малое значение для рутинной процедуры оценки препаратов такого типа.

Многие ЛП биотехнологического происхождения, и в первую очередь иммуностропного действия, оказывают выраженное влияние как на гуморальный, так и на клеточные компоненты иммунного ответа. Поэтому тактика рутинных исследований или использо-

вания стандартных тестирующих устройств не рекомендуется для ЛП, произведенных на основе биотехнологии. Эти препараты требуют более глубоких исследований влияния на иммунную систему. С этой целью могут быть использованы Методические рекомендации по изучению иммуотропной активности ЛС.

4. Особенности оценки репродуктивной токсичности фармакологических средств, полученных на основе биотехнологии

Необходимость в изучении репродуктивной токсичности зависит от препарата и клинических показаний. Установленный план изучения и расписание дозировок может изменяться в зависимости от видов, иммуногенности, биологической активности и фармакокинетики. Например, особенности, касающиеся эволюционной иммуотоксичности, которая может применяться, в частности, к определенным моноклональным антителам с продолжительным иммунологическим действием. Такие препараты могли бы изучаться по плану, скорректированному для определения иммунной деятельности новорожденных.

Если существует исчерпывающая общедоступная информация о влиянии на репродукцию отдельного класса соединений (например, интерфероны), где единственным и чувствительным видом являются нечеловекообразные обезьяны, то можно не проводить рутинного изучения репродуктивной токсичности. В таком случае следует представить научную базу для оценки возможного влияния таких препаратов на репродукцию и развитие потомства.

5. Особенности оценки генотоксичности (мутагенности) фармакологических средств, полученных на основе биотехнологии

Изучение генотоксичности должно быть проведено в тех случаях, когда существует основание для беспокойства по поводу продукта (например, из-за присутствия органических связующих молекул в сопряженных белковых продуктах).

В случае с некоторыми ЛП, произведенными на основе биотехнологии, существует потенциальная опасность накопления спонтанно мутлирующих клеток (например, посредством облегчения селективного преимущества пролиферации), ведущая к канцерогенности. Стандартный набор тестов на генотоксичность не предназначен для того, чтобы обнаруживать указанные состояния. Для этих целей, возможно, потребуется разработать альтернативные модели *in vitro* и *in vivo*.

6. Особенности оценки канцерогенности фармакологических средств, полученных на основе биотехнологии

Стандартные исследования на канцерогенность обычно не проводят для ЛП, произведенных на основе биотехнологии. Однако оценка специфических канцерогенных свойств препарата может быть необходима при значительной продолжительности клинического применения, широте использования препарата в медицинской практике и/или биологической активности продукта (например, фактор роста, иммунодепрессивные препараты и т. д.), когда имеется беспокойство по поводу канцерогенного потенциала.

Препараты, которые могут поддерживать или содержать пролиферацию трансформированных клеток и клональной экспансии, возможно ведущей к неоплазии, должны оцениваться относительно рецепторной экспрессии в различных злокачественных и нормальных человеческих клетках. Следует установить способность препарата стимулировать рост нормальных или злокачественных клеток на рецепторном уровне. Когда данные *in vitro* дают повод для беспокойства относительно канцерогенных свойств препарата, может потребоваться дальнейшее изучение канцерогенности на экспериментальных животных в соответствии с существующими методическими указаниями для любых ЛС. Важную информацию о возможной клеточной пролиферации можно получить при исследовании хронической токсичности ЛП, полученного на основе биотехнологии.

В тех случаях, когда ЛП биологически активен и не является иммунологическим для грызунов, а другие исследования не принесли удовлетворительных результатов, для того чтобы дать оценку канцерогенному потенциалу, следует рассматривать полезность исследования канцерогенности на отдельном виде грызунов. При этом следует тщательно подойти к выбору дозы, учитывая данные фармакокинетических и токсикологических исследований, анализ сравнительных рецепторных характеристик и намеченных параметров применения препарата в клинике.

7. Особенности доклинической оценки безопасности моноклональных антител

7.1. Подтверждение соответствия моноклональных антител заявленным характеристикам с помощью точного установления их иммунохимических и физико-химических свойств

7.2. Данные о чистоте продукта

- а) нормативные показатели чистоты;
- б) идентификация незначительных примесей, например, РНК, белка и геномной ДНК;
- в) допустимые пределы влажности в случае лиофилизации;
- г) пирогенность.

7.3. Изучение *in vitro* моноклональных антител

Моноклональные антитела, предназначенные для использования *in vitro*, не должны проходить общепринятые доклинические исследования. Необходимо предоставить данные о чувствительности, специфичности, возможных положительных и отрицательных свойствах и диагностической значимости антител, входящих в диагностические системы. В случае несоответствия национальным/международным базам серологических диагностических систем, используемых в клинической практике, — указать причины.

7.3.1. Подробное описание методик

- а) данные о продуцентах моноклональных антител, например, использованных линий клеток миелом, об асцитной жидкости животных и методах ее очистки, о методах клонирования;
- б) изотип моноклонального антитела;
- в) стабильность клона;
- г) специфичность и сродство моноклонального антитела и т.п.

7.3.2. Иммунологические свойства

- а) антигенная специфичность;
- б) не связанная с фармакологической эффективностью перекрестная реактивность антител, неспецифическое связывание и неспецифическая реакция, включая цитотоксичность к образцам тканей человека. Для установления перекрестной реактивности моноклональных антител в отношении тканей человека следует применять соответствующие иммуногистохимические и иммунологические методы с использованием широкого диапазона образцов тканей человека.

7.4. Изучение *in vivo* моноклональных антител

7.4.1. Общетоксическое действие

Токсикологические исследования на «фармакологически нехарактерных видах» бесполезны и не рекомендуются. Оптимальным видом животных являются обезьяны. Однако если в доклинических исследованиях *in vitro* из-за особых требований по отношению к

клеткам человека не был установлен оптимальный вид животного, иногда целесообразно оценить потенциальную токсичность антител, выполнив ограниченную оценку токсичности на других видах. Кроме того, изучение общетоксического действия является необходимым в случае наличия в составе лекарственной формы каких-либо дополнительных ингредиентов.

В последние годы наблюдается большой прогресс в разработке экспериментальных моделей болезней животных, сходных с заболеваниями человека. Эти модели включают спонтанно возникшие и экспериментально созданные, в том числе на искусственно созданных трансгенных животных. Эти модели могут быть полезны для определения степени безопасности препарата (например, при оценке нежелательного стимулирования развития болезни). В некоторых случаях исследования на вышеуказанных моделях болезней могут быть использованы как приемлемая альтернатива токсикологических исследований на обычных животных. Экспериментальные модели заболеваний на животных могут быть полезны для определения предельных нетоксичных дозировок, выбора клинических показаний и определения соответствующих схем клинического использования. Нужно отметить, что для оптимального построения программы исследования исключительно важно предусмотреть собственный контроль и одновременно иметь базовые данные для сравнения.

Как правило, необходимо использовать животных обоего пола, либо обязательно обосновать отказ от такого использования в конкретных случаях.

7.4.2. Аллергенность

При оценке возможности развития аллергических реакций на введение в организм человека терапевтических моноклональных антител необходимо учитывать происхождение используемых антител. В зависимости от происхождения антитела могут быть полностью мышинные, полностью человеческие, гуманизированные и химерные. Последние два типа антител относятся к рекомбинантным. Естественно, что вероятность развития аллергических реакций, включая анафилаксию, на введение полностью человеческих антител является минимальной, то же относится и к гуманизированным антителам. При введении моноклональных антител химерного происхождения аллергическая реакция, включая анафилаксию, маловероятна. При введении полностью мышинных моноклональных антител имеется вероятность возникновения аллергических реакций уже при их первичном введении и очень высока вероятность развития анафилаксии при повторных введениях. Вероятность развития анафилаксии у человека не может быть оценена на модели с использованием морских свинок. Поэтому для моноклональных антител такие исследования не являются обязательными.

7.4.3. Иммунотоксичность

Один из аспектов иммунотоксикологической оценки включает оценку потенциальной иммуногенности и гиперчувствительности.

Кроме того, многие фармацевтические продукты, полученные методами биотехнологии, предназначены для того, чтобы стимулировать или подавлять иммунную систему. Воспалительные реакции в месте введения препарата могут указывать на стимулирующую реакцию. Под влиянием терапевтических моноклональных антител экспрессия поверхностных антигенов на клетках-мишенях может меняться. При этом усиление их экспрессии может свидетельствовать о наличии аутоиммунного потенциала. Чтобы прояснить эти вопросы, нужно воспользоваться иммунотоксикологическим подходом к проведению исследований. Необходимо получить данные о токсичности антител по отношению к потенциальным органам-мишеням, включая кроветворную и иммунную систему. Доклинические исследования должны обеспечить информацию о местном воздействии препарата в точке инъекции, полученную при биопсии или некропсии участков контакта с препаратом, и о его общем патогенетическом воздействии на организм.

7.4.4. Канцерогенность

Везде, где грызуны не являются репрезентативными видами для оценки токсичности и (или) продукт является иммуногенным, обычные исследования канцерогенности не подходят для определения канцерогенного потенциала продукта. Следует рассмотреть следующие подходы. Продукты, которые по определению не обладают способностью вызывать или поддерживать размножение перерожденных клеток и их клональной экспансии, ведущей к образованию опухоли, нужно изучить по экспрессии рецептора моноклональных антител в разных злокачественных и нормальных клетках человека. Нужно определить наличие способности исследуемых моноклональных антител инициировать и стимулировать рост злокачественных клеток, экспрессирующих соответствующий рецептор. Если данные *in vitro* по развитию опухоли дают основания для опасений, то требуются дальнейшие исследования на моделях с репрезентативными животными.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Методические указания по изучению общетоксического действия фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С. 41–54.
2. Методические указания по оценке алергизирующих свойств фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С. 54–69.
3. Методические указания по оценке иммунотоксического действия фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С. 70–86.
4. Методические указания по изучению репродуктивной токсичности фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С. 87–100.
5. Методические указания по оценке мутагенных свойств фармакологических веществ // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С. 100–122.
6. Методические указания по оценке канцерогенности фармакологических веществ и лекарственных средств // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С. 122–130.
7. Методические указания по оценке канцерогенности фармакологических средств и вспомогательных веществ в краткосрочных тестах // Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей ред. член-корр. РАМН, проф. Р.У. Хабриева. — 2-изд., перераб. и доп. — М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. — С. 131–170.
8. Принципы надлежащей лабораторной практики. Национальный стандарт РФ, ГОСТ Р 53434-2009.
9. Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».

ГЛАВА 10

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОЙ ОЦЕНКЕ БЕЗОПАСНОСТИ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составитель: к. м. н. Р.Д. Сюбаев

Введение

Одним из важных аспектов обеспечения безопасности лекарственной терапии является оценка риска токсических эффектов лекарственного взаимодействия (ЛВ) при комбинированном применении ЛС. Оценка ЛВ необходима также для разработки рациональных комбинаций ЛС, в которых используются полезные эффекты взаимодействия, позволяющие повысить терапевтическую эффективность или снизить токсические и нежелательные побочные эффекты. Актуальность проблемы ЛВ, ее медицинское и социально-экономическое значение обусловлены широким распространением лечебных схем комбинированной терапии и большим количеством препаратов на основе фиксированных комбинаций ЛС [1].

Практически во всех случаях фармакотерапии имеет место одновременное или последовательное применение нескольких ЛС. Возможное количественное изменение токсических эффектов при взаимодействии может привести к усилению побочного действия и развитию серьезных осложнений при обычном режиме дозирования. Вместе с тем необходимо учитывать скрытую опасность, которая обусловлена возможным развитием новых непрогнозируемых токсических эффектов и качественным изменением ожидаемого спектра токсичности комбинации ЛС.

Комбинированная терапия может быть вынужденной и заведомо нерациональной с точки зрения безопасности. В этом случае необходимо оценивать возможность снижения последствий неизбежного токсикологического взаимодействия при вынужденном совместном применении ЛС у пациентов, страдающих несколькими заболеваниями. Эта категория пациентов представляет собой группу повышенного риска в отношении применения нерациональных и небезопасных комбинаций.

В последние годы, наряду с созданием оригинальных ЛС, обладающих принципиально новыми механизмами действия, продолжают развиваться разработки эффективных препаратов на основе рациональных комбинаций ЛС. Перспективность этого направления обусловлена возможностью «конструирования» фармакотерапии с заданным оптимальным профилем эффективности и безопасности. Наиболее ценным результатом комбинированного применения ЛС следует считать не столько простое сочетание полезных эффектов отдельных ЛС, сколько получение уникальных эффектов самой комбинации в виде потенцирования терапевтических эффектов и предотвращения токсического действия, что позволяет использовать ЛС в более низких дозах. Оценка безопасности эффектов взаимодействия также необходима для комбинаций, в которых ЛС включаются в одну лекарственную форму для удобства их одновременного применения.

В «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» [3] фрагментарные указания по изучению комбинаций ЛС содержатся в отдельных методических рекомендациях, посвященных разным видам фармакологических и токсикологических исследований. Во многих рекомендациях вообще отсутствуют упоминания об изучении комбинаций ЛС. Настоящие указания определя-

ют стратегию доклинической оценки безопасности комбинированного применения ЛС, а также критерии для экспертной оценки потенциального риска токсикологического взаимодействия ЛС. Предлагаемые методологические подходы нацелены на адекватное доклиническое обоснование безопасности применения исследуемой комбинации ЛС у человека с исключением ненужных или малоинформативных дополнительных исследований на животных. Указания применимы как к фиксированным комбинациям, состоящим из химических веществ, биологических субстанций или растительных веществ, так и к разработке схем комбинированной лекарственной терапии монопрепаратами.

При разработке настоящих рекомендаций были использованы данные, содержащиеся в отечественных и зарубежных методических документах [3, 7, 8, 9], а также сведения, опубликованные в научной литературе, и результаты собственных исследований.

Следует подчеркнуть, что настоящие рекомендации, являясь также и методологической основой для экспертизы безопасности ЛС, не исключают возможности обоснованного использования исследователем альтернативных методов и подходов.

1. Теоретические основы и принципы доклинической оценки безопасности комбинаций ЛС

Теоретические основы методологии оценки ЛВ включают фундаментальные представления о механизмах действия ЛС на организм, представляющий собой сложную иерархически организованную систему гомеостатических систем. Гомеостатические системы вступают во взаимодействие с ЛС, реагируют на это взаимодействие обратимым или необратимым изменением гомеостатического баланса на молекулярном, субклеточном или тканевом уровне, что может привести к развитию обратимых или необратимых эффектов или к изменению чувствительности органов и тканей к воздействию внешних и внутренних факторов. Гомеостатический механизм лежит в основе фармакокинетического, фармакологического и токсикологического взаимодействия.

Токсикологическое взаимодействие — это процесс комбинированного токсического воздействия на организм нескольких ЛС (при совместном или последовательном их применении), включающий токсикодинамические и токсикокинетические механизмы, результатом которого является изменение токсических свойств отдельных компонентов комбинации или возникновение новых эффектов. При этом токсические свойства комбинации отличаются от ожидаемой суммы свойств отдельных компонентов, т.е. не соответствуют условию *аддитивности*.

Принцип *аддитивности* применяется в общей токсикологии в качестве исходной гипотезы совместного действия нескольких токсических агентов [2]. При этом предполагается, что прогнозируемый эффект комбинации является суммой эффектов отдельных компонентов комбинации. Уравнение аддитивности лежит в основе аналитических приемов для определения характера взаимодействия с использованием параметров острой токсичности фиксированных комбинаций по Финни (Finney D.J.) [10] и для изоболографического анализа 2-компонентных нефиксированных комбинаций по Леве (Loewe S.) [11]. Применение принципа аддитивности позволяет установить сам факт взаимодействия и получить его качественные и количественные характеристики при наложении прогнозируемого (аддитивного) и фактического (экспериментального) спектра токсичности комбинации.

По классической теории результатом совместного применения фармакологических веществ могут быть следующие эффекты: $\mathcal{E}_{AB} = \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B$ — *суммация*; $\mathcal{E}_{AB} > \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B$ — *потенцирование*; $\mathcal{E}_{AB} < \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B$ — *антагонизм* (где \mathcal{E}_A и \mathcal{E}_B — эффекты, вызываемые веществами А и В, а \mathcal{E}_{AB} — эффект их комбинации). Выделяют также условные варианты взаимодействия с отсутствием активности у одного из компонентов комбинации:

$$\begin{aligned} \mathcal{E}_{AB} > \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B & \text{ — а) } \textit{потенцирование}, \text{ (если } \mathcal{E}_B = 0\text{), б) } \textit{синергизм}, \text{ (если } \mathcal{E}_B < 0\text{);} \\ \mathcal{E}_{AB} & = \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B \text{ — } \textit{суммация}; \\ \mathcal{E}_{AB} < \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B & \text{ — } \textit{аддитивный эффект}, \text{ (если } \mathcal{E}_A < \mathcal{E}_{AB} > \mathcal{E}_B\text{);} \end{aligned}$$

$\mathcal{E}_{AB} < \mathcal{E}_A + \mathcal{E}_B$ — антагонизм, (если $\mathcal{E}_A \neq 0$ и $\mathcal{E}_B \neq 0$), б) десенсибилизация (если $\mathcal{E}_A = 0$ или $\mathcal{E}_B = 0$).

Исходя из общего механизма взаимодействия ЛС, который можно объяснить интерференцией дестабилизации гомеостатических систем, принципиально важным в методологическом отношении является выделение варианта взаимодействия, приводящего к появлению нового эффекта, который не регистрируется у отдельных компонентов ($\mathcal{E}_A = 0$ и $\mathcal{E}_B = 0$), но является их *потенциальной активностью* (ПА): $\mathcal{E}_{AB} \leftarrow (\text{ПА}_A + \text{ПА}_B)$. Теоретически обоснованными эффектами взаимодействия следует считать *антагонизм, потенцирование и появление качественно новых эффектов*. Кроме того, к качественным эффектам взаимодействия необходимо отнести и *развитие необратимости токсического действия* как проявление локального повреждения гомеостатической системы.

При многокомпонентном взаимодействии теоретически возможны и реализуются разнообразные его варианты, число которых зависит от количества взаимодействующих ЛС и определяется конечным комбинаторным множеством [4]. Вычисленные комбинаторные характеристики позволяют оценивать относительную вероятность вариантного разнообразия и, следовательно, вероятность токсикологического взаимодействия. Так, в 3-компонентной комбинации комбинаторное разнообразие однопарных и многопарных сочетаний увеличивается в 7 раз по сравнению с 2-компонентной комбинацией. В 4-компонентной комбинации — уже в 63 раза, в 5-компонентной комбинации — в 1023 раза, в 6-компонентной комбинации — более чем в 32 тысячи раз. Далее при увеличении комбинации от 7 до 10 компонентов количество вариантов увеличивается в миллионы (10^6), миллиарды (10^9) и триллионы (10^{12}) раз. Подобная прогрессия комбинаторного фактора свидетельствует о резком возрастании вероятности взаимодействия и прогностической неопределенности фармакодинамических и токсических эффектов поликомпонентных комбинаций. Многочисленные наложения разнонаправленных векторов токсичности и фармакокинетики, меняющихся при изменении уровня и соотношения доз компонентов, могут стать причиной своеобразной фармако- и токсикодинамической аморфности комбинации и парадоксальных эффектов. Теоретически оптимальной следует считать лекарственную комбинацию, содержащую не более 3-х активных компонентов. Исключения могут составлять комбинации из «малотоксичных» или «практически нетоксичных» веществ (при соответствии уравнению аддитивности) или рациональные комбинации, в которых взаимодействие сопровождается доказанным снижением токсичности компонентов.

Доклиническая оценка безопасности комбинаций ЛС может быть вполне адекватной лишь в том случае, если при экспериментальном исследовании и прогнозировании анализируются не только суммарные токсические эффекты комбинации как некой единой субстанции, но и оценивается возможное токсикологическое взаимодействие ее отдельных компонентов. Принципиальное отличие комбинации ЛС от индивидуального фармакологического вещества заключается в том, что компоненты лекарственной комбинации имеют собственные различные фармакокинетические и фармакодинамические характеристики, поэтому в разных диапазонах доз могут оказывать разные эффекты и по-разному взаимодействовать друг с другом. Вследствие этого отдельные эффекты взаимодействия в многокомпонентных комбинациях могут иметь несколько или множество порогов при разных дозовых соотношениях. При формальной оценке токсичности комбинации ЛС без анализа взаимодействия невозможно выявить причины таких эффектов и провести коррекцию токсического взаимодействия.

Исходя из теоретических предпосылок механизма ЛВ, нельзя полностью исключить риск неблагоприятных эффектов возможного токсикологического взаимодействия ЛС даже в известных комбинациях при изменении количественного соотношения активных компонентов и тем более при изменении качественного состава комбинации. В связи с этим полное доклиническое изучение токсичности комбинации следует считать с точки зрения безопасности предпочтительным во всех случаях.

Многообразие практических задач, связанных с необходимостью оценки безопасности ЛВ на этапе разработки комбинированных препаратов, послужило причиной развития аналитического направления *прогнозирования риска* токсикологического взаимодействия ЛС. С другой стороны, неизбежность использования методов прогнозирования связана с методологической громоздкостью экспериментов, пригодных для анализа токсикологического взаимодействия ЛС в многокомпонентных комбинациях.

Анализ данных научной литературы и опубликованных методических документов также указывает на то, что в настоящее время наиболее адекватным для оценки безопасности комбинаций ЛС принято считать подход, включающий наряду с экспериментальной оценкой и анализ факторов риска взаимодействия [5, 6]. Предлагается выделять два взаимосвязанных направления: а) прогнозирование токсикологического взаимодействия комбинации ЛС и б) экспериментальное исследование комбинации ЛС.

2. Прогнозирование токсикологического взаимодействия ЛС

Прогнозирование основано на анализе имеющихся сведений о безопасности аналогичных комбинаций и всей доступной информации о свойствах одновременно применяемых ЛС, имеющих прямое или косвенное отношение к возможному токсикологическому взаимодействию. Результатом прогнозирования является предварительная оценка риска токсикологического взаимодействия и определение *ожидаемого профиля токсичности комбинации*. Основной аналитический прием прогнозирования основан на оценке факторов риска и выявлении у компонентов комбинации сходных свойств, параметров, эффектов, общих субстратов и мишеней воздействия. Прогнозирование может эффективно использоваться на начальных этапах разработки новых комбинаций ЛС, а также для экспертной оценки риска токсикологического взаимодействия компонентов комбинаций ЛС при отсутствии достаточного экспериментального и клинического обоснования их безопасности.

Прогнозирование не заменяет экспериментальной и клинической оценки безопасности комбинаций ЛС, а лишь служит обоснованием оптимизации программы доклинического токсикологического изучения или возможности клинического применения комбинации ЛС при допустимом уровне риска токсикологического взаимодействия. Следует также иметь в виду, что в случаях, когда не проводятся токсикологические исследования комбинации, уровень достоверности прогноза может оказаться недостаточным для применения комбинации у пациентов.

При прогнозировании оцениваются и анализируются следующие аспекты безопасности и факторы риска ЛВ.

1. Имеющаяся информация о применении данной или аналогичной комбинации (клинические и экспериментальные данные).

2. Имеющаяся информация об отдельных компонентах комбинации (клинические и экспериментальные данные; фармакокинетические, фармакологические и токсические свойства).

3. Возможность фармакокинетического взаимодействия (конкуренция, индукция или ингибирование изоферментов цитохрома Р450, механизмы всасывания, распределения, связывания, выведения; значение основных фармакологических параметров, кумуляция).

4. Возможность фармакологического взаимодействия (механизм действия, эффекты, органы-мишени, специфическая активность, фармакологическая безопасность).

5. Возможность токсикологического взаимодействия (органы-мишени, токсические эффекты, токсикодинамика, токсикокинетические параметры).

6. Широта терапевтического действия комбинации и отдельных компонентов (диапазон безопасных и токсических доз).

7. Режим дозирования ЛС в комбинации (соответствие уравнению аддитивности; способ введения, доза, курс).

8. Комбинаторный фактор (число вариантов взаимодействия, зависящее от количества компонентов в комбинации и характеризующее состоятельность прогноза эффектов ЛВ).

9. Состояние гомеостатических систем (показания к применению комбинации; целевая популяция пациентов, возраст, пол, группы риска).

10. Возможное снижение терапевтической эффективности ЛС, которые применяются при состояниях, представляющих угрозу для жизни человека.

Необходимо отметить, что при прогнозировании особое внимание уделяется анализу данных по фармакокинетическому (метаболическому) взаимодействию, что обусловлено реальным значением этого механизма и отчасти широким применением фармакокинетических исследований в клинической фармакологии.

2.1. Интерпретация результатов прогнозирования токсикологического взаимодействия

Отсутствие количественных критериев для большинства перечисленных факторов риска не позволяет получить строго определенное числовое выражение абсолютного интегрального риска токсикологического взаимодействия компонентов комбинации. Представляется возможным лишь определение относительных параметров. Следует также учитывать, что при прогнозировании степень детализации и глубина анализа потенциальных взаимодействий может существенным образом различаться в зависимости от применяемого аналитического аппарата, адекватности имеющейся информации и субъективности оценки факторов риска. В связи с этим количественная оценка риска токсикологического взаимодействия как параметра на этапе прогнозирования представляется достаточно проблематичной. Вместе с тем при прогнозировании могут быть использованы отдельные количественные элементы для оценки относительного риска (количество выявленных факторов риска взаимодействия, соотношение доз компонентов комбинации с параметрами их токсичности и др.).

3. Экспериментальное исследование комбинаций ЛС

Экспериментальное токсикологическое исследование предполагает получение наиболее доказательной доклинической информации о профиле токсичности как фиксированных, так и нефиксированных комбинаций ЛС. Экспериментальное изучение общетоксического действия (с токсикокинетическими исследованиями) и специфических видов токсичности комбинации ЛС с помощью стандартных методов лекарственной токсикологии позволяет оценить характер и выраженность ЛВ. Рекомендуется также проводить исследования фармакологической безопасности (влияние на функцию ССС, дыхательной системы, ЦНС). Для выяснения механизма взаимодействия проводят исследования фармакокинетики отдельных компонентов и комбинации. Необходимо отметить, что сведения о влиянии ЛС на активность метаболизирующих ферментов цитохрома Р450 в настоящее время признаются наиболее важными для прогнозирования фармакокинетического механизма взаимодействия. Рекомендуется использовать данные о фармакокинетике и метаболизме компонентов комбинации на этапе прогнозирования ЛВ.

3.1. Выбор программы экспериментального исследования комбинации

Стандартная программа. Исследование токсических свойств комбинации ЛС и отдельных компонентов, включающее изучение общетоксического действия (острая токсичность и субхроническая токсичность) и специфических видов токсичности (мутагенность, репродуктивная токсичность, аллергизирующее действие, иммунотоксичность, канцерогенность). Полное токсикологическое исследование комбинации может быть рекомендовано для оригинальных комбинаций, состоящих из новых, малоизученных компонентов, или для новых комбинированных препаратов, которые предназначены для широкого медицинского применения (в т.ч. безрецептурного).

Оптимизированная программа. Исследование токсических свойств комбинации ЛС и отдельных компонентов в экспериментах проводится в сокращенном объеме, с учетом имеющихся сведений о доклиническом и клиническом изучении и медицинском применении комбинации и отдельных ЛС (в т.ч., для устранения «пробелов» предшествовавших токсикологических исследований). Сокращенные исследования могут быть использованы для обоснования безопасности КИ или ограниченного медицинского применения в случаях, когда польза может значительно превышать риск потенциального токсикологического взаимодействия.

3.2. Общетоксическое действие

Острая токсичность. Формальное изучение острой токсичности фиксированной комбинации малоинформативно. Наиболее полную информацию о токсикологическом взаимодействии и, следовательно, о безопасности комбинации дает анализ результатов изучения острой токсичности лекарственной комбинации по Финни [10]. Метод позволяет оценить наличие и характер токсикологического взаимодействия ЛС в многокомпонентных комбинациях с использованием уравнения аддитивности: $1/ЛД_{50(ABC)} = fa/ЛД_{50(A)} + fb/ЛД_{50(B)} + fc/ЛД_{50(C)}$, где $ЛД_{50(ABC)}$ – гипотетическое значение ожидаемой летальной дозы ($ЛД_{50}$) комбинации А+В+С, соответствующее условию аддитивности токсического действия компонентов комбинации; fa, fb, fc – дозировки компонентов А, В, С в комбинации, выраженные в долях от суммарной дозировки комбинации, принятой за единицу; $ЛД_{50(A)}$, $ЛД_{50(B)}$, $ЛД_{50(C)}$ – экспериментально определяемые, фактические значения летальных доз ($ЛД_{50}$) отдельных компонентов комбинации (А, В, С). В зависимости от соотношения гипотетического значения $ЛД_{50}$ комбинации, вычисленной по формуле на основании $ЛД_{50}$ отдельных компонентов, и фактического, экспериментально определяемого значения $ЛД_{50}$ комбинации делается один из трех выводов:

1) *Отсутствие токсикологического взаимодействия.* Отношение $ЛД_{50(гип)}/ЛД_{50(факт)}$ равно или близко к 1. Токсичность компонентов в комбинации может суммироваться, т.е. соответствует первичной гипотезе аддитивного синергизма.

2) *Токсикологическое взаимодействие по типу антагонизма.* Отношение $ЛД_{50(гип)}/ЛД_{50(факт)}$ равно или меньше 0,57, т.е. возможно снижение токсичности компонентов в комбинации.

3) *Токсикологическое взаимодействие по типу потенцирования.* Отношение $ЛД_{50(гип)}/ЛД_{50(факт)}$ равно или более 1,75, т.е. возможно повышение токсичности компонентов в комбинации.

При сравнительном или формальном изучении острой токсичности комбинации целесообразно оценивать также характер и динамику развития симптомов интоксикации, что позволит использовать дополнительные параметры токсического действия и выявить новые эффекты, обусловленные взаимодействием. Сравнительный дизайн изучения острой токсичности поликомпонентных комбинаций может оказаться чересчур громоздким и трудновыполнимым.

Субхроническая токсичность. От дизайна исследования комбинации ЛС в значительной степени зависит информативность эксперимента. Основной аналитический принцип исследования комбинаций ЛС заключается в сравнении токсических эффектов комбинации ЛС с эффектами отдельных ЛС, входящих в состав комбинации. Для упрощения дизайна сравнительного исследования многокомпонентных комбинаций, содержащих более 3-х активно действующих компонентов, рекомендуется для сравнения использовать не все, а лишь наиболее значимые компоненты (исключая малотоксичные, малоактивные или количественно несущественные компоненты, выполняющие вспомогательную роль адьювантов).

При изучении фиксированных комбинаций ЛС обычно используют не менее 2–3 доз. Отдельные компоненты в группах сравнения могут быть изучены лишь в одной дозе, соответствующей максимальной дозе комбинации.

При изучении нефиксированных комбинаций ЛС (из 2-х компонентов) рекомендуется оценить токсические эффекты одновременного применения ЛС при разных соотношениях доз компонентов (эквитоксические дозы, эквитерапевтические дозы, сочетание терапевтических и максимальных переносимых доз) в сравнении с действием отдельных компонентов. Рекомендуется также оценить токсические эффекты последовательного применения ЛС с изменением очередности применения в сравнении с действием отдельных компонентов.

Исследования общетоксического действия комбинаций обычно проводят на одном виде животных обоего пола (острая токсичность, субхроническая токсичность до 3 месяцев). Для углубленного изучения оригинальных комбинаций целесообразно использовать несколько видов животных.

3.3. Специфическая токсичность

Экспериментальное изучение специфических видов токсичности позволяет получить формальную оценку спектра специфической токсичности комбинации (мутагенность, репродуктивная токсичность, а также аллергизирующее действие, иммунотоксичность, канцерогенность) и выявить эффекты возможного токсикологического взаимодействия компонентов при сравнительном дизайне исследования. По результатам анализа имеющихся сведений об изучении специфической токсичности отдельных компонентов и оценке риска на этапе прогнозирования определяется оптимальная программа дополнительных экспериментальных исследований комбинации.

3.4. Оценка риска токсикологического взаимодействия по результатам токсикологического изучения комбинации ЛС

Изучение токсичности комбинации без сравнения с действием отдельных компонентов комбинации допустимо, но малоинформативно, поскольку не позволяет оценить характер и выраженность эффектов токсикологического взаимодействия. Теоретически возможно также сравнение результатов экспериментального изучения комбинации с литературными данными о токсичности компонентов, однако подобный анализ редко оказывается успешным из-за многочисленных несовпадений или отсутствия достаточной информации об условиях цитируемых экспериментов.

Экспериментальное изучение общетоксического действия комбинации в субхроническом эксперименте преследует две цели: а) оценить токсикологическую адекватность предлагаемого режима дозирования и профиль токсичности ЛС при комбинированном применении фиксированной или нефиксированной комбинации и б) выявить эффекты токсикологического взаимодействия и оценить их возможную клиническую значимость (сравнение ожидаемого прогнозируемого и фактического спектра токсичности комбинации).

При формальной оценке токсичности комбинации без сравнения с эффектами отдельных компонентов, как и для индивидуального вещества (монопрепарата), необходимо определить уровень высоких нетоксических доз (ВНГД, NOAEL) препарата для животных при многократном введении, экстраполяция которых с учетом межвидовых коэффициентов позволяет определить диапазон безопасных доз для человека.

Оценка степени риска токсикологического взаимодействия может оказаться наиболее информативной при изучении нефиксированной комбинации из 2-х компонентов. Так, в стандартном диапазоне из 3-х доз (терапевтической, максимально переносимой и промежуточной) определяется 5 степеней риска (см. табл.): максимальный риск токсикологического взаимодействия (5 степень) — когда эффект регистрируется при использовании терапевтических доз компонентов комбинации, и минимальный риск (1 степень) — когда эффект отсутствует или регистрируется только при использовании максимальных доз. Сходный прием можно использовать и для фиксированных комбинаций, однако исследуемым дозам будут соответствовать только 3 степени риска.

Оценка степени риска токсикологического взаимодействия в эксперименте

	Вещество А Доза I (терапевтическая)	Доза II (средняя)	Доза III (максимальная/ токсическая)
Вещество В Доза I	5	4	3
Доза II	4	3	2
Доза III	3	2	1

4. Оптимизация доклинических исследований комбинаций ЛС

Оптимизация доклинических исследований комбинаций ЛС — разработка методологически обоснованной рациональной программы токсикологических исследований комбинации ЛС на основе *прогнозирования токсикологического взаимодействия*. В оптимизированной программе могут отсутствовать те или иные рутинные тесты токсикологических исследований полной комбинации, которые заменены анализом соответствующих данных для ее части или отдельных компонентов. Очевидно, что прогностическая оценка не является адекватной заменой экспериментального исследования токсических свойств комбинации ЛС и может считаться допустимой лишь для случаев, когда ожидаемая польза ее применения превышает риск.

Программы доклинических исследований могут значительно различаться по дизайну и объему в зависимости от характеристики отдельных компонентов комбинации, наличия доклинического и клинического опыта их индивидуального и совместного применения, в том числе по предлагаемым показаниям. При отсутствии опыта применения комбинации, даже если индивидуальные компоненты известны, могут потребоваться дополнительные исследования для оценки ожидаемых эффектов и выявления новых эффектов токсикологического, фармакологического или фармакокинетического взаимодействия.

При определении тактики и объема доклинических исследований предлагается рассматривать следующие случаи:

1. Комбинации ЛС, разрешенных к применению в качестве комбинированной терапии (препараты разрешены для совместного применения в клинике).
2. Комбинации ЛС, разрешенных к медицинскому применению, но не разрешенных в качестве комбинированной терапии.
3. Комбинации ЛС, содержащие одно или несколько новых активных веществ (к ним относятся комбинации нового вещества с известными ЛС, и комбинации двух или более новых активных веществ).

4.1. Планирование оптимизированного исследования

4.1.1. Комбинации из ЛС, разрешенных для совместного применения по стандартным схемам комбинированной фармакотерапии

Если имеется достаточно полная и хорошо документированная информация об опыте индивидуального и комбинированного применения компонентов комбинации, проведение дополнительных исследований общетоксического действия на животных может не потребоваться. Исследования специфической токсичности проводятся при необходимости с учетом пользы и риска. Предполагается, что достоверные клинические данные позволяют оценить потенциальные общетоксические, алергизирующие и иммунотоксические свойства комбинации. В то же время, при КИ нельзя адекватно оценить мутагенные, репротоксические и канцерогенные свойства комбинации.

Если комбинация состоит из ЛС того же класса, что и компоненты, входящие в состав хорошо изученных комбинаций, которые применяются в клинике и при этом не установлены фармакокинетические взаимодействия, дополнительные доклинические исследования также могут не потребоваться. В этих случаях дополнительные исследования могут быть рекомендованы при отсутствии тех или иных сведений о токсичности отдельных компонентов.

4.1.2. Комбинации из ЛС, разрешенных к медицинскому применению, но не использующиеся в стандартных схемах комбинированной фармакотерапии

Для этих комбинаций, несмотря на то, что безопасность и эффективность отдельных компонентов достаточно подробно и адекватно была представлена при регистрации, некоторые аспекты, относящиеся к ожидаемым и неожиданным взаимодействиям, могут потребовать дополнительного исследования. Если целью создания комбинации является полезное токсикологическое, фармакодинамическое или фармакокинетическое взаимодействие, этот эффект должен быть документально подтвержден. Соответствующие доклинические исследования должны быть частью обоснования этого взаимодействия.

4.1.3. Комбинации ЛС, содержащие одно или несколько новых активных веществ

Для новых активных веществ, разрабатываемых с целью использования в фиксированных комбинациях ЛС или для комбинированной терапии с другими ЛС, применяются два подхода: 1) полное доклиническое исследование каждого активного вещества и ограниченное исследование комбинации с учетом результатов прогнозирования риска токсикологического взаимодействия; 2) полное доклиническое исследование комбинации и менее подробное исследование нового активного вещества (этот вариант целесообразно применять к разработке рациональных фиксированных комбинаций).

4.2. Сроки проведения доклинических исследований комбинаций ЛС

При рассмотрении вопроса о сроках завершения отдельных этапов доклинического изучения безопасности комбинации в зависимости от фазы КИ следует руководствоваться действующими требованиями регуляторных органов РФ, общепринятыми правилами качественной клинической практики (GCP), а также международными гармонизированными рекомендациями (ICH M3) [9].

5. Интерпретация результатов

Результаты адекватной доклинической оценки безопасности лекарственных комбинаций должны содержать прогностическое и полноценное экспериментальное обоснование:

- 1) токсикологической совместимости ЛС в комбинации;
- 2) профиля токсичности комбинации;
- 3) характера и риска токсикологического взаимодействия;
- 4) безопасности режима дозирования отдельных ЛС и комбинации в целом;
- 5) специальных рекомендаций по безопасному применению данной комбинации;
- 6) ожидаемой клинической пользы данной комбинации ЛС, подтверждающей целесообразность ее применения.

Заключение

Предлагаемый комплексный методологический подход включает прогнозирование взаимодействия компонентов лекарственных комбинаций и экспериментальное токсикологическое изучение лекарственных комбинаций.

Прогнозирование токсикологического взаимодействия позволяет до эксперимента получить предварительную характеристику потенциального взаимодействия компонентов лекарственной комбинации на основании анализа имеющихся факторов риска и сход-

ства их свойств. Результаты прогнозирования позволяют оптимизировать программу экспериментальных доклинических исследований безопасности комбинации ЛС, определяя необходимость или нецелесообразность проведения дополнительных исследований токсичности комбинации с учетом задач и фазы КИ. Прогнозирование может играть и самостоятельную роль при разработке рациональных комбинаций и решении других научно-прикладных задач. Принципиальное значение прогнозирования заключается в том, что оно позволяет выявить важные дополнительные риски токсикологического взаимодействия, которые могут не проявиться в рутинных экспериментах на животных. Вместе с тем необходимо учитывать, что гипотетическая сущность прогнозирования в большинстве случаев не позволяет рассматривать его в качестве полноценной замены экспериментальных исследований.

Экспериментальное изучение токсичности комбинации ЛС является основным источником наиболее достоверной информации о потенциальных токсических свойствах комбинации ЛС и эффектах взаимодействия, включая токсические эффекты, которые не мониторируются в клинике. Необходимость полноценного доклинического изучения токсических свойств новой комбинации ЛС обусловлена тем, что комбинированный препарат следует рассматривать как оригинальное комплексное вещество, которое обладает уникальными фармакологическими, фармакокинетическими и токсическими свойствами. Рекомендуемая стандартная программа токсикологических исследований включает изучение общетоксического действия (в остром и субхроническом эксперименте) и специфических видов токсичности комбинации ЛС и отдельных компонентов комбинации, что позволяет выявить и оценить эффекты токсикологического взаимодействия.

Оптимизация экспериментальных исследований. Поскольку прогнозирование имеет значительно более низкий уровень доказательности, чем экспериментальное исследование, сокращение стандартной программы токсикологических исследований можно считать допустимым лишь при определенных условиях. Сокращение программы доклинических исследований безопасности комбинаций ЛС возможно только при адекватном соотношения пользы и риска. Следует подчеркнуть, что практика использования оптимизированных программ нередко вступает в противоречие с базовыми принципами доказательности доклинических исследований безопасности ЛС, поэтому ее применение следует считать обоснованным лишь на определенных этапах полноценного токсикологического изучения комбинированного ЛС.

Поскольку необходимость проведения дополнительных токсикологических исследований определяется особенностями конкретной комбинации ЛС, условиями ее применения или стадией клинической разработки, предметом экспертной оценки являются не только результаты исследований, но и адекватность самой оптимизированной программы.

Литература

1. Молекулярные механизмы взаимодействия лекарственных средств / Под ред. М.А. Пальцева, В.Г. Кукеса, В.П. Фисенко. — М.: АстраФармСервис, 2004.
2. Общая токсикология / Под ред. Б.А. Курляндского и В.А. Филова. — М.: Медицина, 2002.
3. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — 2-е изд., пер. и доп. / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина, 2005.
4. Гуськова Т.А., Сюбаев Р.Д. Влияние комбинаторного фактора на достоверность теоретического прогноза эффектов многокомпонентного токсикологического взаимодействия // Токсикологический вестник. — 2003. — № 4. — С. 2–11.
5. Сюбаев Р.Д. Принципы прогнозирования и экспериментальной оценки токсических эффектов лекарственного взаимодействия // Материалы II Всероссийского съезда фармацевтических работников. — Сочи, 2005. — С. 144–145.
6. Сюбаев Р.Д. Гармонизация подходов к доклинической оценке безопасности лекарственного взаимодействия // III съезд токсикологов России 2–5 декабря 2008 г.: Тезисы докладов. — С. 528–529.

7. Guidance for Industry Nonclinical Safety Evaluation of Drug or Biologic Combinations. FDA, CDER, March 2006.
8. Guideline on the non-clinical development of fixed combinations of medicinal products. London, 24 January 2008 (Doc. Ref. EMEA/CHMP/SWP/258498/2005).
9. ICH Guidance on Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials and Marketing Authorization for Pharmaceuticals M3(R2), January 2010.
10. Finney D.J. A statistical treatment of the sigmoid response curves/ Probit analysis. 2nd ed. — Cambridge, Univ. Press, 1952, p. 131–140.
11. Loewe S. «The Problem of Synergism and Antagonism of Combined Drugs» *Arzneimittel-Forsch.*, 1953, 3, 285–290.

ГЛАВА 11

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ БЕЗОПАСНОСТИ ВСПОМОГАТЕЛЬНЫХ ВЕЩЕСТВ В ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТАХ

Составители: к. м. н. Р.Д. Слюбаев; к. б. н. Г.Н. Енгалычева; к. б. н. А.Н. Васильев; д. м. н. О.Л. Верстакова; д. фарм. н., проф. Н.Д. Бунятян

Введение

Безопасность лекарственной терапии во многом зависит от соответствия современным стандартам всех этапов разработки ЛП, обеспечивающих качество его производства (GMP), а также полноценную доклиническую (GLP) и клиническую (GCP) оценку безопасности. Доклиническая оценка безопасности ЛП включает не только экспериментальное токсикологическое изучение субстанции нового фармакологического средства и лекарственной формы оригинального или воспроизведенного препарата (генерика), но также фармацевтическое и токсикологическое обоснование качественного и количественного состава препарата. При этом анализируются сведения о токсических свойствах и качестве активных и неактивных ингредиентов, их фармацевтической совместимости, безопасной дозировке, возможном фармакокинетическом, фармакологическом и токсикологическом взаимодействии, побочном действии, противопоказаниях и показаниях к применению конкретного препарата. Вспомогательные вещества (ВВ) — это фармацевтические ингредиенты лекарственной формы, которые в отличие от субстанции активного действующего вещества в используемых дозах не обладают терапевтической активностью и являются относительно безопасными. Содержание ВВ в препарате нередко многократно превышает содержание активного вещества. ВВ выполняют разнообразные фармацевтические функции: растворителя, консерванта, наполнителя, разрыхлителя, красителя, ароматизатора, корректора pH, модификатора высвобождения, пенетранта или др. Вместе с тем ВВ могут оказывать влияние на фармакологическую активность, токсичность и фармакокинетику активного вещества и обладать потенциальными токсическими свойствами. При определенных условиях (при передозировке, кумуляции, длительной экспозиции, взаимодействии с другими компонентами лекарственной формы, повышенной чувствительности пациента, наличии токсичных примесей) токсический потенциал ВВ может привести к развитию неблагоприятных реакций и серьезных осложнений. Следует отметить, что примеси и контаминанты, содержание которых контролируют при оценке фармацевтического качества препарата, сами не относятся к ВВ. За рубежом при разработке препаратов, как правило, используются ВВ фармакопейного качества, применяется достаточно жесткий регламент оценки безопасности новых ВВ. Согласно общим рекомендациям, содержащимся в «Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ» (2005), необходимо проводить доклинические исследования безопасности новых ВВ в полном объеме как для оригинальных ЛС. Вместе с тем отсутствие специальных методических рекомендаций не позволяет применять обобщенную тактику решения практических вопросов безопасности ВВ, которая отражающую современное состояние этой важной научной проблемы.

Актуальность разработки данных методических рекомендаций обусловлена также распространенной практикой использования в ЛП ВВ не фармакопейного качества или новых ингредиентов, не имеющих адекватной токсикологической характеристики.

Настоящие методические рекомендации представляют собой руководство по оценке профиля безопасности новых ВВ, применяемых в качестве компонентов лекарственных и биологических препаратов. Методические рекомендации предназначены для разработчиков и производителей фармацевтической продукции (в т.ч. разработчиков новых ВВ), Методические рекомендации отражают международный опыт и современную позицию официальных экспертных органов в отношении требований к доклинической оценке безопасности ВВ и унификации подходов экспертных учреждений и регуляторных органов. При разработке методических рекомендаций были использованы отечественные методические документы, литературные данные и зарубежные руководства по лекарственной токсикологии (FDA, ICH).

1. Основные принципы оценки безопасности вспомогательных веществ

Термин ВВ означает любые неактивные ингредиенты, которые специально включают в лекарственные и диагностические препараты для придания лекарственной форме необходимых фармацевтических свойств, обеспечивающих гарантированную эффективность и безопасность применения ЛС пациентом. Обычно предполагается фармакологическая инертность ВВ, хотя они применяются также и с целью изменения биодоступности активного вещества. Важнейшим фактором риска применения многих ВВ является отсутствие полноценной характеристики их безопасности в отношении уровня и продолжительности экспозиции, пути введения, взаимодействия с другими компонентами лекарственной формы.

В зависимости от характера использования ВВ методические рекомендации рассматривают разные категории препаратов, для которых применяются существенно отличающиеся подходы к оценке безопасности. Выделены вопросы, связанные с оценкой безопасности ВВ в безрецептурных и воспроизведенных препаратах; определена стратегия исследования препаратов, предназначенных для кратковременного, непродолжительного и длительного применения. Рассматриваются также рекомендуемое токсикологическое тестирование ингаляционных, инъекционных лекарственных форм и препаратов для местного применения.

2. Представление данных по безопасности

Практически все ЛП не могут быть произведены без использования ВВ. Досье на препарат должно содержать полную информацию о составе и качестве ВВ с указанием их фармацевтической функции. Таблетки, капсулы, суспензии и другие лекарственные формы содержат одно или более ВВ. Используемые ВВ могут выполнять специальные функции, например в препаратах с замедленным высвобождением или для увеличения пенетрации активного вещества через кожу. В большинстве случаев целесообразно представлять обоснование качественного и количественного состава лекарственной формы с позиции безопасности (совместимость компонентов, допустимые дозы, ограничения к применению). Для новых ВВ важно оценить риск и пользу применения в препарате и установить допустимые и безопасные нормы для этих веществ. Это требует оценки их безопасности по базам данных и адекватного экспериментального исследования. При разработке препарата часто становится возможной весьма рациональная оценка токсичности ВВ. Так, например, может оказаться целесообразным включение в исследование дополнительных групп животных для изучения ВВ при оценке токсичности активной субстанции препарата. При этом допускается, что существующие клинические данные для некоторых ВВ могут заменять некоторые токсикологические данные, а для ВВ, о которых имеются документированные данные о предшествующем применении у людей при условиях, соответствующих предлагаемому использованию, выполнение полной батареи токсикологических исследований вообще может не потребоваться. При определении адекватности программы доклинических исследований ВВ принимаются во внимание такие факты, как использование ВВ в составе разрешенных ЛП или в качестве

пищевых добавок. При определенных условиях (например, одинаковый путь введения, уровень экспозиции, популяция пациентов, продолжительность экспозиции) предшествующее применение может вполне адекватно характеризовать безопасность ВВ. Вместе с тем, может быть необходим дополнительный анализ информации в базах данных по ВВ для подтверждения их соответствия современным стандартам безопасности (например, представление дополнительных сведений о генотоксичности).

Доступная информация о предшествующем применении ВВ в свете нового использования также учитывается при экспертной оценке безопасности препарата. При этом важно отметить, что включение ВВ в фармакопейные монографии или другие документы, не означает, что ВВ имеет адекватную токсикологическую характеристику и безопасно для применения.

2.1. Безрецептурные препараты

Для ВВ в составе безрецептурных препаратов предъявляются наиболее жесткие требования к оценке безопасности ВВ, обусловленные широким и бесконтрольным применением этой категории ЛП. Одним из условий, гарантирующих стабильность токсикологических характеристик препарата, является неизменность его состава. В зарубежной практике это означает соответствие имеющейся ОТС-монографии на разрешенные безрецептурные препараты. Как правило, применяются наиболее безопасные, хорошо известные ВВ фармакопейного качества, имеющие полноценную токсикологическую характеристику. Исключается существенное изменение количественного и качественного состава ВВ, применение потенциально небезопасных или недостаточно изученных новых ВВ и новых комбинаций ВВ. При разработке новых препаратов для безрецептурного применения особенно тщательно анализируют все известные ограничения и рекомендации по безопасному использованию ингредиентов (в т.ч. противопоказания, допустимые и рекомендуемые безопасные дозы, фармацевтическую совместимость и др.), поскольку они могут служить дополнительными факторами риска при бесконтрольном применении. Кроме того, ВВ в используемых дозах не должны оказывать влияния на эффективность препарата или на тесты в исследованиях соответствия стандартам идентификации, содержания, качества, чистоты. Следует отметить также, что некоторые ВВ в зарегистрированных препаратах могут быть небезопасными для безрецептурного применения (например, некоторые токсичные вещества, используемые в противоопухолевых препаратах).

2.2. Воспроизведенные препараты

Требования к информации о безопасности ВВ в заявке на воспроизведенные, или генерические препараты включают представление сведений о полном количественном и качественном составе лекарственной формы. Необходимо отметить, что для генерических препаратов также применимы ограничения модификации состава ВВ. Так, в соответствии с зарубежными требованиями (FDA), генерические препараты, предназначенные для парентерального, офтальмологического или отологического использования, должны содержать те же ВВ и в тех же концентрациях, что и референсные зарегистрированные препараты, за исключением буферов, антиоксидантов и консервантов. При этом оговаривается, что заявитель обеспечивает идентификацию и характеристику различий состава ВВ и представляет информацию, демонстрирующую отсутствие влияния этих различий на безопасность предлагаемого препарата. Для других способов введения (например, местного кожного, перорального) не требуется соответствие состава ВВ в конечном продукте референсному препарату, однако используются, как правило, известные ВВ. Кроме того, необходимо указать предшествующие показания и популяцию пациентов, у которых была продемонстрирована безопасность этих ВВ. Отдельно предоставляется дополнительная информация, а также теоретическое или экспериментальное обоснование предлагаемого нового применения ВВ в составе конкретной лекарственной формы препарата.

2.3. Новые лекарственные средства и биологические препараты

Новые или недостаточно изученные ВВ, предлагаемые для использования в составе оригинальных препаратов, должны иметь в досье адекватные данные по оценке безопасности их применения. Эти данные могут быть представлены отдельно или в общем досье на препарат. Настоящие методические рекомендации содержат рекомендации по доклинической оценке безопасности ВВ, для которых отсутствуют достаточные сведения о применении у человека. Представляемые данные должны убедительно свидетельствовать о безопасности применения ВВ в составе препарата в используемых дозах.

2.4. Необходимость дополнительных данных о безопасности

Необходимы дополнительные сведения о безопасности ВВ, если предлагаемые условия их применения не вполне обоснованы представленными данными (объем исследований, путь введения, дозы, показания). Так например, могут потребоваться сведения о фармакокинетике ВВ, которые быстро всасываются или биотрансформируются. При необходимости могут быть запрошены также результаты исследования взаимодействия ВВ с активным веществом. Предлагаемые условия нового ВВ, например применение у детей, также может потребовать дополнительных токсикологических данных (влияние на развивающийся организм, специфическая токсичность).

2.5. Исключения

Экспертная практика показывает, что уникальность и специфика конкретного ВВ делает возможным рассмотрение обоснованных доводов, позволяющих изменять или сокращать программу доклинических исследований. Например, ускоренная или сокращенная оценка безопасности может быть оправдана в отношении ВВ, в препаратах для применения по жизненным показаниям, которые нуждаются в быстром внедрении. Напротив, неполная оценка профиля безопасности ВВ не может быть адекватной для препаратов, используемых для лечения нетяжелых заболеваний. При этом отдельные исследования безопасности вспомогательных веществ могут быть завершены и после регистрации препарата. В большинстве случаев следует считать недопустимым использование ВВ, не имеющих полноценной токсикологической характеристики безопасности, для препаратов, которые применяются с целью профилактики, при беременности, у детей и для безрецептурных лекарств. С другой стороны, некоторые ВВ, такие как полимерные соединения, которые отличаются от ранее разрешенных ВВ только молекулярной массой (длиной цепи), могут быть изучены по сокращенной программе с меньшим, чем для нового вещества, объемом данных о безопасности при условии, что новое ВВ имеет значительное сходство с ранее изученным ВВ по физическим параметрам, фармакокинетике и содержанию неактивных мономеров и других примесей.

3. Рекомендуемая стратегия оценки безопасности нового вспомогательного вещества в лекарственных препаратах

Основные токсикологические исследования ВВ рекомендуется проводить в соответствии с принятыми стандартными протоколами и правилами GLP. Приведенные ниже рекомендации по доклинической оценке безопасности в основном относятся к ВВ, для которых отсутствуют адекватные сведения о применении у человека.

3.1. Фармакологическая безопасность

Для потенциальных новых ВВ рекомендуется полноценное изучение фармакологической активности с использованием батареи стандартных тестов оценки влияния на основные системы организма: ССС, дыхательную, ЦНС (см. также международное руководство ICH S7A). Эта оценка может быть выполнена в рамках токсикологических исследований или отдельного изучения фармакологической безопасности. Важно, чтобы эти данные были получены на ранних стадиях оценки безопасности фармакологического

вещества, поскольку, если будет обнаружено, что ВВ фармакологически активно, эта информация может оказать существенное влияние на перспективы дальнейшей разработки препарата.

3.2. Потенциальные ВВ, предлагаемые для кратковременного применения

Рекомендуемая программа оценки безопасности потенциальных ВВ, предназначенных для использования в препаратах, срок применения которых ограничен курсом 14 дней и менее или для эпизодического редкого применения, должны включать по меньшей мере следующие исследования:

1. Исследование острой токсичности, проведенные на грызунах и негрызунах при способе введения, рекомендуемом для клинического применения. Необходимо определить ЛД₅₀ ВВ. В некоторых случаях исследования острой токсичности могут быть исключены из программы доклинической оценки безопасности нового ВВ. Так, если при изучении хронической токсичности наивысшая доза является предельной (например, 2 г/кг или 2% в корме) и при этом наблюдаются незначительные токсические эффекты или их отсутствие, можно полагать, что острая токсичность вполне адекватно оценена. В некоторых случаях исследование с повышением доз также рассматривается как приемлемая альтернатива оценке острой токсичности (см. международное руководство ICH M3).

2. Рекомендуются доклинические фармакокинетические исследования ВВ (всасывания, распределения, метаболизма и выведения) при том же клиническом способе введения и на тех же видах животных, что и при доклинических исследованиях безопасности (см. также международные руководства ICH S3A и S3B).

3. Рекомендуются изучение ВВ в стандартной батарее тестов на генотоксичность (см. также международное руководство ICH S2B).

4. Рекомендуются изучение субхронической токсичности продолжительностью 1 месяц, выполненное как на грызунах, так и на негрызунах при способе введения, предлагаемом для клинического применения, с полным патоморфологическим исследованием (макро- и микроскопия). Также целесообразно провести токсикокинетические исследования.

5. Рекомендуемые исследования репродуктивной токсичности включающие оценку влияния: (1) на фертильность; (2) на эмбриофетальное развитие; (3) влияние на пренатальное и постнатальное развитие потомства, а также влияние на материнский организм (см. также международные руководства ICH S5A и S5B).

3.3. Потенциальные ВВ, предназначенные для непродолжительного применения

Для доклинической оценки безопасности потенциальных новых ВВ, предназначенных для использования в ЛП, применяемых от 2 недель до 3 месяцев (в том числе по сумме отдельных эпизодов и периодов лечения), рекомендуются следующие исследования:

1. Все исследования из разделов 3.1 и 3.2, за исключением 1-месячных токсикологических исследований. Примечание: имеющиеся данные о токсическом или выраженном биологическом действии в 1-месячном исследовании могут быть полезны для выбора доз для 3-месячного исследования.

2. Рекомендуются исследование субхронической токсичности в течение 3 месяцев как на грызунах, так и на млекопитающих негрызунах при соответствующем способе введения с полным патоморфологическим исследованием. Рекомендуются также провести токсикокинетические исследования.

3. Могут потребоваться и дополнительные исследования (например, исследования при парентеральном введении). Необходимость предоставления дополнительных данных обычно вытекает из результатов выполненных исследований.

3.4. Потенциальные ВВ, предназначенные для длительного применения

Рекомендуется следующая программа доклинического изучения безопасности новых ВВ, которые предназначены для использования в ЛП, применяемых длительно — более 3 месяцев (непрерывно или по сумме отдельных эпизодов и курсов лечения при хронических заболеваниях):

1. Рекомендуется исследование 6-месячной хронической токсичности на грызунах при соответствующем способе введения. Важно, чтобы эти исследования включали полную клиническую патологию, гистопатологию и токсикокинетический анализ. При изучении малотоксичных ВВ при основном способе введения необходимо использовать в качестве высшей дозы предельную дозу (2 г/кг и 2% от корма). Важно, чтобы хронические исследования были выполнены и на млекопитающих негрызунах при соответствующем способе введения. Если токсические и фармакологические эффекты отсутствуют в субхронических экспериментах, может быть достаточен эксперимент продолжительностью 6 месяцев. Когда обнаружены токсические эффекты в исследованиях меньшей продолжительностью или у грызунов, рекомендуются хронические исследования на негрызунах от 9 до 12 месяцев.

2. Все исследования из раздела 3.1, 3.2 и 3.3 настоящих методических рекомендаций. Следует отметить, что 1- и 3-месячные токсикологические исследования не могут быть использованы для подбора доз в хроническом эксперименте.

3. Для оценки канцерогенного потенциала может быть применен один из следующих подходов (см. также международное руководство ICH S1A):

а. Двухлетнее исследование канцерогенности на 2-х видах животных при соответствующем пути введения.

б. Двухлетнее канцерогенное исследование на одном виде грызунов плюс альтернативные исследования (например, соответствующие исследования на новорожденных или трансгенных животных) на различных видах грызунов.

с. Предоставление документов, содержащих научное подтверждение нецелесообразности канцерогенных исследований. Например, отсутствие мутагенных свойства (см. также международное руководство ICH S2B), ограниченная системная экспозиция, отсутствие кумуляции по доклиническим и клиническим данным фармакокинетики, отрицательные гистопатологические данные в исследованиях хронической токсичности, выполненных с использованием максимальных допустимых доз, отсутствие пренеопластических повреждений и других токсических эффектов, сведения о безопасности аналогичных ВВ того же класса может быть приемлемым основанием нецелесообразности канцерогенных исследований. Решение, основанное на адекватности этого подхода, должно быть принято в каждом конкретном случае с использованием критериев доказательности. В других случаях адекватно выполненные исследования клеточной трансформации или 2-летнее исследование на крысах, или одно исследование на трансгенных животных (при отсутствии эффектов) могут быть достаточными для оценки канцерогенной безопасности.

3.5. Потенциальные ВВ для использования в ингаляционных, инъекционных или местно действующих препаратах

Рекомендуется следующая программа оценки безопасности новых ВВ, предназначенных для инъекционных, местных (накожных, интраназальных, интраоральных, офтальмологических, ректальных, вагинальных) или ингаляционных препаратов:

1. Все исследования из раздела 3.1, 3.2, 3.3 или 3.4 с использованием соответствующего способа введения. Также желательно изучить лекарственную форму препарата, предлагаемого для медицинского применения (если имеется информация о составе лекарственной формы к моменту начала этих исследований).

2. Исследование алергизирующего и иммунотоксического действия.

3. Для ВВ, предназначенных для применения в инъекционных лекарственных формах необходимо провести:

а. Исследования гемолитического действия *in vitro* в предлагаемых концентрациях для внутривенного введения (болюсного/инфузионного) для определения гемолитического потенциала ВВ.

б. Определение концентрации креатининкиназы в плазме для соответствующих концентраций ВВ в лекарственных формах для внутримышечного и подкожного введения, которое может быть использовано для оценки потенциального повреждении мышечной ткани.

с. Определение связывания с белками, влияющего на местную переносимость.

4. При изучении ВВ, предназначенных для местного применения, могут потребоваться токсикологические исследования как при рекомендуемом способе, так и при пероральном или парентеральном способе введения, если исследования клинической фармакокинетики проведены в условиях недостаточной экспозиции (или если системную экспозицию в клинике оценивали при другом способе введения).

5. Для местных дерматологических и офтальмологических препаратов целесообразно провести исследование с интраконъюнктивальным введением (оценку раздражения слизистой глаза).

3.6. Фотобезопасность

Рекомендуется проведение исследования фототоксического действия в соответствии с известными методическими руководствами. Исследованию подвергается ВВ или лекарственная форма, содержащая ВВ.

Заключение

Настоящие методические рекомендации предлагает гибкий методологический подход к оценке безопасности новых ВВ, учитывающий как способ применения ВВ в разрешенных препаратах, так и биологическую активность и физические свойства активного вещества. Анализ имеющихся сведений о безопасности ВВ позволяет оценить их достаточность, необходимость предоставления дополнительных данных или нецелесообразность проведения отдельных исследований.

Литература

1. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — 2-е изд., пер. и доп. / Под общ. ред. Р.У. Хабриева. — М.: Медицина, 2005.
2. Nonclinical Studies for the Safety Evaluation of Pharmaceutical Excipients, Guidance for Industry, (FDA) May 2005.
3. ICH Guidance: S1A, S2B, S5A,S5B, S7A, M3.

РАЗДЕЛ II

ДОКЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ ЭФФЕКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ГЛАВА 12

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ АНАЛЬГЕТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: д. м. н., проф. Т.А. Воронина; к. б. н. Л.С. Гузевых

Введение

Применяемые в настоящее время в лечебной практике болеутоляющие средства различаются по фармакологическим свойствам и механизму действия. В связи с этим для исследования новых анальгетиков в эксперименте и выбора эталонного препарата сравнения необходимы сведения о классификации болевых синдромов и особенностях действия препаратов, обладающих анальгетической активностью.

Международная ассоциация по изучению боли в зависимости от ведущего механизма, лежащего в основе их развития, разделила болевые синдромы на три основных группы: соматогенные (ноцицептивные), неврогенные и психогенные [29]. Соматогенные болевые синдромы возникают вследствие активации ноцицепторов при травме, воспалении, ишемии, растяжении тканей. Нейрогенная боль появляется при разрушении центральной (центральная боль) или периферической (нейропатическая боль) нервных систем. В случае неясной физиологической причины появления болевых симптомов боль называют психогенной. В зависимости от локализации повреждения соматогенная боль разделяется на соматическую поверхностную (повреждение кожных покровов), соматическую глубокую (при повреждении костно-мышечной системы) и висцеральную (при повреждении внутренних органов).

Физиологическая боль не является патологическим процессом до тех пор пока выполняет сигнальную функцию и запускает рефлекторные реакции, направленные на ограничение повреждения тканей. Однако после того как физиологическая функция исчерпывается, боль сама превращается в повреждающий фактор и становится патологической. Граница между физиологической и патологической болью достаточно условна и во многом определяется физическим и психическим состоянием организма.

Для соматогенных болевых синдромов характерно появление зон постоянной болезненности или повышения болевой чувствительности в месте повреждения. Первичная гипералгезия развивается в области поврежденной ткани, а вторичная локализуется вне зоны повреждения. Патологической основой первичной гипералгезии является сенситизация ноцицепторов (развитие нейрогенного воспаления, изменение фенотипа и повышение чувствительности ноцицепторов). Вторичная гипералгезия возникает в результате включения механизмов центральной сенситизации ноцицептивных нейронов (феномен «взвизчивания»). Терапия соматогенной боли обеспечивает ограничение поступления ноцицептивной импульсации из зоны повреждения (местные анестетики, бензодиазепины) и вышележащих структур ЦНС (мидокалм), подавление синтеза и секреции альгогенов (нестероидные противовоспалительные средства), снижение чувствительности ноцицепторов (агонисты α_2 -адренорецепторов), активацию структур антиноцицепции (опиоиды, антидепрессанты), устранение локусов болезненного мышечного напряжения (миорелаксанты, бензодиазепины, ботулинический токсин типа А) [6].

При повреждении периферических или центральных структур, связанных с проведением ноцицептивного сигнала, возникают неврогенные болевые синдромы (невралгия, каузалгия, фантомный болевой синдром, таламические боли). При неполном или ча-

стичном повреждении периферических нервов, сплетений или дорзальных корешков наблюдается острая периодическая пароксизмальная боль, подобная удару электрического тока, длящаяся несколько секунд. При полном повреждении боли имеют постоянный характер. В области болезненности, как правило, обнаруживают изменение тактильной, температурной и болевой чувствительности в виде парестезии (ощущение покалывания, онемения, ползания мурашек), дизестезии (извращение восприятия, когда тактильные и тепловые стимулы ощущаются как болевые и холодовые), гиперпатии (усиленные, долго длящиеся болезненные ощущения после прекращения действия обычных стимулов), аллодинии (болезненное ощущение в ответ на легкое механическое раздражение кисточкой кожных участков), гипер- и гипестезии (повышение и понижение чувствительности к различным видам раздражения). В отличие от соматогенных болевых синдромов нейрогенные боли чаще отсрочены (например, у человека могут возникать через 2–3 года после повреждения нервных структур). Повреждение периферических нервов сопровождается патохимическими, патофизиологическими и патоморфологическими процессами, приводящими к формированию в нерве участков пейсмеккерной активности, растормаживанию нейронов, возникновению перекрестного возбуждения в нервных волокнах и в нейронах дорзальных ганглиев, изменению нейрохимического фенотипа ноцицепторов, разрастанию периферических нервов и появлению в них механочувствительности, усилению эфферентной симпатической активности. Терапия нейрогенных болевых синдромов основывается на применении трициклических антидепрессантов (активация антиноцицептивных систем, снижение пейсмеккерной активности), антиконвульсантов (блокаторы потенциал-зависимых Na^+ -каналов и возбуждающих аминокислот), анксиолитиков (препараты усиливающие ГАМК-ергическое торможение) и местных анестетиков (блокаторы Na^+ -каналов). Опиоидные анальгетики при этом типе болей не эффективны [3].

Применяемые в настоящее время болеутоляющие средства можно разделить на следующие группы [7].

А. Вещества преимущественно центрального действия.

I. Опиоидные (наркотические) анальгетики:

1. Агонисты опиоидных рецепторов (морфин, промедол, фентанил).

2. Агонисты-антагонисты и частичные агонисты опиоидных рецепторов (бупренорфин, бутофанол, налбуфин, пентазоцин).

II. Неопиоидные средства центрального действия с анальгетической активностью:

1. α_2 – адреномиметики (клофелин).

2. Блокаторы Na^+ -каналов клеточных мембран (карбамазепин).

3. Ингибиторы обратного нейронального захвата моноаминов: серотонина и норадреналина (венлафаксин, милнаципран, дулоксетин).

4. Антагонисты рецепторов возбуждающих аминокислот (кетамин, мепантин).

5. Закись азота.

6. Блокаторы гистаминовых H_1 -рецепторов, проникающие через ГЭБ (димедрол).

7. ГАМКв-миметики (баклофен).

8. Блокаторы Ca^{2+} -каналов (L-типа: верапамил, нимодипин; N-типа: зиконотид).

9. Габапентин.

10. Ингибиторы циклооксигеназы преимущественно в ЦНС – ненаркотические анальгетики производные парааминофенола (парацетамол).

III. Анальгетики смешанного механизма действия (опиоидный и неопиоидный компоненты) – трамадол.

Б. Вещества преимущественно периферического действия. Ингибиторы циклооксигеназы (ЦОГ) в периферических тканях, а также в ЦНС (нестероидные противовоспалительные средства – НПВС):

1. Вещества неизбирательного действия (ингибиторы ЦОГ-1 и ЦОГ-2) (ацетилсалициловая кислота, ибупрофен, анальгин, кеторолак).

2. Вещества, ингибирующие преимущественно ЦОГ-2 (мелоксикам).

3. Вещества, избирательно ингибирующие ЦОГ-2 (целекоксиб, рофекоксиб, нимесулид, этодолак).

Современные стратегии поиска новых потенциальных анальгетиков связывают с изменением чувствительности ноцицепторов (воздействие на семейство каналов переменного рецепторного потенциала (TRP) и другие каналы ноцицепторов), нормализацией состояния ноцицепторов, нарушенного при воспалении (блокада активности медиаторов и модуляторов, изменяющих порог активности ноцицепторов), снижением патологической возбудимости нейронов, участвующих в проведении ноцицептивного сигнала (блокаторы тетродотоксин-нечувствительных Na^+ -каналов, блокаторы Ca^{2+} -каналов). Новые соединения с анальгетической активностью могут быть найдены среди ингибиторов ЦОГ-3, блокаторов протон-чувствительных каналов ASIC₃, каналов пуриновых рецепторов P_2X_2 и P_2X_3 , блокаторов рецепторов брадикинина, кальцитонин-ген-родственного пептида (КГРП), каннабиноидов.

При проведении экспериментов по изучению боли с использованием лабораторных животных следует соблюдать требования Европейской конвенции по защите экспериментальных животных (86/609 ЕЕС).

1. Исследования должны проводиться на животных, находящихся в хорошем физиологическом состоянии (отсутствие болезней и стресса).

2. Исследователь должен рассматривать животное не как объект, а как живое существо, одаренное ощущениями.

3. В экспериментах, целью которых является попытка моделирования у животных хронических болевых синдромов, протоколы исследований следует сводить к минимуму или избегать боли.

4. Протоколы исследований по изучению острой боли на сознательных животных должны утверждаться Этической комиссией, определяющей потенциальную выгоду этих экспериментов.

5. Насколько это возможно, ученый должен проверить интенсивность болевых раздражений на себе, и это должно применяться в отношении большинства неинвазивных раздражителей.

6. Хирургическое вмешательство не должно проводиться с использованием обездвижающих препаратов при отсутствии общего наркоза и с сохранением сенсорных ощущений.

7. Длительность экспериментов должна быть насколько возможно короткой и число животных, используемых в эксперименте, должно быть минимальным.

Методы оценки анальгетического действия

1. Методы оценки соматогенной боли

Большинство методов оценки соматогенной болевой чувствительности является моделью физиологической боли. В связи с этим необходимы сведения о механизмах восприятия ноцицептивного стимула.

Рецепторы боли (ноцицепторы) представляют собой инкапсулированные нервные окончания Ad- и С-афферентов, широко распространенные в коже, подкожной ткани, надкостнице, суставах, мышцах и внутренних органах. Ноцицепторы могут быть активированы сильным механическим (укол, щипок, удар) или термическим (нагревание, охлаждение), или химическим (действие альгогенов — брадикинин, гистамин, вещество Р, простагландины и др.) стимулами. Возбудимость ноцицепторов зависит от биохимического состава окружающей ткани.

На поверхности ноцицепторов экспрессируются множество каналов и рецепторов. В настоящее время на мембране ноцицепторов идентифицированы рецепторы брадикинина (B_1 и B_2), серотонина ($5\text{HT}_{1\text{D}}$, $5\text{HT}_{2\text{A}}$, 5HT_3 и 5HT_4), простагландинов (EP), АТФ (P_2X), ваниллоидные рецепторы (VR-1), орфановые рецепторы (ORL-1), рецепторы фактора роста нервов (TrkA), рецепторы, активированные протеазами (PAR) (на висцеральных ноцицепторах кишечника), протон-чувствительные катионные каналы (ASIC),

тетродотоксин-нечувствительные натриевые каналы (SNS, PN-3, NAN), калиевые (K_v_x) и кальциевые (L- и N-типа) каналы, семейство TRP-каналов.

TRP-каналы играют важную роль в восприятии стимулов ноцицепторами. TRPV₂ рецепторы открываются при повреждающем воздействии высокой температуры (более 53 °С). Активация TRPV₁ каналов температурой более 43 °С или химическими веществами, такими как капсаицин красного жгучего перца, протоны водорода и другие медиаторы воспаления, приводит к термической гипералгезии и аллодинии. TRPV₃ участвуют в болевой и неболевой тепловой чувствительности, открываясь при температуре 23–29 °С и при действии камфоры. TRPV₄ помимо температурной чувствительности (24–34 °С), реагируют на механическое давление и запускают осмотическую и механическую гипералгезию. TRPM₈ каналы чувствительны к холоду (8–28 °С), изменению потенциала и ментолу. Активация TRPA₁ каналов холодом или химическими веществами (брадикинин, формалин, масло горчицы, вассаби, хрен, аллицин лука и чеснока, акреолин слезоточивого газа, метиловый эфир салициловой кислоты зеленого масла, циннамалдегид корицы, D⁹-тетрагидроканнабинол марихуаны) вызывает воспаление, сопровождающееся термической и механической гипералгезией [32]. В мышцах при ишемии возникают болевые ощущения при активации ASIC₃ каналов молочной кислотой [30].

Обнаружено несколько типов ноцицепторов. Ad-механорецепторы (высокопороговые) возбуждаются только сильными механическими стимулами с небольших рецептивных полей и не реагируют на высокотемпературные раздражения и действие альгогенов. В патологических условиях (например при воспалении) такие рецепторы становятся чувствительными к температурным воздействиям. Ad-механотерморепторы имеют небольшие рецептивные поля, реагируют на интенсивный механический стимул и медленное нагревание кожи (более 45 °С). С-полимодалные ноцицепторы чувствительны к механическим, термическим и химическим стимулам. При повреждении и воспалении тканей или в условиях повторного температурного раздражения С-полимодалные ноцицепторы сенситизируются, т.е. становятся чувствительными к более слабым стимулам. Холодовые ноцицепторы Ad- и С-афферентов активируются с широких рецептивных полей низкотемпературными и высокоинтенсивными механическими раздражениями. Кроме того, существует семейство С-волокон, которые не активны в нормальном состоянии, и отвечают на термические и механические стимулы только при воспалении [42].

1.1. Методы оценки термической соматической боли

В настоящее время существует несколько методов оценки термической боли. Эти методы отличаются как по характеру воздействия, так и по типу ответной реакции.

1.1.1. Тест отдергивания хвоста от теплового излучения (tail-flick)

Тест отдергивания хвоста от теплового излучения является упрощенной версией метода, применяемого на добровольцах [42]. Метод основан на спинальном флексорном рефлексе в ответ на прогрессивно увеличивающееся воздействие теплового излучения на кожную поверхность. В этом тесте последовательно активируются терморепторы, С-волокна полимодалных ноцицепторов, Ad-волокна полимодалных ноцицепторов, полимодалные ноцицепторы, высокопороговые механорецепторы.

Исследования проводят на мышках и крысах. Болевое раздражение наносят на хвост локально, воздействуя постепенно увеличивающимся тепловым излучением (например, с помощью анальгезиметра Tail flick analgesia meter, Columbus Instruments, USA или TSE-system, Germany). Регистрируют латентный период реакции отдергивания хвоста (время избавления от болевого раздражителя). Как правило, величина латентного периода реакции составляет от 2 до 10 с (чаще всего от 2 до 4 с). Удлинение времени реакции интерпретируется как обезболивающее действие. Во избежание повреждения тканей не следует нагревать хвост более 10–20 с. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества.

Латентный период реакции зависит: от интенсивности (мощности) теплового излучения (чем интенсивнее — тем короче время реакции), от площади нагреваемой поверхности (чем больше площадь — тем время реакции меньше) и от места нанесения раздражения (чем дистальнее воздействие (дальше от основания хвоста) — тем меньше время реакции, однако обезболивающее действие морфина проявляется сильнее при нанесении раздражения на дистальную часть хвоста).

С помощью данного метода можно регистрировать значения латентного периода реакции животного до и после введения фармакологических препаратов, а также изучать динамику изменения болевой чувствительности во времени. Однако следует помнить, что в случае многократного повторения стимула может возникнуть привыкание или, напротив, выработается условный рефлекс отдергивания хвоста еще до достижения порога болевых ощущений.

Полученные результаты изменения латентного периода реакции после введения препаратов следует сравнить с изменениями в контрольной группе с помощью статистических методов.

При обработке полученных результатов можно также рассчитать величину максимально возможного эффекта (МВЭ). Однако при сравнении эффективности препаратов по величине МВЭ следует учитывать, что в разных экспериментах может различаться максимальное время нанесения раздражителя, что приводит к значительным различиям в величине этого показателя.

$$МВЭ = \frac{ЛП_{от} - ЛП_{контр}}{МАХ_{время} - ЛП_{контр}} \times 100\%,$$

где $ЛП_{от}$ — латентный период реакции после введения вещества, $ЛП_{контр}$ — латентный период реакции до введения вещества, $МАХ_{время}$ — максимальное время нанесения раздражителя.

1.1.2. Тест тепловой иммерсии хвоста при погружении в горячую воду (tail immersion)

Тест тепловой иммерсии хвоста (tail immersion) основан на спинальном флексорном рефлекс в ответ на погружение хвоста в горячую воду [41]. Этот метод отличается от теста отдергивания хвоста при тепловом излучении тем, что площадь раздражения больше и нагревание кожной поверхности происходит быстрее. В этой связи не происходит активации терморцепторов, а сразу активируются С-волокна полимодальных ноцицепторов, Ad-волокна полимодальных ноцицепторов, полимодальные ноцицепторы и высокопороговые механорецепторы.

Эксперименты проводят на крысах и мышах (можно проводить на обезьянах). Болевое раздражение моделируют погружением хвоста в горячую воду температурой 52 °С (от 45 до 54 °С). Регистрируют латентный период отдергивания хвоста. Как правило, величина латентного периода реакции в контрольной группе находится в диапазоне от 5 до 30 с (чаще всего от 7 до 12 с). Удлинение времени реакции интерпретируется как обезболивающее действие. Во избежание повреждения тканей не следует нагревать хвост более 30 с. Критерием аналгетического эффекта считают достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества.

Как и в методе отдергивания хвоста при тепловом излучении можно регистрировать значения латентного периода реакции животного до и после введения фармакологических препаратов, а также изучать динамику изменения болевой чувствительности во времени. Однако, как и в предыдущем методе, при многократном действии стимула может развиваться привыкание или выработается условный рефлекс отдергивания хвоста еще до достижения порога болевых ощущений.

Полученные результаты изменения латентного периода реакции после введения препаратов следует сравнить с изменениями в контрольной группе с помощью статистических методов. Также можно использовать показатель МВЭ (см. тест отдергивания хвоста от теплового излучения).

1.1.3. Тест термического раздражения лап — Подошвенный тест (Hargreaves test)

Существует модификация теста тепловой иммерсии [22], в которой повреждающее воздействие наносят на лапу с помощью сфокусированного луча инфракрасного света на подошву лапы (например, установка Plantar test (Hargreaves), ИТС Life Science, USA или Harvard apparatus, USA или Ugo Basile, Italy). Установка имеет бокс для животных со стеклянным полом, под которым находится перемещаемый источник света. Луч света может быть сфокусирован на лапе животного, находящегося в условиях свободного поведения. Животных предварительно адаптируют в боксе (около 30 мин), чтобы уменьшить число движений, связанных с исследовательской активностью. Регистрируют время отдергивания лапы от источника света. В контрольной группе животных величина латентного периода реакции обычно не превышает 4–6 с. Во избежание повреждения тканей не следует нагревать лапы более 20–30 с. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества. Как и в методе отдергивания хвоста при тепловом излучении можно регистрировать значения латентного периода реакции животного до и после введения фармакологических препаратов, а также изучать динамику изменения болевой чувствительности во времени.

Полученные результаты изменения латентного периода реакции после введения препаратов следует сравнить с изменениями в контрольной группе с помощью статистических методов. Также можно использовать показатель МВЭ (см. тест отдергивания хвоста от теплового излучения).

1.1.4. Тест горячей пластины (hot plate)

Тест горячей пластины основан на поведенческих реакциях, контролируемых супраспинальными структурами, в ответ на болевое воздействие [46]. Эксперименты проводят на крысах и мышах. Животных помещают на разогретую в среднем до 52 °С (от 42 до 57 °С) металлическую поверхность, окруженную цилиндром (например, TSE-system, Germany или Columbus Instruments, USA). Регистрируют время с момента помещения на горячую поверхность до появления поведенческого ответа на ноцицептивную стимуляцию (облизывания задних лапы, прыжки, отдергивание задней лапы). Критерием анальгетического эффекта считают достоверное увеличение латентного периода реакции после введения вещества.

Разные группы анальгетиков по-разному влияют на поведенческие реакции. Для опиоидов характерно удлинение латентного периода реакции облизывания конечности, а для нестероидных противовоспалительных средств (ацетилсалициловая кислота или парацетамол) — прыжковой реакции, особенно если температура поверхности 50 °С и ниже или температура линейно повышается от 43 до 52 °С со скоростью 2,5 °С/мин.

Как и в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения можно регистрировать значения латентного периода реакции животного до и после введения фармакологических препаратов, а также изучать динамику изменения болевой чувствительности во времени. Однако проведение тестирования более одного раза в день или даже раза в неделю неизбежно ведет к постепенному уменьшению времени реакции.

Полученные результаты изменения латентного периода реакции после введения препаратов следует сравнить с изменениями в контрольной группе с помощью статистических методов. Также можно использовать показатель МВЭ (см. тест отдергивания хвоста от теплового излучения).

1.2. Методы оценки механической соматической боли

При оценке соматической механической боли наиболее часто сдавливающее раздражение наносят на хвост или лапу. Используют тесты с постоянным давлением и постепенным увеличением давления.

1.2.1. Тест механического раздражения основания хвоста по Гаффнеру (Haffner's tail clip test)

Тест зажима основания хвоста основан на раздражении низкопороговых механорецепторов и ноцицепторов рецептивного поля врожденного рефлекса скручивания к основанию хвоста.

Эксперименты проводят на крысах и мышах. Врожденную оборонительную реакцию крыс на защемление корня хвоста специальным зажимом оценивают, используя 4-балльную шкалу: 0 — отсутствие реакции, 1 — вздрагивание, 2 — побежка вперед, 3 — скручивание к основанию хвоста и кусание зажима. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное уменьшение интенсивности болевых реакций, оцененной в баллах, относительно контрольной группы.

1.2.2. Тест механического раздражения лапы или хвоста

Эксперименты проводят на крысах и мышах. Лапу, реже хвост (на расстоянии 1 см от основания хвоста) животного помещают между плоской поверхностью и тупым предметом, который соединен с системой, постепенно увеличивающей давление (например, анальгезиметр Randall-Selitto, TSE-system, Germany или Ugo Basile, Italy) [37]. При увеличении давления на конечность можно видеть последовательно: спинальный рефлекс отдергивания конечности, комплекс супраспинальных двигательных реакций животного, направленных на освобождение конечности, и вокализацию. Регистрируется порог возникновения вокализации (вес в граммах). Критерием анальгетического эффекта считают достоверное уменьшение интенсивности болевых реакций, оцененной в баллах, относительно контрольной группы.

Этот тип механического раздражения имеет определенные недостатки: 1) иногда трудно точно измерить интенсивности раздражителя; 2) повторное механическое раздражение может приводить к снижению или увеличению чувствительности; 3) слабая чувствительность метода требует использования воздействия высокой интенсивности.

С целью повышения чувствительности при механическом раздражении используют методики механического раздражения воспаленной конечности (см. тест тактильной аллодинии (п. 1.4.1.4.) и механической гиперальгезии (п. 1.4.1.1.)).

1.3. Методы оценки электрической активности при реализации соматического рефлекса

1.3.1. Метод регистрации ноцицептивного флексорного рефлекса

Ноцицептивный флексорный рефлекс относится к группе защитных рефлексов и используется для оценки болевой чувствительности в эксперименте и клинике. Метод позволяет оценить влияния анальгетиков на возбудимость ноцицептивных нейронов, реагирующих как на активацию Ad-, так и C-афферентов. Ноцицептивный флексорный рефлекс можно оценивать у мышей и крыс в остром эксперименте до и после введения препаратов.

У наркотизированных животных регистрируют биоэлектрическую активность в двуглавой мышце бедра при помощи биполярных игольчатых электродов в ответ на ноцицептивное раздражение рецептивного поля № *sugalis* импульсами тока длительностью 1 мс и интенсивностью до 15 мА по стандартной методике [4,39]. Биоэлектрические сигналы усиливают (например, с помощью широкополосного усилителя осциллографа VC-9 (Nihon Kohden, Япония)), преобразуют в аналоговый сигнал и обрабатывают с помощью компьютеризированной системы сбора и анализа данных (например, Microlink (Biodata Limited, Англия)). Анализируют латентный период, длительность, частоту и характер разрядов раннего и позднего компонентов ноцицептивного флексорного рефлекса.

1.4. Методы оценки боли, вызванной альгогенами

Химические тесты основаны на изменении чувствительности С-полимодалных ноцицепторов в присутствии медиаторов воспаления или при изменении рН.

Раздражающие вещества вводят в суставную сумку (модель артрита), внутримышечно (модель миалгии), внутривисцерально (модель перитонической боли), в пульпу зуба (модель зубной боли), в вибриссы (модель орофасциальной тригеминальной боли), в мочевой пузырь, матку, прямую кишку (модели висцеральной боли).

1.4.1. Методы оценки соматической боли, вызванной альгогенами

1.4.1.1. Формалиновый тест

Эксперименты проводят на крысах и мышках (можно на кошках и обезьянах). Острую воспалительную реакцию вызывают субплантарным (под подошвенный апоневроз) или подкожным введением формалина (крысе 50 мкл, мышке 20 мкл). Концентрация формалина может быть от 0,5 до 15% (чаще используют 2–5% раствор). Регистрируют число болевых реакций (постукивание лапой об пол, грызение лапы и т.д.) в первые 5–10 мин — I фаза и с 30 по 50 минуту — II фаза [24]. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное уменьшение числа болевых реакций в получавших ЛС группе относительно контрольной группы.

В зависимости от введенной концентрации формалина можно зарегистрировать 4 типа поведенческих реакций: 0 — отсутствие реакции; 1 — лапа остается на земле, но животное на нее не опирается; 2 — лапа поднята, 3 — лапа облизывается, грызется или встряхивается.

Тест имитирует реакции, развивающиеся при операционных кожных разрезах. Одним из механизмов ноцигенного действия формалина является активация TRPA1 каналов, реагирующих в норме на холод и стимулирующих развитие воспаления [28]. Первая фаза реакции развивается сразу и характеризуется воздействием на первичные афференты боли, вторая фаза отставлена во времени и является болью, вызванной воспалительной реакцией. Опиоидные анальгетики блокируют обе фазы. Нестероидные противовоспалительные средства подавляют только вторую фазу, а местные анестетики — только первую [24]. Формалиновый тест имеет достаточно высокую прогностическую значимость.

Сходные поведенческие реакции можно регистрировать при введении в качестве раздражающего агента капсаицина (0,1%), серотонина (0,1%) или глутамата (0,5 М).

1.4.1.2. Тест механической гипералгезии при воспалении

Эксперименты проводят на крысах и мышках. Воспаление воспроизводят субплантарным введением 1% раствора каррагинена. Болевую чувствительность, вызванную механическим раздражением, оценивают через 3 ч с помощью анальгезиметра, который должен обеспечить плавное увеличение нагрузки на воспаленную лапу до появления болевой реакции (оцениваемой по писку животного) (например, анальгезиметр Randall-Selitto TSE-system, Germany или Ugo Basil, Italy) (см. п. 1.2.2). Исследуемые вещества вводят через 2 ч после введения каррагинена. Критерием анальгетического эффекта считают снижение гипералгезии менее чем на 50% по сравнению с контрольной группой. Можно оценивать разницу между порогом болевых реакций в воспаленной и невоспаленной лапах.

Сходные поведенческие реакции можно регистрировать при введении в качестве раздражающего агента капсаицина (0,1–0,2%, тестируют через 15 мин), серотонина (0,1%), глутамата (0,5 М), пивных дрожжей (10% суспензия), адьюванта Фрейнда (5 мг/мл БЦЖ в вазелиновом масле, вводится за 24 ч).

1.4.1.3. Тест термической гипералгезии при воспалении

Эксперименты проводят на крысах и мышках. Воспаление воспроизводят субплантарным введением 1% раствора каррагинена. Болевую чувствительность, вызванную

термическим раздражением, оценивают через 3 ч с помощью сфокусированного луча инфракрасного света на подошву лапы (например, установка Plantar test (Hargreaves) (см. п. 1.1.3.). Исследуемые вещества вводят через 2 ч после введения каррагинина. Критерием анальгетического эффекта считают снижение гипералгезии менее чем на 50% по сравнению с контрольной группой. Можно оценивать разницу между порогом болевых реакций в воспаленной и невоспаленной лапах.

Сходные поведенческие реакции можно регистрировать при введении в качестве раздражающего агента капсаицина (0,1–0,2%, тестируют через 15 мин), серотонина (0,1%), глутамата (0,5 М), пивных дрожжей (10% суспензия), адьюванта Фрейнда (5 мг/мл БЦЖ в вазелиновом масле, вводится за 24 ч).

1.4.1.4. Тест тактильной аллодинии

Эксперименты проводят на крысах и мышах. Воспаление воспроизводят субплантарным введением 1% раствора каррагинина. Болевую чувствительность, вызванную механическим раздражением, оценивают через 3 ч с помощью волосков Фрея весом от 0,06 до 23,96 г (например, Frey hairs, Senselab aesthesiometer, Somedic, Sweden). Животных помещают в бокс с полом из проволоки. После снижения двигательной активности, связанной с исследовательским поведением (около 30 мин), проводят тестирование. Для каждого волоска тестирование проводится по 5 раз с интервалом 1–2 с. Определяется минимальный порог реакции, вызывающий отдергивание лапы в одном предъявлении из пяти [14].

Исследуемые вещества вводят через 2 ч после введения каррагинина. Критерием анальгетического эффекта считают снижение гипералгезии менее чем на 50% по сравнению с контрольной группой. Можно оценивать разницу между порогом болевых реакций в воспаленной и невоспаленной лапах.

Сходные поведенческие реакции можно регистрировать при введении в качестве раздражающего агента капсаицина (0,1–0,2%, тестируют через 15 мин), серотонина (0,1%), глутамата (0,5 М), пивных дрожжей (10% суспензия), адьюванта Фрейнда (5 мг/мл БЦЖ в вазелиновом масле, вводится за 24 ч).

1.4.1.5. Тест хронического воспаления — адьювантного артрита

Эксперименты проводят на крысах. Хроническое воспаление моделируют субплантарным введением в заднюю лапу адьюванта Фрейнда (0,1 мл взвеси БЦЖ 2,5 мг/мл в вазелиновом масле). Воспалительная реакция оценивается в динамике каждые 2 дня по интенсивности воспалительных изменений в суставах пораженной конечности, выраженной в индексе отека, а также по изменению порогов болевой чувствительности [31]. Могут учитываться также и другие симптомы генерализованной реакции организма на введение адьюванта (отек ушей, хвоста, полиартрит, ухудшение общего состояния, снижение массы тела, гибель). Первичная реакция (отек на лапе введения) оценивается онкометрически на 3-й день после инъекции адьюванта. Вторичная иммунологическая реакция (отек на соседней лапе) оценивается на 14 день после введения адьюванта (при профилактике: первое введение до введения адьюванта) или на 25 день (при лечении: начиная с 14 дня после введения адьюванта).

Данный метод позволяет оценить эффективность препаратов, применяемых при артралгиях, миалгиях и других соматогенных болевых синдромах.

1.4.1.6. Тест орофасциальной тригеминальной боли

Эксперименты проводят на крысах. Формалин (5 мкл, 5%) или капсаицин (0,4–1,5 мкг/крысу, 5 мкл) вводят в область вибрисс у крыс. Регистрируют интенсивность груминга и чесательных движений [16, 34]. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное уменьшение числа болевых реакций в получавшей ЛС группе относительно контрольной группы.

1.4.2. Метод оценки висцеральной боли, вызванной альгогенами

1.4.2.1. Метод оценки перитонической боли — тест корчей

Внутрибрюшинное введение веществ, раздражающих серозные оболочки, вызывает у мышей и крыс сокращение абдоминальной мускулатуры. Данный метод можно использовать как модель перитонита. В качестве раздражающего агента может выступать уксусная кислота (0,5–1% раствор) или фенилбензохинон (0,1–0,2% раствор в 4% этаноле).

Эксперименты проводят на крысах и мышах (можно на обезьянах). Регистрируют число корчей на протяжении 20 мин после внутрибрюшинного введения 0,6% раствора уксусной кислоты введения (время наблюдения может варьировать от 15 до 30 мин). Критерием анальгетического эффекта считают достоверное уменьшение числа корчей в получавшей ЛС группе относительно контрольной группы [15], при условии исключения миорелаксантного действия у изучаемого соединения.

Число корчей в контрольной группе зависит от температуры окружающей среды. Максимальное количество корчей наблюдается в комфортной среде (27–28 °С), а при повышении или снижении температуры их число снижается [1].

Частота корчей спонтанно уменьшается со временем, что не позволяет оценить длительность действия болеутоляющих средств.

Тест корчей более чувствителен не только к действию анальгетиков. В данном тесте могут проявить эффект некоторые адrenoблокаторы, антигистаминные препараты, блокаторы серотониновых рецепторов, мышечные релаксанты, ингибиторы моноаминоксидазы, нейролептики, антидепрессанты.

2. Методы оценки нейрогенной боли

2.1. Моделирование нейропатического болевого синдрома

2.1.1. Моделирование нейропатического болевого синдрома, вызванного перерезкой седалищного нерва

Нейропатический болевой синдром у самцов беспородных крыс создают перерезкой седалищного нерва на уровне подколенной ямки выше места его трифуркации на *N^o tibialis*, *N^o peroneus* и *N^o suralis* и последующем его лигированием для предотвращения регенерации [3]. Развитие болевого синдрома определяют по появлению признаков аутономий на оперированной лапе. Интенсивность аутономий оценивают по 11 балльной шкале: 1 балл — повреждение 1-го когтя; 2, 3, 4 и 5 баллов — повреждение 2-х, 3-х, 4-х и 5-ти когтей; 6 баллов — повреждение фаланги одного пальца; 7, 8, 9 и 10 баллов — повреждение фаланг соответственно на 2-х, 3-х, 4-х и 5-ти пальцах; 11 баллов — повреждение плюсневых костей. Динамику развития болевого синдрома у крыс, получавших ЛС, и контрольной групп наблюдают в течение 25 дней. Животным контрольной группы в день перерезки седалищного нерва и последующие 10 дней после операции вводят растворитель, а животным, получающим ЛС групп, в те же сроки — изучаемое вещество. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное уменьшение числа болевых реакций в получавших ЛС группе относительно контрольной группы.

Интенсивность развития механической аллодинии (на 12 день после операции) оценивают с помощью волосков Фрея весом от 0,06 до 23,96 г (Frey hairs, Senselab aesthesiometer, Somedic, Sweden). Для каждого волоска тестирование проводится по 5 раз с интервалом 1–2 с. Определяется минимальный порог реакции, вызывающий отдергивание лапы в одном предьявлении из пяти.

Интенсивность развития механической гипералгезии оценивают (на 12–13 день после операции) с помощью анальгезиметра, который должен обеспечить плавное увеличение нагрузки до появления болевой реакции (оцениваемой по писку животного) (например, анальгезиметр Randall-Selitto TSE-system, Germany или Ugo Basil, Italy) (см. п. 1.2.2). Определяется порог реакции, вызывающий отдергивание лапы.

Интенсивность развития термической гипералгезии оценивают (на 12–13 день после операции) с помощью сфокусированного луча инфракрасного света на подошву лапы (например, установка Plantar test (Hargreaves) (см. п. 1.1.3). Определяется порог реакции, вызывающий отдергивание лапы.

2.1.2. Моделирование нейропатического болевого синдрома, вызванного перевязкой спинномозговых нервов

Хроническую нейропатическую боль у самцов беспородных крыс создают перевязкой L5 и L6 спинномозговых нервов [26]. Операцию проводят под наркозом. Через 2 недели после операции тестируют интенсивность развития механической аллодинии, механической и термической гипералгезии (см. п. 2.1.1).

2.1.3. Моделирование диабетического нейропатического болевого синдрома

У многих животных (грызунов, кроликов, собак) можно вызвать инсулинозависимый сахарный диабет с помощью стрептозоцина или аллоксана — веществ, избирательно повреждающих бета-клетки. В хвостовую вену крыс вводят стрептозацин (40–75 мг/кг, в 0,75 мМ цитратном буфере рН 4,5). Развитие гипергликемии оценивают с помощью глюкометра. Через 3–8 недель после введения стрептозацина тестируют интенсивность развития механической аллодинии, механической и термической гипералгезий (см. п. 2.1.1) [47].

2.2. Моделирование центрального болевого синдрома

Модель воспроизводится путем создания в дорсальных рогах люмбального отдела спинного мозга популяции гиперактивных ноцицептивных нейронов с помощью аппликации агаровой пластинки, содержащей какой-либо конвульсант (КС1 и убаин — прямая деполяризация нейронов, стрихнин — нарушение глицинергического торможения, пенициллин (15000 или 7000 ЕД) — нарушение ГАМК-ергического торможения). Данная модель используется при оценке эффективности препаратов для лечения центральных болевых синдромов (таламические боли, боли у пациентов с рассеянным склерозом, боли при демиелинизирующих заболеваниях и др.).

Для моделирования центрального болевого синдрома самцам беспородных крыс под эфирным наркозом после односторонней ламинэктомии на дорсальную поверхность люмбального отдела (L4–L6) спинного мозга апплицируют 1% агаровую пластинку размером 6 × 1,5 × 2 мм, содержащую конвульсант, приводящий к сенситизации ноцицептивных нейронов в дорсальных рогах спинного мозга. Выраженность болевого синдрома оценивают по 3-х бальной шкале. Регистрируют следующие показатели: вокализацию, общую двигательную активность в период приступа, локальную реакцию в виде вылизывания и выкусывания тканей в зоне боли на задней конечности в период приступа, аллодинию — болевой ответ на тактильный стимул, частоту приступов и их длительность. После зашивания кожного разреза вводят вещество и наблюдают клиническую картину развития синдрома, сравнивая с контрольной серией, которым также после оперативного вмешательства и аппликации конвульсанта вводят физиологический раствор в том же объеме [5]. Критерием анальгетического эффекта считают достоверное уменьшение числа болевых реакций в получавшей ЛС группе относительно контрольной группы.

3. Оценка сопутствующих и нежелательных эффектов, характерных для анальгетиков

3.1. Методы оценки влияния веществ на частоту дыхания

3.1.1 Метод оценки влияния веществ на частоту дыхания наркотизированных кроликов

Эксперименты проводят на наркотизированных кроликах-самцах. Животных фиксируют в специальном станке, в одну ноздрю вставляют пластиковую трубку, смазанную

вазелином и соединенную с датчиком давления. Графическую регистрацию дыхательных движений производят с помощью прибора, например «Мингограф-81». Рассчитывают количество дыхательных движений в минуту, учитывают случаи возникновения патологических форм дыхания (дыхание Чейн-Стокса, Кусмауля, Биота, агональное). Регистрацию проводят до и после введения вещества.

3.1.2. Метод оценки влияния веществ на частоту дыхания ненаркотизированных мышей

У ненаркотизированных мышей регистрируют число дыхательных движений за минуту после введения веществ с помощью механического счетчика. Можно грудную клетку мыши опоясать резиновым обручем, наполненным специальным составом и соединенным с записывающим устройством. Критерием подавления дыхания считают достоверное снижение частоты дыхательных движений по сравнению с контролем.

3.2. Метод оценки влияния на моторику желудочно-кишечного тракта

В исследованиях на мышах и крысах оценивают скорость продвижения активированного угля по кишечнику животных в сравнении с контрольной группой и группой, получившей препарат сравнения. Критерием снижения моторной деятельности ЖКТ считают достоверное уменьшение времени выхода активированного угля.

3.3. Методы оценки влияния веществ на температуру тела

Эксперименты проводят на мышах и крысах. Измеряют ректальную температуру тела с помощью термодатчиков. При измерении температуры тела следует учитывать температуру окружающей среды. Различают три температурных режима (Gordon, 1990): холодная зона (4–6°C), характеризующая превалирование механизмов теплопродукции над теплоотдачей; 2) термонейтральная (комфортная) зона (27–28°C для крыс), при которой наблюдается баланс между теплопродукцией и теплоотдачей, осуществляемый за счет изменения тонуса сосудов («игра просвета сосудов»); 3) жаркая зона (32–33°C), при которой теплоотдача преобладает над теплопродукцией. В холодной среде гипотермический эффект вещества может усиливаться, а в жаркой среде у того же вещества может развиваться гипертермическая реакция. Критерием влияния веществ на температуру тела считали достоверное изменение ректальной температуры при сравнении с контрольной группой животных, находящихся в тех же условиях.

3.4. Метод оценки толерантности к антиноцицептивному действию

Вещества вводят 14 или 28 дней. Оценивают изменение анальгетической активности в тестах оценки болевой чувствительности. Для проведения исследования кросс-толерантности в день тестирования изучаемое вещество заменяют инъекцией морфина³ (5 мг/кг). Критерием развития толерантности считают отсутствие анальгетического действия или снижение анальгетического действия в группе, хронически получавшей вещество, относительно контрольной группы, хронически получавшей растворитель и в день тестирования получившей вещество.

Дополнительно оценивают влияние хронического введения на общее состояние по нарушению ушного и корнеального рефлексов, наличию судорог, тремора, птоза, прыжков, встряхиваний, стука зубами, синдрома Штрауба, чесания, чихания, бокового положения.

3.5. Методы оценки синдрома отмены

3.5.1. Метод оценки развития синдром отмены без провокации налоксоном

При оценке синдрома отмены без провокации налоксоном изучаемое соединение вводят 28 дней. На второй день после отмены вещества регистрируют анальгетическую

³ В соответствии с ФЗ от 08.01.1998 № 3-ФЗ (ред. от 03.12.2011) «О наркотических средствах и психотропных веществах».

активность, двигательную активность (например, в тесте открытое поле), общее состояние по нарушению ушного и корнеального рефлексов, наличию судорог, тремора, птоза, прыжков, встряхиваний, стука зубами, синдрома Штрауба, чесания, чихания, бокового положения. Критерием развития синдрома отмены считают появление гиперальгетического действия, стимулирование двигательной активности и изменение общего состояния животных, относительно контрольной группы животных, хронически получавших растворитель.

3.5.2. Метод оценки развития синдрома отмены с провокацией налоксоном

При оценке синдрома отмены с провокацией налоксоном изучаемое соединение или препарат сравнения морфин⁴ вводят внутривенно 2 раза в день (утром и вечером) в течение 5 дней по схеме 3 инъекции по 50 мг/кг, 3 инъекции по 75 мг/кг и 3 инъекции по 100 мг/кг. Синдром отмены провоцируют налоксоном (10 мг/кг, подкожно) через 5 ч после последней инъекции соединений [20].

Протокол исследования:

1 день в 10 часов — вещество (морфин) в дозе 50 мг/кг, в 16 часов — в дозе 50 мг/кг,
2 день в 10 часов — вещество (морфин) в дозе 50 мг/кг, в 16 часов — в дозе 75 мг/кг,
3 день в 10 часов — вещество (морфин) в дозе 75 мг/кг, в 16 часов — в дозе 75 мг/кг,
4 день в 10 часов — вещество (морфин) в дозе 100 мг/кг, в 16 часов — в дозе 100 мг/кг,
2 день в 10 часов — вещество (морфин) в дозе 100 мг/кг, в 15 часов — налоксон в дозе 10 мг/кг.

У мышей регистрируют число прыжков, корчей, встряхиваний, тремора в виде барабанного боя и птоза на протяжении одного часа после инъекции налоксона. Критерием выраженности синдрома отмены считали уменьшение числа прыжковых реакций относительно группы, получавшей по такой же схеме морфин.

3.6. Методы оценки первично-подкрепляющих и стимульных свойств

3.6.1. Самовведение с необученными мышами

Методика позволяет с высокой вероятностью оценить наличие первично-подкрепляющих свойств у психоактивных веществ. Мышей помещают в парную клетку (8x8x8см), имеющую фронтальное отверстие с инфракрасными сенсорными датчиками, соединенными через компьютер с автоматической помпой. У мышей фиксируют хвост на горизонтальной поверхности. В течение 10 мин тестируют экспериментальных животных и подбирают пары, обладающие одинаковым уровнем активности заглядывания в отверстие. В хвостовую вену мышей вставляют катетер, который соединен с автоматической помпой. Через хвостовую вену мышь получает инфузию исследуемого вещества в ответ на определенную реакцию (например, заглядывание в отверстие в стенке). Одновременно тестируется две мыши. Первая, «активная», получает тестируемое вещество в ответ на совершенное действие, а другая, «пассивная», получает инфузию вещества независимо от собственной реакции одновременно с первой мышью. Рассчитывают R-критерий, представляющий десятичный логарифм отношения частоты оперантной реакции у «активных» и «неактивных» мышей. Критерием выраженности подкрепляющих свойств считается положительный R-критерий по сравнению с контрольной группой, получавшей внутривенное введение растворителя (при статистическом анализе используют тест Даннетта) [40].

3.6.2. Дискриминантные стимульные свойства (Drug discrimination)

Методика позволяет оценить фармакологическую природу субъективных состояний, вызываемых психоактивными веществами. При оценке риска развития лекарственной

⁴ В соответствии с ФЗ от 08.01.1998 № 3-ФЗ (ред. от 03.12.2011 г.) «О наркотических средствах и психотропных веществах».

зависимости (наркогенного потенциала) сравнивают интероцептивные эффекты эталонного препарата с известными наркогенными свойствами (например, морфина) с интероцептивными эффектами препарата исследования. В качестве объекта исследования могут использоваться млекопитающие (крысы, мыши, свиньи), птицы, приматы (саймиры, бабуины). Животных обучают выполнению определенной инструментальной реакции альтернативного выбора (например, нажатия на одну из двух педалей в стандартной камере Скиннера) для получения подкрепления. После инъекции изучаемого вещества подкрепление выдается при нажатии на одну педаль, а после введения растворителя — на другую. При формировании навыка различения веществ у крыс с водной или пищевой депривацией возможно в различных оперантных режимах: режиме фиксированного отношения FRN (подкрепление предъявляют после каждого N-го нажатия на адекватный рычаг), фиксированного интервала FIN (подкрепляют нажатия, совершаемые через n сек после предыдущего) и т.д. Инъекции препарата или растворителя (дифференцируемые интерорецептивные стимулы) в процессе выработки лекарственной дифференцировки осуществляют в равновероятностной последовательности 1 раз в день. В целях контроля над возможным влиянием на процесс обучения врожденного предпочтения односторонних реакций в каждой группе половину животных обучают выбирать левый рычаг после введения психотропного средства и правый — после инъекции растворителя, а второй половине группы наоборот. Обучение проводят ежедневно 5 раз в неделю в течение 15 мин. Регистрируют % правильных оперантных реакций. Критерием стабильного навыка различения веществ считают воспроизведение 80%-го уровня правильных реакций в течение шести последовательных сеансов обучения на фоне действия каждого из дифференцируемого стимула [33]. При стабильном выполнении тестируют воспроизведение сформированного навыка в течение 2–3-х мин в отсутствие подкрепления адекватного поведения с целью определения уровня сформировавшегося навыка лекарственной дифференцировки [25]. После выработки у животного устойчивого навыка различения эталонного вещества и растворителя на основе заместительного тестирования осуществляют сравнительный анализ интероцептивных эффектов эталона и препарата исследования. Если при замене эталонного препарата на препарат исследования наблюдается 80% и более реакций, адекватных тренировочному препарату, то полагают, что интероцептивные эффекты сравниваемых веществ идентичны, что свидетельствует о наличии у изучаемого вещества сопоставимого с эталоном наркогенного потенциала.

У животных с выработанным навыком различения веществ можно провести тестирование на антагонизм с анализаторами с известным механизмом действия с целью выявления механизма действия изучаемого вещества.

3.6.3. Электрическая самостимуляция мозга. Автотитрование

Электрическая самостимуляция мозга — это еще один метод для исследования наркогенного потенциала вещества. Практически все известные вещества, вызывающие зависимость у человека, способны активировать реакцию, основанную на электрическом раздражении структур мозга (зоны «удовольствия», вентральная тегментальная область, медиальный переднемозговой пучок и др.), входящую в так называемую «систему награды», в ответ на выполнение животным определенного действия (инструментальной реакции).

Крысам имплантируют биполярные электроды в вентральную тегментальную область. Через 10 дней после вживления электродов крыс обучают нажимать на педаль в камере Скиннера для получения электрического раздражения мозга (прямоугольные импульсы отрицательной полярности, длительностью 1 мс, с частотой 100 Гц, в течение 0,4 с, пороговые значения тока в режиме «фиксированных пачек»). Для повторного раздражения животное было вынуждено вновь нажимать на педаль. Частота и длительность нажатий регистрировались автоматически. Анализировали частоту и время каждого нажатия на педаль. На основании этих результатов вычисляли коэффициент «рассогласования» [7]. Коэффициент «рассогласования» принимает значения от -1 до

+1 и показывает долю активации положительной и отрицательной подкрепляющей фазы самостимуляции. Уменьшение коэффициента «рассогласования» указывает на подкрепляющих свойств самостимуляции, вследствие чего коэффициент «рассогласования» является удобным дополнительным показателем для оценки действия фармакологических препаратов. Последние вводили на 3-й день эксперимента после стабилизации реакции при использовании фиксированного значения силы тока. Регистрировали число нажатий на педаль и коэффициент «рассогласования» в течение 10 мин эксперимента, затем производили внутривенную микроинъекцию препарата и через 15–20 мин регистрировали те же показатели (число нажатий на педаль и коэффициент «рассогласования») за 10-минутный интервал времени.

Поскольку электрическая самостимуляция мозга является инструментальной реакцией, ложноположительные и ложноотрицательные результаты могут быть получены, если исследуемые вещества обладают способностью, соответственно, улучшать или ухудшать моторное исполнение. Для исключения влияния этого фактора применяют автотитрование, когда животное само определяет интенсивность стимуляции, которая подкрепляет оперантную реакцию. Эксперименты проводят в стандартной камере Скиннера, оборудованной двумя педалями. Каждое нажатие на одну из педалей («награждающая» педаль) запускает электрическую стимуляцию, интенсивность которой постепенно снижается. Для того, чтобы вернуть интенсивность стимуляции к исходному уровню, животное должно нажать на другую педаль (педаль «перезапуска»). Интенсивность стимуляции, при которой происходит «перезапуск», считается субъективно пороговой для данного животного.

Ежедневно проводят два сеанса самостимуляции с интервалом в 1 ч. В дни тестов поведение животного во время первого сеанса служило контролем, на основании которого рассчитывают изменение параметров самостимуляции во время второго сеанса. В дни тренировок, а также при тестировании эффектов растворителя пороговая интенсивность самостимуляции во время второго сеанса составляет 90% от исходного уровня (феномен «разогрева») [11].

3.6.4. Условнорефлекторная реакция предпочтения места

При выработке условнорефлекторной реакции предпочтения места после инъекции изучаемого вещества животных помещают в определенную обстановку. Если изучаемое вещество обладает наркотическим потенциалом, то после нескольких сеансов животные больше времени стараются проводить в месте, ассоциированном с приемом вещества.

Для обучения используют 3-х секционную камеру (например, MED Associates, St. Albans, VT). Две одинаковых по размеру камеры предпочтения с разным цветом пола (белый и черный) соединены с центральной (пол серого цвета). Камеры отделены друг от друга раздвижными дверцами с фотоэлементами, которые выводят данные на компьютер.

1 день эксперимента: мыши помещены в центральную камеру на 1 мин (период привыкания — двери закрыты) и на 20 мин (период свободного исследования двери открыты). Определяют предпочтение мышей белой или черной камеры. Мышей, которые предпочитают центральную (серую) камеру, исключают из эксперимента.

2–9 день эксперимента. Мышам вводят вещество или растворитель (в равновероятностной последовательности 1 раз в день) и помещают в соответствующую камеру. Т.е. одну мышь после введения вещества помещают в отсек с черным полом, а после введения растворителя — в отсек с белым полом; другую мышь — наоборот.

10 день тестирование. После введения вещества мышей помещают в центральную камеру и после 1 мин привыкания открывают двери. Регистрируют время проведения в каждой камере. Критерием наличия у вещества подкрепляющих свойств считают достоверно большее проведение времени в камере, ассоциированной с введением вещества [43].

Эксперименты можно проводить с использованием челночной камеры. Во время обучения животных после инъекции вещества помещают в один отсек челночной камеры, а после введения растворителя — в другой [11].

3.7. Метод оценки ulcerогенного действия веществ

Для нестероидных противовоспалительных препаратов характерно повреждающее воздействие на оболочку ЖКТ (ulcerогенное действие).

Исследуемые вещества вводят однократно внутрижелудочно крысам, предварительно за 16 ч лишенным пищи. Через 3 ч животных подвергают эвтаназии, извлекают желудки и рассекают по малой кривизне и промывают физиологическим раствором для удаления содержимого. Оценку ulcerогенного действия проводят по 4-х бальной шкале: 0 — отсутствие повреждения, 0,5 — гиперемия, 1 — единичные незначительные повреждения (1 или 2 точечных кровоизлияния); 2 — множественные кровоизлияния (эрозии, точечные кровоизлияния); 3 — значительные и множественные повреждения (эрозии, кровоизлияния); 4 — грубые повреждения, охватывающие всю поверхность слизистой (массивные кровоизлияния, эрозии, перфорации). Критерием ulcerогенности считают наличие проявлений, соответствующих 2 баллам и выше.

4. Изучение дополнительных нейропсихотропных свойств препаратов

4.1. Оценка двигательной активности

Самцов беспородных крыс или мышей помещают в центр установки открытого поля, освещаемой рассеянным комнатным светом. Установка для крыс представляет собой квадратную площадку размером 60×60×60 см, в которой пол был разделен на 9 квадратов (20×20 см) и имеет 16 отверстий диаметром 4 см. Установка для мышей имеет размер 40×40×40 см; пол разделен на 16 квадратов (10×10 см) и имеет 16 отверстий диаметром 3 см. В течение 2 мин регистрируют число пересеченных квадратов (горизонтальная активность), число вертикальных стоек (вертикальная активность) и число заглядываний в отверстия (норковый рефлекс) [27]. Критерием седативного или стимулирующего действия считают достоверное изменение показателей горизонтальной и вертикальной двигательной активности.

4.2. Оценка влияния на координацию движения и мышечный тонус

Для регистрации мышечного тонуса используют тест подтягивания на горизонтальной перекладине. Крыс или мышей подвешивают передними лапами на проволоку, натянутую на высоте 20–30 см от поверхности стола. Животные с ненарушенным мышечным тонусом быстро подтягиваются и удерживаются на перекладине четырьмя лапами. Невыполнение этого рефлекса животными получавшей ЛС группы свидетельствует о нарушении мышечного тонуса и неврологическом дефиците.

Установка вращающего стержня для крыс (Rota-Rod, Ugo Basile) представляет собой горизонтальный стержень \varnothing 7 см, разделенный пластинами \varnothing 25 см на 4 отсека. Установка вращающего стержня для мышей (Rota-Rod, Ugo Basile) имеет горизонтальный стержень \varnothing 3 см, разделенный пластинами \varnothing 15 см на 5 отсеков. Стержень вращают со скоростью 5 об/мин. Неспособность животных удерживать равновесие в течение 2 мин рассматривают как проявление нарушения координации движения.

4.3. Метод оценки потенцирования сна, вызванного барбитуратами

Исследуемое соединение или растворитель вводят мышам за 20 мин до гексенала, вводимого в дозе 30 мг/кг внутрибрюшинно. Определяют процент уснувших мышей и длительность сохранения бокового положения (в мин.) [45]. Критерием потенцирования сна считают увеличение продолжительности сна.

4.4. Оценка общего состояния

После введения изучаемого вещества в широком диапазоне доз (от не оказывающих заметного влияния на общее состояние до вызывающих гибель) регистрируют двигательную активность, нарушения ушного и корнеального рефлексов, наличие судорог,

тремора, птоза, прыжков, встряхиваний, стука зубами, синдрома Штрауба, чесания, чихания, бокового положения.

4.5. Оценка анксиолитического действия

Самцов беспородных крыс помещают в центр лабиринта экспериментальной камеры, которая представляет собой крестообразный лабиринт [35]. Установка приподнятого крестообразного лабиринта имеет 4 рукава длиной 30 см и шириной 6 см, скрепленных друг с другом под прямым углом. Два противоположных рукава имеют с двух сторон стенки высотой 30 см на всю их длину, а два других открыты и освещены. Лабиринт поднят над уровнем пола на высоту 40 см. Два противоположных рукава затемнены; два других — освещены рассеянным комнатным светом и открыты с торцов. Визуально регистрируют (поминутно) в течение 5 мин следующие показатели: время нахождения в светлом отсеке и число выходов в светлый отсек, время нахождения на центральной площадке, число свешиваний с открытых рукавов. Критерием анксиолитического эффекта считают увеличение времени пребывания в открытых рукавах, времени нахождения на центральной площадке, числа свешиваний с открытых рукавов.

4.6. Оценка антидепрессивного действия

Стрессовое состояние вызывают у мышей форсированным плаванием [36]. Сосуд в форме цилиндра (диаметр 10 см, высота 25 см) заполняют на треть водой (27°C) так, чтобы животное не касалось дна хвостом и не имело возможности выпрыгнуть. Самцов беспородных белых мышей помещают в этот сосуд и регистрируют визуально все активные попытки животных выбраться из воды в течение 5 мин после погружения в воду. После неудачных попыток выбраться из воды животные принимают характерную неподвижную позу, которую расценивали как проявление подавленности, «отчаяния». Критерием наличия антидепрессантного эффекта считают снижение длительности имобилизации.

4.7. Оценка влияния на сердечную деятельность

Исследования проводят на наркотизированных крысах. Животных фиксируют на столике и с помощью электрокардиографа, например «ЭК4Т-02», регистрируют электрокардиограмму во II стандартном отведении. Графическую регистрацию проводят со скоростью 100 мм/сек. Измеряют интервалы RR, PQ, QT, комплекс QRS, рассчитывают частоту сердечных сокращений ($ЧСС = 60/RR$). Учитывают случаи нарушений ритма сокращений сердца. Регистрацию проводят до и после введения вещества.

5. Изучение механизма действия нового анальгетика

Механизм действия нового анальгетика следует изучать в зависимости от мишени, на которую новое вещество оказывает свой эффект, с оценкой его нейрохимических эффектов. Рекомендуется определить нейрорецепторный профиль изучаемого вещества, в том числе используя методы радиолигандного связывания, а также другие биохимические методы, в том числе изучение сдвигов нейромедиаторного баланса, вторичных мессенджеров и т.д. В частности, можно применить следующие методы оценки.

5.1. Оценка способности антагонистов

опиоидных рецепторов блокировать анальгетическое действие веществ

Оценку опиоидного компонента механизма обезболивающего действия изучаемых веществ проводят с помощью анализаторов опиоидергической и каннабиноидергической систем. Тестирование болевой чувствительности по одному или двум методам оценки анальгетической активности проводят на фоне совместного введения испытуемого вещества и блокаторов разных подтипов рецепторов. Для этой цели можно использовать:

налоксон (1 мг/кг, подкожно) — неселективный антагонист опиоидных рецепторов;

налуксон метиодид (1 мг/кг, подкожно) — неселективный антагонист периферических опиоидных рецепторов (не проникает через ГЭБ);
налуксон бензоилгидразон (10 мг/кг, подкожно) — агонист κ_3 и антагонист ORL_1 орфановых и μ -опиоидных рецепторов;
налтрексон (1 мг/кг, подкожно) — неселективный антагонист опиоидных рецепторов;
3-метоксиналтрексон (5 мг/кг, подкожно) — связывается с рецепторами морфин-6-*b*-глюкуронида и блокирует анальгезию, вызванную эндоморфином-2;
АМ-251 (5 мг/кг, подкожно) — антагонист CB_1 каннабиноидных рецепторов;
наллоксоназин (10 мг/кг, подкожно) — антагонист μ_1 -опиоидных рецепторов;
налтриндол (5 мг/кг, подкожно) — антагонист δ -опиоидных рецепторов;
нор-биналторфимин (ног-BNI) (5 мг/кг, подкожно) — антагонист κ -опиоидных рецепторов.

5.2. Метод оценки взаимодействия опиоидных анальгетиков на препаратах изолированных органов

Для оценки опиоидного рецепторного механизма действия исследуемых веществ оценивают их влияние на вызванные стандартной электрической стимуляцией сокращений изолированного сегмента подвздошной кишки морской свинки (богатой μ -опиоидными рецепторами), семявыносящего протока мыши (богатого δ -опиоидными рецепторами) и семявыносящего протока кролика (богатого κ -опиоидными рецепторами), а также способности налоксона устранять или ослаблять угнетающее действие изучаемого вещества.

Для выделения препаратов семявыносящего протока мыши и подвздошной кишки морской свинки животных подвергают эвтаназии цервикальной дислокацией, вскрывают брюшную полость, выделяют соответствующий орган и помещают его в чашку Петри, наполненную буфером Кребса (118 мМ NaCl; 2,54 мМ CaCl₂; 4,75 мМ KCl; 1,19 мМ KH₂PO₄; 25 мМ NaHCO₃; 11 мМ глюкоза) [23].

Для приготовления препарата подвздошной кишки морской свинки отсекают 10 см конечного отдела подвздошной кишки, затем аккуратно удаляют слой слизистой оболочки вместе с брыжейкой, кишку с внутренней полости натягивают на стеклянную палочку и с помощью ватного тампона поступательными движениями снимают наружный слой гладкой мышечной мускулатуры. Для приготовления препарата семявыносящего протока мыши вскрывают брюшную полость мыши, выделяют семявыносящие протоки, удаляют слой слизистой оболочки.

Конечный препарат длиной 10–15 мм фиксируют одним концом на держателе с платиновыми электродами, переносят в рабочую камеру, наполненную буфером Кребса, и закрепляют второй конец на чувствительном элементе механотрона. Буфер насыщают карбогеном (95% O₂, 5% CO₂).

На электроды подают электрические импульсы прямоугольной формы. Сокращения препарата регистрируют с помощью механотрона и преобразованные электрические сигналы фиксируют самописцем. Раствор исследуемого вещества добавляют в камеру с помощью микропипетки. Наличие агонистической/антагонистической активности исследуемого вещества проверяют добавлением в камеру эквивалентной концентрации раствора налоксона. По окончании регистрации систему промывают буфером.

5.3. Методика радиолигандного связывания

Желательно провести лиганд-рецепторный анализ для получения представлений о механизме действия изучаемого вещества. Этот метод позволяет непосредственно качественно и количественно оценить взаимодействие вещества с рецептором, изучить связь между структурой и действием, провести сравнительную оценку соединений по силе взаимодействия с рецептором. Соединения, обладающие анальгетическим действием, могут принадлежать разным фармакологическим классам, и выбор радиолиганда основывается на результатах исследований с анализаторами нейромедиаторных систем.

5.4. Метод регистрации биоэлектрической активности головного мозга на фоне исследуемого вещества

Желательно провести исследования регистрации биоэлектрической активности головного мозга на фоне исследуемого вещества. Исследования проводят в первую половину дня на самцах беспородных белых крыс. В мозг крысы вживляют долгосрочные электроды для регистрации биоэлектрической активности. Электроды вживляют в сенсомоторную область коры (+2, +2, +1–1,5), дорзальный гиппокамп (+2, +0,8–1, +3,5), латеральный гипоталамус (0, +0,2–0,5, +6,5), амигдалу (+1, +3, +7,5), ретикулярную формацию ствола мозга (+6,5, +1,5, +6,8–9,2) – структуры, принимающие участие в проведении ноцицептивных сигналов и формировании ответных реакций. Индифферентный электрод вживляют в носовую кость черепа. Координаты подкорковых структур (от Брегмы, сагитально, глубина) рассчитывают по атласу мозга крыс, приведенному Буреш и соавторами (1962). Операции проводят под хлоратгидратным наркозом (3%, 300 мг/кг, в/м).

Электроды изготавливают из нихромовой проволоки диаметром 120 микрон, в лаковой изоляции. Кончик электрода зачищают. Концы электродов припаивают к серебряным штырькам, которые крепятся на поверхности черепа зубным висфат-цементом. Регистрацию ЭЭГ проводят в экранированной камере в условиях свободного поведения животных. Для того, что бы избежать артефактов от движения штырьков, используют специальные пружинные контакты. Отводящие провода помещают в общий «экран», который заземляют. При обработке сигналов используют фильтр на 32 Гц и с постоянной времени 0,03. Компьютерный анализ ЭЭГ осуществляют с помощью специализированных программ (например, «Brainsys»). Программный комплекс выполняет следующие функции: ввод в компьютер многоканальной ЭЭГ и ее визуальное редактирование; фильтрацию, выделение артефактов и их устранение из анализируемого отрезка ЭЭГ; спектральный и когерентный анализ ЭЭГ и статистическую обработку полученных результатов.

При изучении влияния веществ на биоэлектрическую активность мозга крыс регистрация ЭЭГ производят до и после инъекции препаратов. Вычисляют изменения спектра мощности биоэлектрической активности мозга крыс на фоне действия препаратов с последующей статистической обработкой данных по методу Стьюдента.

5.6. Методы оценки взаимодействия вещества с анализаторами различных нейромедиаторных систем

Желательно получить представление о влиянии изучаемого вещества на эффекты анализаторов нейромедиаторных систем, в частности 5-окситриптофана, ареколина, апорморфина и др.

5.6.1. Тест встряхивания головой, вызванного 5-окситриптофаном

5-окситриптофан вызывает у мышей характерный кинез в виде резких встряхиваний головой, что объясняется активацией серотонинергической системы. Изучаемое соединение вводят самцам беспородных мышей до внутрибрюшинной инъекции 5-окситриптофана в дозе 200 мг/кг (доза, вызывающая гиперкинез может колебаться от 100 до 400 мг/кг). Количество специфических встряхиваний головы подсчитывают за период с 3 по 12 минуту после введения 5-окситриптофана (период регистрации подбирается в зависимости от активности в контрольной группе) [17]. Критерием антисеротонинового действия считают уменьшение числа встряхиваний головой.

5.6.2. Тест тремора, вызванного ареколином или оксотреморином

Ареколин или оксотреморин вызывают тремор у самцов беспородных мышей, связанный с активацией М-холинорецепторов. Изучаемое соединение вводят до подкожного введения ареколина в дозе 25 мг/кг или оксотреморина в дозе 0,5 мг/кг. Регистрируют продолжительность тремора [38]. Критерием холиноблокирующего действия считают уменьшение длительности тремора.

5.6.3. Тест вертикализации, вызванной апоморфином

Апоморфин гидрохлорид в дозе 5 мг/кг вызывает стереотипию у самцов беспородных мышей, проявляющуюся в вертикализации (доза, вызывающая вертикализацию, может колебаться от 2 до 7.5 мг/кг). Мышей помещают в цилиндрическую проволочную клетку диаметром 13 см и высотой 16 см. Изучаемое соединение вводят до подкожного введения апоморфина. Через 10 мин после введения апоморфина оценивают интенсивность вертикализации по четырехбалльной системе (по числу лапок, которыми животное держалось за вертикальную стенку) [44]. Регистрацию проводят каждые 2 мин на протяжении часа. Таким образом, максимальное число баллов составляет 120. Критерием дофаминоблокирующего действия считают уменьшение интенсивности вертикализации, оцененной в баллах.

5.6.4. Тест стереотипии, вызванной апоморфином

Апоморфин гидрохлорид в дозе 0.75 мг/кг вызывает стереотипию у самцов беспородных крыс. Изучаемое соединение вводят до подкожного введения апоморфина. Интенсивность стереотипии определяют через 20 мин после инъекции апоморфина и оценивают в баллах (максимальное число баллов равно 4): 1 — единичные стереотипные движения; 2 — нестойкая стереотипия; 3 — стойкая отвлекаемая стереотипия; 4 — стойкая неотвлекаемая стереотипия. Отвлекаемость определяют по хлопку в ладоши рядом с животным. Учитывают такие формы стереотипного поведения крыс, как принюхивание, укусы, зевания, лизания, горизонтальные покачивания головы, стойки, прыжки. Критерием дофаминоблокирующего действия считают уменьшение интенсивности стереотипии, оцененной в баллах.

Заключение

Результаты экспериментального изучения нового препарата с анальгетическим действием должны содержать материалы, доказывающие наличие у него специфической анальгетической активности, а также отличия и преимущества нового препарата перед уже известными анальгетиками. В исследовании должны быть обязательно представлены результаты сравнительного изучения нового анальгетика с референтными препаратами сравнения. Обязательными тестами в исследовании являются следующие: тест отдергивания хвоста от теплового излучения (tail-flick) или тест тепловой иммерсии хвоста при погружении в горячую воду, тест горячей пластины (hot plate), тест механического раздражения основания хвоста по Гаффнеру или тест механического раздражения лапы или хвоста по Randall и Selitto, метод оценки соматической боли, вызванной формалином, тест механического раздражения воспаленной лапы (карагениновый тест), метод оценки висцеральной боли, вызванной уксусной кислотой (тест уксусных корчей). При необходимости оценки влияния препарата на нейрогенную боль следует также использовать соответствующие методы, представленные в данных рекомендациях.

Необходимо обязательно провести оценку сопутствующих и возможных нежелательных эффектов, используя один из методов оценки влияния веществ на частоту дыхания, методы оценки влияния вещества на моторику ЖКТ и на температуру тела. Необходимо при длительном введении препарата исследовать развитие толерантности к нему и синдрома отмены при прекращении введения препарата без провокации налоксоном и при провокации налоксоном. Необходимо провести исследования по изучению подкрепляющих и стимульных свойств, хотя бы по одному из изложенных выше методов. Необходимо представить данные по механизму действия исследуемого препарата.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Колотилова А.Б., Гузевых Л.С., Валуиных Д.В., Емельянова Т.Е. Роль опиоидной системы в изменении болевой чувствительности, вызванном холодной и жаркой температурой окружающей среды // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*, 2008. — Т.145, № 6. — С. 652–655.
2. Крыжановский Г.Н. Центральные механизмы патологической боли // *Журнал неврологии и психиатрии*. — 1999. — Т. 99, № 12. — С.4–7.
3. Крыжановский Г.Н., Решетняк В.К., Кукушкин М.Л., Горизонтова М.П., Смирнова В.С. Болевой синдром у крыс после повреждения седалищного нерва // *Патологическая физиология и экспериментальная терапия*. — 1991. — Т.6. — С. 8–9.
4. Кукушкин М.Л., Игонькина С.И. Роль 5-НТЗ рецепторов в механизмах развития центрального болевого синдрома // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2003. — 135(6). — 647–652.
5. Кукушкин М.Л., Игонькина С.И., М.В. Чурюканов, В.В. Чурюканов, Бобров М.Ю., Безуглов В.В., Грецкая Н.В. Роль агонистов каннабиноидных рецепторов в механизмах подавления центрального болевого синдрома // *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. — 2006. — Т. 142, № 7. — С. 47–51.
6. Кукушкин М.Л., Хитров Н.К. Общая патология боли // *М.: Медицина*. — 2004. — 144 с.
7. Лебедев А.А., Шабанов П.Д. Сопоставление реакции самостимуляции и условного предпочтения места при введении фенамина у крыс // *Журнал высшей нервной деятельности*. — 1992. — Т. 42, Вып. 4. — С. 692–698.
8. Чурюканов В., Чурюканов М. Фармакология болеутоляющих средств // *Врач*. — №4. — 2002. — С. 29–33.
9. Abbott F.V., Franklin K.B.J. Noncompetitive antagonism of morphine analgesia by diazepam in the formalin test // *Pharmacol. Biochem. Behav.* — 1986. — V. 24. — P. 319–321.
10. Ben-Bassat J., Peretz E., Sulman F.G. Analgesimetry and ranking of analgesic drugs by the receptacle method // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* — 1959. — V. 122. — P. 434–447.
11. Bernalov A., Dumpis M., Piotrovsky L., Zvartau E. Excitatory amino acid receptor antagonist kynurenic acid attenuates rewarding potential of morphine // *Eur. J. Pharmacol.* — 1994. — V. 264(3). — P. 233–239.
12. Bernalov A., Lebedev A., Panchenko G., Zvartau E. Effects of abused drugs on thresholds and breaking points of intracranial self-stimulation in rats // *Eur. Neuropsychopharmacol.* — 1999. — V. 9(5). — P.377–383.
13. Bianchi C., Francheschini J. Experimental observations on Haffner's method for testing analgesic drugs // *Br. J. Pharmacol.* — 1954. — V. 9. — P. 280–284.
14. Chaplan S.R., Bach F.W., Pogrel J.W., Chung J.M., Yaksh T.L. Quantitative assessment of tactile allodynia in the rat paw // *J. Neurosci. Methods*. — 1994. — V. 53(1). — P. 55–63.
15. Chernov H.I., Wilson D.E., Fowler W.F., Plummer A.J. Non-specificity of the mouse writhing test // *Arch Int Pharmacodyn Ther.* — 1967. — V. 167(1). — P. 171–178.
16. Clavelou P., Dallel R., Orliaguet T., Woda A., Raboisson P. The orofacial formalin test in rats: effects of different formalin concentrations // *Pain*. — 1995. — V. 62(3). — P. 295–301.
17. Corne S.J., Pickering R.W., Warner B.T. A method for assessing the effects of drugs on the central actions of 5-hydroxytryptamine // *Br. J. Pharmacol.* — 1963. — V. 20. — P. 106–120.
18. Courteix C., Eschaliere A., Lavarenne J. Streptozotocin-induced diabetic rats: behavioral evidence for a model of chronic pain // *Pain*. — 1993. — V. 53. — P. 81–88.
19. D'Amour F.E., Smith D.L. A method for determining loss of pain sensation // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1941. — V. 72. — P. 74–79.
20. Fernandes M., Kluge S., Coper H. Quantitative assessment of tolerance to and dependence on morphine in mice // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* — 1977. — V. 297. — P.53–60.
21. Gordon C.J. Thermal biology of the laboratory rat // *Physiol. Behav.* — 1990. — V.47. — V 5. — P. 963–991.
22. Hargreaves K., Dubner R., Brown F., Flores C., Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia // *Pain* — 1988. — V. 32. — P.77–88.
23. Hughes J., Smyth T. W., Kosterlitz H. W., Fothergill L. A., Morgan B. A., Morris H. R. Identification of two related pentapeptides from the brain with potent opiate agonist activity // *Nature*. — 1975. — V. 258. — P. 5536. — P. 577–579.
24. Hunskaar S., Hole K. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain // *Pain*. — 1987. — V. 30(1). — P. 103–114.

25. Kalinina T.S., Garibova T.L., Voronina T.A. Discriminative effects of phenazepam and gidazepam in rats: comparison with other GABA-related drugs // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1999. – V. 64(2). – P. 397–401.
26. Kim S.H., Chung J.M. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat // *Pain.* – 1992. – 50(3). – P. 355–63.
27. Makanjuola R.O., Hill G., Dow C., Campbell G., Asshcroft G.W. The effects of psychotropic drugs on exploratory and stereotyped behaviour of rats studied on a Hole-Board // *J. Psychopharmacol.* – 1977. – V. 55. – P. 67–74.
28. McNamara C.R., Mandel-Brehm J., Bautista D.M., Siemens J., Deranian K.L., Zhao M., Hayward N.J., Chong J.A., Julius D., Moran M.M., Fanger C.M. TRPA1 mediates formalin-induced pain // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* – 2007. – V. 104. – № 33. – P. 13525–13530.
29. Merskey H., Bogduk N. Classification of Chronic Pain, Second Edition, IASP Task Force on Taxonomy // IASP Press, Seattle – 1994, pp. 209–214.
30. Molliver D.C., Immke D.C., Fierro L., Paré M., Rice F.L., McCleskey E.W. ASIC3, an acid-sensing ion channel, is expressed in metaboreceptive sensory neurons // *Mol. Pain.* – 2005. – V.1. – P.35.
31. Newbould B.B. Chemotherapy of arthritis induced in rats by Mycobacterial adjuvant // *Br. J. Pharmacol. Chemother.* – 1963. – V.21. – P.127–136.
32. Nilius B., Owsianik G., Voets T., Peters J.A. Transient receptor potential cation channels in disease // *Physiol. Rev.* – 2007. – V.87(1). – P. 165–217.
33. Overton D.A. State dependent learning and drug discrimination // In: *Handbook of Psychopharmacology.* – 1984. – Vol. 18. – P. 59–112.
34. Pelissier T., Pajot J., Dallel R. The orofacial capsaicin test in rats: effects of different capsaicin concentrations and morphine // *Pain.* – 2002. – V. 96(1-2). – P. 81–87.
35. Pellow S., Chopin P., File S. E., Briley M. Validation of open:closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat // *J. Neurosci.* – 1985. – V. 14(3). – P. 149–167.
36. Porsolt R.D. Animal model of depression // *Biomed.* – 1979. – V. 30(3). – P.139–140.
37. Randall L.O., Selitto J.J. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue // *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* – 1957. – V. 111(4). – P. 409–419.
38. Rathbun R.C., Slater J.H. Amitriptyline and nortriptyline as antagonists of central and periferal cholinergic activation // *Psychopharmacol.* – 1963. – V. Bd40(4). – P.511–125.
39. Schouenborg, J. Kalliomäki J. Functional organization of the nociceptive withdrawal reflexes. I. Activation of hindlimb muscles in the rat // *Exp. Brain Res.* – 1990. – V. 83(1). – P. 67–78.
40. Semenova S., Kuzmin A., Zvartau E. Strain differences in the analgesic and reinforcing action of morphine in mice // *Pharmacol. Biochem. Behav.* – 1995. – V. 50(1). – P. 17–21.
41. Sewell R.D., Spencer P.S. Antinociceptive activity of narcotic agonist and partial agonist analgesics and other agents in the tail-immersion test in mice and rats // *Neuropharmacol.* – 1976. – V. 15(11). – P. 683–688.
42. Smith E.S., Lewin G.R. Nociceptors: a phylogenetic view // *J. Comp. Physiol. A. Neuroethol. Sens. Neural. Behav. Physiol.* – 2009. – V. 195(12). – P. 1089–1106.
43. Terashvili M., Wu H.E., Schwasinger E.T., Hung K.C., Hong J.S., Tseng L.F. (+)-Morphine attenuates the (-)-morphine-produced conditioned place preference and the mu-opioid receptor-mediated dopamine increase in the posterior nucleus accumbens of the rat // *Eur. J. Pharmacol.* – 2008. – V. 587(1–3). – P. 147–154.
44. Vasse M., Protais P., Costentin J., Schwartz J.-C. Unexpected potentiation by discriminant benzamide derivatives of stereotyped behaviors elicited by dopamine agonists in mice // *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* – 1985. – V. 329. – P. 108–116.
45. Winter C.A. The potentiating effect of antihistaminic drugs upon the sedative action of barbiturates // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1948. – V. 94. – P. 7–11.
46. Woolfe G, McDonald AD. The evaluation of analgesic action of pethidine hydrochloride (Demerol) // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 1944. – V. 80. – P. 300–307.
47. Yamamoto H, Shimoshige Y, Yamaji T, Murai N, Aoki T, Matsuoka N. Pharmacological characterization of standard analgesics on mechanical allodynia in streptozotocin-induced diabetic rats // *Neuropharmacol.* – 2009. – V. 57(4). – P. 403–408.

ГЛАВА 13

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ПРОТИВОПАРКИНСОНИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТЬЮ

*Составители: д. м. н., проф. Т.А. Воронина; д. м. н., проф. Е.А. Вальдман;
к. б. н. Л.Н. Неробкова; к. б. н. И.Г. Капица*

Введение

Паркинсонический синдром (ПС) является проявлением ряда заболеваний различной этиологии — первичного паркинсонизма, включающего собственно болезнь Паркинсона; вторичного (сосудистого, травматического, токсического, вызываемого рядом ЛП), а также различных форм мультисистемной дегенерации. При ПС проявляется классическая триада симптомов — тремор, ригидность и олигокинезия. Несмотря на различия в этиологии, патогенетическая основа всех форм ПС одинакова. Основные нарушения при ПС связаны с нейродегенеративными процессами в базальных ядрах головного мозга. Дегенерация дофаминовых (ДА) нейронов в нигростриатуме, преимущественно в компактной части черной субстанции, является патохимическим коррелятом основных симптомов ПС — акинезии и ригидности. Недостаточность тормозного действия ДА нигростриатума приводит к гиперактивации холинергических (ХЭ) нейронов, с которой связывают проявления основных двигательных расстройств при ПС, особенно тремора. Кроме черной субстанции, патологические процессы при ПС развиваются в стриатуме, бледном шаре, вентролатеральном ядре таламуса и субталамических ядрах. Таким образом, дефицит ДА и гиперактивация ХЭ нейронов считается основным патогенетическим звеном паркинсонического синдрома. В зависимости от преобладания той или иной основной симптоматики в клинике выделяют акинетическую, акинетико-ригидную, ригидно-дрожательную и дрожательную формы ПС. Возникновение определенной формы ПС зависит прежде всего от того, нарушение какой медиаторной системы является инициальным звеном патологического процесса.

Группа противопаркинсонических средств включает в себя препараты различного механизма действия, направленного на основные звенья патогенеза ПС. Наибольшее значение имеют средства, повышающие дофаминергическую передачу. В качестве средства заместительной терапии широко используется метаболитический предшественник ДА — L-дофа (диоксифенилаланин) (леводопа), который в отличие от ДА проходит через гематоэнцефалический барьер и при участии дофадекарбоксилазы превращается в ДА. С целью уменьшения периферических побочных эффектов применяют комбинированные средства — L-дофа с ингибиторами периферического декарбоксилирования (ДДК) — синемет, наком — или бенсеразидом (мадопар). В 2003 г. впервые был разработан новый комбинированный препарат, включающий 3 компонента: леводопу, ингибитор ДДК и энтакапон: ингибитор фермента катехол-О-метилтрансферазы (КОМТ) — «СТАЛЕВО» (24 левин). Широко используются агонисты ДА рецепторов — парлодел (бромкриптин), лизурид, перголид, и ингибиторы МАО-В — селегелин, юмекс, депренил. В качестве монотерапии на ранних стадиях и в комплексной терапии применяются также холинолитические препараты — циклодол, паркопан, биперидин, акинетон и др. Отдельное место занимает амантадин (мидантан), механизм действия которого связывают с прямым до-

фаминергическим и холинолитическим эффектами за счет блокады NMDA-рецепторов. Однако большинство противопаркинсонических препаратов имеют много побочных эффектов и обладают ограниченной эффективностью, поэтому поиск новых средств лечения ПС остается актуальным.

Изучение активности потенциальных противопаркинсонических препаратов проводят на моделях ПС. Обычно прибегают к различным способам угнетения ДА передачи, прежде всего в nigростриатуме или активации ХЭ нейронов. Два типа этих моделей различаются по динамике развития процесса и его проявлениям и рассматриваются как воспроизводящие, соответственно, акинетико-ригидную или дрожательную формы ПС. При угнетении ДА передачи ПС возникает медленно, продолжается несколько суток, начинается с олигокинезии; преобладает акинетико-ригидная форма. Редукция симптомов начинается с ригидности, и их выраженность зависит от возраста животных. ПС при активации ХЭ системы развивается быстро, продолжается несколько часов, начинается с тремора, преобладает ригидно-дрожательная форма, редукция симптомов начинается с тремора, возраст экспериментальных животных существенного значения не имеет.

Результаты экспериментального изучения нового препарата должны содержать материалы, доказывающие наличие у него выраженной противопаркинсонической активности и преимуществ перед уже известными средствами.

Исследования следует проводить на различных видах лабораторных животных, например, мышах и крысах, а при необходимости можно использовать и более крупных животных (обезьян). По каждому тесту вещество изучают не менее чем в трех дозах. Должны быть использованы по меньшей мере два способа введения, один из которых соответствует предполагаемому клиническому способу применения препарата. Не менее чем по одному из основных тестов необходимо изучить кривую зависимости доза–эффект и определить продолжительность эффекта при использовании пути введения, соответствующего предлагаемому в клинике. Исследование противопаркинсонической активности вещества проводится обязательно в сравнении с наиболее известными эталонными препаратами этого же типа действия.

Полученные данные обрабатываются с помощью современных методов статистики и представляются в виде таблиц, а при необходимости — рисунков.

Основные методы оценки противопаркинсонической активности фармакологических средств

1. Методы оценки противопаркинсонической активности, основанные на угнетении дофаминергической передачи

Методы, основанные на угнетении ДА передачи, включают тесты, моделирующие развитие каталепсии и других экстрапирамидных нарушений введением дофаминергических веществ, а также модель ПС, индуцированного нейротоксином 1-метил-4-фенил-1, 2, 3, 6-тетрагидропиридином (МФТП), вызывающим избирательное повреждение ДА нейронов.

Каталепсию вызывают, как правило, введением различных нейролептиков, из которых чаще всего используют галоперидол и трифтазин. Типичные нейролептики вызывают блокаду ДА рецепторов, и при их назначении в больших дозах даже при однократном применении наблюдается развитие экстрапирамидных нарушений. Следует отметить, что данная модель имеет ряд недостатков. Под действием нейролептиков дегенеративные изменения в ДА нейронах и их терминалях не развиваются, в то время как при ПС отмечается гибель не менее 70–80% ДА нейронов компактной части черной субстанции. Однако данные методики моделируют выраженную каталепсию и позволяют установить наличие ДА звена в механизме действия исследуемого соединения и поэтому широко используются для оценки противопаркинсонических средств. Кроме того, для создания экстрапирамидных нарушений используется резерпин, вызывающий ДА-дефицитное состояние путем истощения запасов катехоламинов в ЦНС. Наиболее адекватной моделью ПС в настоящее время при-

знана методика с применением нейротоксина МФТП, вызывающего нейродегенеративные изменения ДА нейронов черной субстанции.

1.1. Методика каталепсии, вызванной галоперидолом

Галоперидол является типичным нейролептиком — производным бутирофенона. Действие его наступает быстро и продолжается длительное время. Механизм действия галоперидола связывают с блокадой ДА рецепторов, центральным альфа-адреноблокирующим действием и нарушением процесса обратного нейронального захвата и депонирования адреналина. Наиболее частым побочным эффектом галоперидола являются экстрапирамидные расстройства [16].

Исследования проводят на беспородных крысах (самцах) массой 180–220 г. В каждой группе — по 6–10 животных. Каталепсию вызывают внутрибрюшинным введением галоперидола в дозе 1 мг/кг. Препараты сравнения и исследуемые соединения вводят одновременно с галоперидолом. Антагонизм с галоперидолом оценивают в градуированной и альтернативной форме по способности исследуемых веществ уменьшать время каталептического состояния крыс и процент животных с каталепсией в группе. Продолжительность каталепсии измеряют через 30, 60, 120 и 180 мин. Как правило, эффект наиболее выражен через 120 мин.

1.1.1. Метод оценки каталепсии по Morpurgo

Продолжительность каталепсии измеряют в секундах по времени застывания животного в непривычной позе на ступеньках и оценивают в баллах. Животное усаживают на задние лапки так, чтобы, опираясь передней лапкой на ступеньку, крыса держала бы другую лапку без опоры. Если крыса сохраняет эту позу в течение 10 с при высоте ступени 3 см, засчитывают 1 балл, при высоте ступени 10 см — 2 балла. Поочередно помещают правую и левую лапу на нижнюю, затем на верхнюю ступени. Таким образом, максимальное развитие каталепсии у одного животного может быть оценено в 6 баллов. Попытки усадить животное в нужную позу продолжают не более 1 мин; степень каталепсии оценивают в баллах по группе.

1.1.2. Метод оценки каталепсии с использованием параллельных перекладин или стенок

Передние и задние конечности животного помещают на параллельные перекладки (стенки) таким образом, чтобы спина животного была прямой. Фиксируют время пребывания крысы в неподвижном состоянии. Оценивают общую продолжительность каталепсии, а также процент животных с каталепсией в группе. При альтернативном учете критерием наличия каталептического состояния считают пребывание в неподвижном состоянии на перекладинах (стенках) в течение 45 с. Попытки придать животному нужную позу не продолжают более 1 мин.

Возможна также оценка каталепсии на параллельных перекладинах или в кольце у мышей. В этих вариантах исследования дозу галоперидола, вызывающую каталепсию более, чем у 50% животных в контрольной группе следует подбирать с учетом выраженных линейных различий.

1.1.3. Метод оценки каталепсии с использованием горизонтального стержня

Мышь располагают у горизонтального стержня, закрепленного на высоте 4 см диаметром 0,5 см так, чтобы она опиралась на обе передние лапки (поза лектора). Попытки придать животному нужную позу не продолжают более 1 мин. Фиксируют время пребывания животного в неподвижном состоянии. Максимальное время наблюдения составляет 2 мин. При изменении позы или перемещении животного в течение отведенного для наблюдения времени его снова устанавливают в «позу лектора», но не более 5 раз.

Оценивают общую продолжительность катаlepsии, а также процент животных с катаlepsией в группе.

1.2. Методика создания катаlepsии, вызванной трифтазином

Трифтазин является типичным нейролептиком — производным фенотиазина, обладающим выраженным ДА-блокирующим и слабым аденолитическим действием. В больших дозах трифтазин вызывает отчетливые экстрапирамидные расстройства.

Исследования проводят на белых беспородных крысах-самцах. Для создания выраженных экстрапирамидных нарушений в эксперименте трифтазин (2 мг/кг внутрибрюшинно) вводится через 30 мин после введения исследуемых и эталонных веществ. Катаlepsию оценивают через 30 мин после введения трифтазина по одной из описанных выше методик. Наблюдение за животными можно осуществлять в течение 3–5 ч.

1.3. Модель экстрапирамидных нарушений, вызванных резерпином

Резерпин вызывает истощение запасов катехоламинов в ЦНС и в связи с этим позволяет моделировать ДА дефицитное состояние, наблюдающееся при ПС. У крыс резерпин вызывает снижение двигательной активности — олигокинезию и катаlepsию [3]. В настоящее время резерпиновая модель, которая не является строго селективной, так как резерпин вызывает истощение запасов нескольких нейромедиаторов, тем не менее используется в комплексе с другими тестами и позволяет косвенно судить о наличии дофаминергического компонента в спектре активности соединения.

Влияние препаратов на экстрапирамидные нарушения, вызванные резерпином, оценивают у белых беспородных мышей по тесту двигательной активности и по влиянию на вегетативные проявления действия резерпина: птоз, диарея, саливация, снижение температуры тела. Резерпин вводится в дозе 2,5 мг/кг внутрибрюшинно в суспензии с Твин-80. Исследуемые вещества вводят через 30 мин после введения резерпина. На данной модели существенно различаются проявления ПС в зависимости от возраста животных.

1.3.1. Оценка двигательной активности

Двигательную активность оценивают в актометре (Ugo Basile, Optovarimex или другой модификации) в течение 10 мин через 2 ч после введения резерпина. В актометр помещают группу животных. Обычно учитывают общий показатель по группе, при этом контрольная и получающие ЛС группы должны содержать равное количество животных.

1.3.2. Оценка вегетативных нарушений

Птоз регистрируют в баллах по величине глазной щели: 3 — полное закрытие глаз, 2 — щель до 1 мм, 1 — щель до 2 мм, 0 — глаза полностью открыты. Саливацию оценивают по размеру мокрого пятна на шее: 3 — до 2 см, 2 — до 1 см, 1 — до 0,5 см, 0 — отсутствие эффекта. Регистрируют наличие диарей. Температуру тела измеряют электротермометром с ректальным датчиком при погружении электрода на глубину 1,5–1,8 см.

1.4. Модель ПС, вызванного системным введением МФТП, у мышей и крыс

Модель ПС, вызванного введением нейротоксина МФТП, является наиболее адекватной моделью ПС, поскольку МФТП избирательно повреждает дофаминергические нейроны черной субстанции. МФТП при действии МАО-В в астроцитах превращается в 1-метил-4-фенилпиридиний (МФП⁺), который с помощью дофаминового транспортера поступает в ДА нейроны. Эффекты МФТП обусловлены токсическим действием МФП⁺, вызывающим энергетическую недостаточность, за счет ингибирования комплекса-I дыхательной митохондриальной цепи. Этот эффект наиболее выражен у приматов, у мышей некоторых линий, особенно С57В1/6. Доказана специфичность возникающих под действием нейротоксина изменений в нигростриатуме и у крыс, од-

нако они менее чувствительны к МФТП, что требует применения более высоких доз МФТП.

МФТП вводится внутривнутрибрюшинно в физиологическом растворе. Животным контрольной группы вводится физиологический раствор. Мышам МФТП может вводиться в остром и субхроническом режимах. Наиболее часто используют модель ПС, предложенную Sonsalla, Heikkilä (1986), которые вводили МФТП в дозе 20 мг/кг 4 раза в течение дня с интервалом в 1–2 ч. Субхроническая модель ПС была разработана Heikkilä с соавторами (1984), при которой мыши получали по одной инъекции МФТП (30 мг/кг) в течение 5–10 дней. При однократном введении нейротоксина мышам линии С57В1/6 вводят МФТП в дозе 30 мг/кг подкожно или 30–40 мг/кг внутривнутрибрюшинно; для белых беспородных крыс в возрасте 4–5 мес доза МФТП составляет 40 мг/кг, 7–8 мес — 30 мг/кг, 12 мес и старше — 20 мг/кг (ЛД₅₀ МФТП для крыс 4–5 мес — около 70 мг/кг). Крысам нейротоксин вводится однократно или через 12 ч в течение 2–4 суток.

Исследуемые вещества вводят обычно на фоне развернувшихся экстрапирамидных нарушений, но в зависимости от задач при однократном введении МФТП возможно введение исследуемых веществ за 30 мин до нейротоксина.

Оценку основных экстрапирамидных нарушений при однократном введении МФТП следует начинать сразу после его введения и продолжать наблюдение в течение 2–3 ч. Эффективность исследуемых препаратов оценивают по их способности ослаблять основные проявления ПС, вызываемого введением МФТП, — олигокинезии, ригидности и тремора, а также по наличию и выраженности вегетативных проявлений — слюнотечения, пилоэрекции, ретропульсии, нарушений дыхания.

1.4.1. Оценка выраженности ригидности

Мышечный тонус задних лап мышей и крыс определяют по сопротивлению пассивной флексии в голеностопном суставе. Для количественной оценки ригидности мышц туловища используют симптом «горбатости», выраженность которого зависит от мышечной ригидности и определяется по укорочению расстояния от шеи до основания хвоста за счет сгорбленности животного. Ригидность у крыс оценивается по балльной системе: 0 — отсутствие ригидности, 1 — укорочение расстояния от шеи до основания хвоста менее чем на 3 см, 2 — более чем на 3 см.

1.4.1.1. Оценка степени ригидности по длине шага

Оценку выраженности ригидности можно проводить и по длине шага животного — Stride Length Test [18], для этого лапы животного окрашивают нетоксичными красками (передние и задние лапы красят разным цветом). Животное опускают в узкий пенал (высота стенок 8 см, ширина 8 см, длина 50 см), пол которого выстлан белой бумагой. Измеряется расстояние (по прямой) между следами передней и задней лапок в 5 шагах животного. Шаги в начале и в конце аллеи не учитываются.

1.4.2. Регистрация двигательной активности

При ПС, вызываемом нейротоксином, наблюдается не только уменьшение количества движений, но и нарушение их качественной структуры. Понятие «олигокинезия» включает уменьшение количества и качества локомоторной активности животных. Животных тестируют в открытом поле, регистрируя в течение 5 мин число горизонтальных движений, вертикальных движений (стойки), поисковой активности (заглядывание в отверстия), груминг. Регистрация двигательной активности возможна в актометрах любого типа — Ugo Basile, Optovarimex и др. Регистрацию двигательной активности проводят до начала экспериментов и далее через различные интервалы времени после введения веществ в зависимости от характера эксперимента. Олигокинезия наиболее выражена через 90 мин после введения МФТП и сохраняется на протяжении 2–3 ч.

1.4.2.1. Регистрация локомоторной активности и координации

Для оценки моторного дефицита и степени нарушения координации у животных широко применяется тест «Вращающийся стержень». В зависимости от задач исследования и тяжести состояния животных используют разные скоростные режимы. Для мышей берется стержень диаметром 3 см (для усложнения задачи мышам предъявляют крысиный барабан с большим диаметром), вращающийся с постоянной скоростью 30 оборотов в мин, изменяющий направление вращения каждые 24 с. Максимальное время наблюдения 2 мин.

Для изучения моторного дефицита и координации у животных с ПС возможно дополнительное использование «Challenging Beam Traversal»-теста [6]. Установка представляет собой плексигласовую платформу, закрепленную на высоте 70 см, широкий конец которой свободно повисает в воздухе, а узкий выходит в темную безопасную камеру. Платформа состоит из 4 секций по 25 см каждая. Каждая секция имеет разную ширину — 3,5; 2,5; 1,5 и 1 см. Предварительно (за 2–3 дня до тестирования) животных обучают перемещаться по платформе, начиная с ее широкого конца и заканчивая узким. Животное считается обученным, если оно совершает 5 самостоятельных пробежек. В день тестирования на дорожку укладывается металлическая сетка (со стороной квадрата 1 см) на расстоянии 1 см от поверхности дорожки. Подсчитывается количество ошибок, число шагов и время движения по дорожке каждого животного. Ошибка засчитывается, когда лапа животного соскальзывает с сетки и повисает между сеткой и поверхностью дорожки. Животное может сделать максимум четыре ошибки при каждом шаге. Скольжение не засчитывается, если животное не сделало движения вперед или если голова животного повернута вправо или влево от оси дорожки. Данные, полученные в течение 5 попыток, усредняются.

Одним из хорошо воспроизводимых методов для оценки экстрапирамидных нарушений у грызунов ПС является «Pole Test» [14]. Мышь помещают на вершину металлического или деревянного стержня (50 см высотой и 1 см в диаметре, обернутого проволокой или бинтом с пробковым набалдашником диаметром 1,5 см) носом вверх, и измеряют время, необходимое животному для ориентирования — поворота головой вниз (t-поворота) и спуска вниз по стержню (t-спуска). Стержень крепится к основе, которая устанавливается в «домашнем» боксе животного. Животным, получившим МФТП, требуется гораздо больше времени для правильной ориентации в пространстве и спуска. Перед тестированием животных обучают в течение 2 дней (предъявляя по 5 проб в день). В день тестирования также осуществляют 5 посадок на вершину стержня и по полученным данным вычисляют среднее значение. Если мышь упала со стержня или не смогла спуститься в одной или более попытках, то записывают наибольшее время, полученное при выполнении других попыток.

1.4.3. Регистрация тремора

Тремор оценивают по выраженности в баллах и по продолжительности, регистрируя время начала и окончания. По локализации и амплитуде тремор выражают в баллах: 0 — отсутствие, 1 — локальный мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 — локальный среднеамплитудный тремор, 3 — генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела.

1.5. Модель ПС, вызванного 6-гидроксидофамином

Для моделирования нейродегенеративных процессов широко используется 6-гидроксидофамин (6-ГОДА). 6-ГОДА не проникает через гематоэнцефалический барьер, поэтому его введение осуществляют интравентрикулярно или непосредственно в ткань мозга. 6-ГОДА разрушает катехоламинсодержащие нейроны, снижает уровни ДА, норадреналина (НА), адреналина и метаболитов. Сходные изменения катехоламинергических нейронов вызывает 6-гидроксифенилаланин (6-ГОДОФА), который проходит через ГЭБ и

может применяться системно. После декарбоксилирования 6-ГОДОФА превращается в 6-ГОДА.

Модель с использованием 6-ГОДА считается моделью ПС у крыс, т.к. они наиболее подвержены действию нейротоксина, но описаны проявления его эффектов и у мышей, и у обезьян. 6-ГОДА вызывает характерное изменение позы животных — поворот головы и девиацию хвоста в направлении поврежденной стороны, а также типичные круговые движения и стереотипии (принюхивание, облизывание, покусывание). Таким образом, комплекс неврологических симптомов при моделировании паркинсонического синдрома применением 6-ГОДА значительно отличается от клинических проявлений паркинсонизма.

6-ОНДА растворяют в 0,9% растворе натрия хлорида с добавлением 0,02% аскорбиновой кислоты. В боковые желудочки вводят 100–250 мкг 6-ГОДА в 10–25 мкл растворителя. При введении в ткань мозга используют раствор 2 мкг/мкл, вводят не более 4 мкл со скоростью не выше 1 мкл/мин, чтобы уменьшить зону механического повреждения, в которой наблюдаются неспецифические изменения нейронов. Селективного действия в отношении ДА нейронов можно добиться предварительным введением дезипрамина (25 мг/кг в/б за 30 мин) — ингибитора высокоаффинного транспорта НА.

6-ОНДА (4–8 мкг в 4 мкл) вводят унилатерально в компактную область черной субстанции по координатам стереотаксического атласа (Anteroposterior — 3.7; mediolateral — 1.2; dorsoventral — 8.0). Нейротоксин вводят с помощью шприца Гамильтона со скоростью 1 мкл/мин. После окончания введения иглу не достают в течение 2–3 мин [11].

Спустя 3 недели после операции животных помещают в поликарбонатные боксы (60×75 см, высотой 19 см) и с целью оценки выраженности повреждающего действия нейротоксина вводят однократно d-амфетамин сульфат (5 мг/кг в/б). Через 30 мин после инъекции проводят регистрацию ипсилатеральных вращений, ежеминутно на протяжении 10–15 мин. Подсчитывают количество оборотов (полные обороты — 360°) в минуту в течение 10 мин, выводят среднее значение для каждой крысы. Крысы, продемонстрировавшие более 7 ипсилатеральных оборотов в минуту, вводятся в эксперимент. Такое поведение коррелирует с потерей до 75% клеток черной субстанции [8].

1.5.1. Регистрация спонтанной активности передних конечностей

Регистрация осуществляется в тесте «Цилиндр» [8]. Данный тест предьявляется через 3–4 недели после введения 6-ГОДА. Крыса помещается в прозрачный цилиндр диаметром 20 см и высотой 30 см. В ходе свободного поведения животного отмечается касание каждой передней лапки крысы со стенками цилиндра (всего 20 контактов). Результаты представляют в виде процентного отношения касаний лапки поврежденной стороны к общему количеству контактов. У интактных животных это отношение равно 50%. Снижение числа контактов лапки с поврежденной стороны со стенками цилиндра до ≤ 10% свидетельствует о тяжелом поведенческом дефиците, вызванном введением нейротоксина.

1.6. Потенцирование эффектов апоморфина

Потенцирование эффектов апоморфина (агониста дофаминовых рецепторов) указывает на способность исследуемого вещества оказывать стимулирующее влияние на дофаминергическую передачу в nigrostriатной системе головного мозга.

Эксперименты проводятся на белых беспородных крысах. Апоморфин вводится подкожно в дозах 0,3–1 мг/кг. Исследуемые вещества вводят за 15–30 мин до апоморфина. Оценивается выраженность стереотипных реакций — грызения, лизания, принюхивания. Принята трехбалльная шкала оценки: 1 балл — отдельные стереотипные движения (например, непостоянные принюхивания); 2 — интенсивная непродолжительная стереотипия (в т.ч. лизание, грызение); 3 — постоянная интенсивная стереотипия. Учитывается общая продолжительность стереотипного поведения.

Возможно проведение оценки эффектов исследуемого соединения на феномен «вертикализации» у мышей. Апоморфин вводится подкожно в дозе 2–5 мг/кг. Животных помещают в цилиндрические камеры с плексигласовым дном, изготовленные из проволоки толщиной 2 мм при расстоянии между прутьями 1 см. Регистрируют стереотипное поведение каждые 2 мин в течение 1 ч. Для феномена вертикализации число баллов соответствует числу лапок на сетке, другие формы стереотипного поведения оценивают, как описано выше. По окончании эксперимента подсчитывают суммарный балл стереотипии для каждого животного за все время наблюдения.

1.7. Потенцирование эффектов амфетамина

Введение амфетамина в дозах 2,5–5 мг/кг (подкожно) вызывает у крыс стереотипное поведение. Исследуемые вещества вводят за 15–30 мин до амфетамина. Интенсивность и выраженность стереотипных движений оценивают через 15–30 мин после введения амфетамина по методике, описанной в п. 1.6.

У мышей можно оценить влияние веществ на вызываемое амфетамином увеличение спонтанной двигательной активности. Животным через 15–30 мин после введения исследуемого вещества вводят подкожно 2,5–10 мг/кг амфетамина и регистрируют двигательную активность каждые 5 мин в течение 30 мин индивидуально у каждого животного в актометрах различного типа.

2. Методы оценки противопаркинсонической активности, основанные на активации холинергической системы

Как известно, ацетилхолин (АХ) является медиатором многочисленных интернейронов хвостатого ядра, и именно в этой структуре наблюдается наибольшая концентрация АХ. Холинергическая модель ПС воспроизводится различными способами: первичной активацией ХЭ нейронов хвостатого ядра (интракаудальное введение АХ с прозеринум), системным введением ареколина или оксотреморина.

2.1. Модель тремора, вызванного оксотреморином

Оксотреморин — активный метаболит треморина, специфический холинергический мускариновый агонист. Системное введение оксотреморина вызывает у крыс и мышей гипокинезию, генерализованный тремор и мышечную ригидность. При оценке тремора у крыс исходный раствор оксотреморина (в 1 мл — 1 мг) 1 мкл разводится в 20 мл дистиллированной воды и вводится внутривентриально в количестве 0,2 мл на 100 г массы тела животного.

Тремор оценивают по выраженности в баллах и по продолжительности, регистрируя время начала и окончания. По локализации и амплитуде тремор выражают в баллах: 0 — отсутствие, 1 — локальный мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 — локальный среднеамплитудный тремор, 3 — генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела. Кроме тремора регистрируются проявления ригидности, слюнотечения, пилоэрекции. Исследуемые вещества и эталонные препараты вводятся за 30 мин до введения оксотреморина. В зависимости от задач эксперимента возможно введение исследуемых веществ после введения оксотреморина.

2.2. Модель тремора, вызванного ареколином

Эксперименты проводят на мышах. Ареколин вводят подкожно в дозе 25 мг/кг. Исследуемые вещества и эталонные препараты вводят за 20–30 мин до введения ареколина. Регистрируют латентный период, продолжительность и выраженность тремора. По локализации и амплитуде тремор выражают в баллах: 0 — отсутствие, 1 — локальный мелкоамплитудный тремор головы, передних лап или хвоста, 2 — локальный среднеамплитудный тремор, 3 — генерализованный мелко- или среднеамплитудный тремор всего тела.

3. Электроэнцефалографические методы оценки паркинсонического синдрома

Эксперименты проводятся на белых беспородных крысах-самцах разных возрастных групп (от 4 до 8 месяцев), массой тела 220–600 г с хронически вживленными электродами.

Операции по хроническому вживлению электродов в мозг крысы проводят под нембуталовым (40–50 мг/кг, в/м) наркозом. Электроды изготавливают из нихромовой проволоки в лаковой изоляции диаметром 120 мкм (для корковых) и 70–80 мкм (для подкорковых). Электроды крепятся на поверхности черепа при помощи висфат-цемента и норакрила.

Координаты электродов рассчитывают при помощи стереотаксического атласа мозга крысы. Электроды вживляют в хвостатые ядра (ХЯ), бледный шар, сенсомоторную кору. Индифферентный электрод вживляют в носовую кость черепа.

Регистрацию биоэлектрической активности исследуемых структур мозга (кора, гиппокамп, гипоталамус, хвостатые ядра, бледный шар, черная субстанция) осуществляют на 3–5-й день после операции в условиях свободного передвижения животного путем монополярного отведения с использованием специальных программ для обработки ЭЭГ или биоусилителя электроэнцефалографа. Возможно одновременное применение компьютерной записи (проводят непрерывную запись в течение 5 ч) с использованием программ BRAINSYS, Canop и пр. Исследуемые вещества вводят через 10 мин после начала эксперимента. Контрольным крысам вводят плацебо. Эффекты оценивают по способности исследуемых препаратов устранять типичные изменения ЭЭГ на различных моделях ПС.

3.1. ЭЭГ корреляты нарушений при моделировании ПС оксотреморином

После введения оксотреморина наблюдается пачкообразная активность высокоамплитудных волн с заостренными вершинами. На фоне максимально выраженных олигокинезии и тремора наблюдается генерализованная пароксизмальная активность в виде групп синхронизированной медленной активности и групп более быстрых волн с заостренными вершинами во всех структурах с некоторым преобладанием в бледном шаре. Исследуемые вещества вводят животным с явлениями ПС и регистрируют динамику лечебного эффекта.

3.2. ЭЭГ корреляты нарушений при введении МФТП

При моделировании акинетико-ригидной формы ПС введением МФТП пачкообразная активность не наблюдается, преобладает дизритмичная активность и пароксизмальные разряды, а также высокоамплитудные медленные волны, преимущественно в ХЯ.

При однократном системном введении нейротоксина МФТП обычно наблюдается замедление электрической активности, на фоне которой регистрируются пароксизмальные разряды быстрых и медленных волн, а также сгруппированные волны частотой 9–10 Гц, амплитудой 50–70 мкВ, наиболее выраженные в ХЯ. Изменения ЭЭГ коррелируют с развитием олигокинезии, ригидности и тремора. Исследуемые вещества вводят животным с явлениями ПС и регистрируют динамику лечебного эффекта.

4. Дополнительные исследования, расширяющие представления о противопаркинсонической активности препаратов

4.1. Введение ацетилхолина с прозеринном в хвостатое ядро крыс

Введение ацетилхолина (АЦХ) с ингибитором холинэстеразы прозеринном в ХЯ моделирует гиперактивацию холинергической системы при ПС. Раствор, состоящий из 5 мкг АЦХ и 1 мкг прозерина, вводят в хвостатое ядро крыс. Внутримозговые инъекции осуществляются с помощью микрошприца Гамильтона, помещенного в микроманипулятор стереотаксического прибора, через специальные канюли, фиксированные на черепе животного. Фиксацию животных в стереотаксическом приборе, вживление канюль проводят под гексеналовым наркозом (150–180 мг/кг в/бр). Канюли для внутримозговых инъекций

устанавливают через специально подготовленные отверстия в черепе, стереотаксические координаты хвостатого ядра определяют по координатам стереотаксического атласа.

Эксперименты проводят через 1–2 суток после операции. Через 3–5 мин после микроинъекции АЦХ с прозеринном начинается тремор — эквивалент дрожательной формы ПС, затем развиваются ригидность и олигокинезия — эквивалент акинетико-ригидной формы. Исследуемые вещества вводят за 30 мин до микроинъекции. Регистрация тремора, олигокинезии и ригидности осуществляется по методам, описанным выше.

4.2. Модель ПС, вызванного внутримозговым введением 1-метил-4-фенилпиридиния (МФП+)

Токсический эффект МФП+ на нейроны черной субстанции обусловлен его конечным продуктом окисления — МФП⁺, который обладает высоким сродством к ДА нейронам. Введение МФП⁺ непосредственно в черную субстанцию (ЧС) вызывает у крыс выраженную дегенерацию ДА нейронов ЧС, снижение стриатного ДА и двигательные нарушения, характерные для ПС.

Исследования проводятся на белых беспородных крысах-самцах 9–10-месячного возраста. Животным под наркозом по координатам стереотаксического атласа в компактную зону ЧС билатерально имплантируются металлические канюли. Через 7–8 дней после операции с помощью микрошприца Гамильтона в каждое ядро ЧС через канюлю однократно вводят 10 мкг МФП⁺ в 2 мкл физиологического раствора. Животным контрольной группы вводят соответствующую концентрацию йодистого натрия в 2 мкл физраствора, так как 1-метил-4-фенилпиридин используется в виде йодита. Исследуемые вещества вводят на фоне развернутой картины ПС. Эффекты веществ оценивают по степени изменения олигокинезии, ригидности и тремора по методам, описанным выше. Следует отметить, что ПС регистрируется до 5–7 суток. При проведении длительного эксперимента надо учитывать, что введение МФП⁺ вызывает у животных адипсию и афагию, и поэтому следует применять искусственное вскармливание.

4.3. Модель ПС, создаваемого введением каиновой кислоты в ХЯ мозга

Каиновая кислота — аналог глутаминовой кислоты — вызывает блокаду ГАМК-ергических нейронов, что приводит к растормаживанию холинергических нейронов. Исследования проводятся на крысах. Животным под гексеналовым наркозом (100 мкг/кг) билатерально имплантируют металлические канюли (Д 0,22 мм) в ростральные отделы ХЯ по координатам атласа. Одновременно вживляют регистрирующие монополярные электроды в ХЯ и сенсомоторную кору головного мозга. Через 5–7 дней после операции с помощью микроинъектора вводят 5 мкл раствора каиновой кислоты (0,1–0,15 мкг) в каждое ядро. Животным контрольной группы вводят такой же объем буферного раствора. Исследуемые вещества вводят за 30 мин до микроинъекции.

Проявления ПС — ригидность, гипокинезия — развиваются быстро и сохраняются до 5–7 дней после однократной инъекции. Воспроизводится симптомокомплекс, характерный для акинетико-ригидной формы ПС. Эффекты веществ оценивают по степени изменения олигокинезии, ригидности и тремора по методам, описанным выше. На ЭЭГ, начиная с первых минут после введения каиновой кислоты, отмечается появление спайковых потенциалов в коре и возрастание амплитуды разрядов в ХЯ головного мозга. Периоды высокоамплитудной активности в ХЯ сменяются спайковыми потенциалами. Изменения ЭЭГ наблюдаются до 7 дней после введения каиновой кислоты.

4.4. Модель экстрапирамидных нарушений вызванных α-метил-пара-тирозином (АМПТ)

АМПТ (α-метил-пара-тирозин) подобно резерпину является эффективным агентом, истощающим катехоламины. АМПТ (иногда используемый в сочетании с резерпином) прямо тормозит тирозин гидроксиллазу — фермент, ограничивающий скорость биосин-

теза дофамина. Таким образом, возникающий (появляющийся, в стадии возникновения) синтез дофамина в нейронах компактной зоны черной субстанции и вентрального отдела покрышки прекращается, что приводит к истощению запасов дофамина.

4.5. Модель экстрапирамидных нарушений, вызванных липополисахаридом

Потенциальным вкладом в развитие БП и смерти клеток в базальных ганглиях может быть активация иммунного ответа. Черная субстанция богата микроглией, также как астроцитами, а прямая активация этих нейрональных клеток веществами, активирующими иммунный ответ, приводит к продукции таких агентов, как супероксиды, NO и цитокины, которые играют роль в медиации клеточной гибели близлежащих нейронов, таких как нигростриальные ДА нейроны. Одним из способов вызвать активацию иммунных ответов является инъекция веществ бактериального происхождения — липополисахаридов (ЛПС). Введение ЛПС в черную субстанцию приводит к избирательному и прогрессивному разрушению дофаминергических нейронов. ЛПС модель может быть использована также для изучения синергических эффектов активатора воспалительного пути с митохондриальным торможением, таких как ротенон.

ЛПС (strain O111:B4) вводят мышам C57BL/6 однократно в дозе 5 мг/кг внутривентриально. Через 10–12 месяцев проводится оценка экстрапирамидных нарушений, которые снимаются применением L-дофы [10].

Крысам ЛПС вводят однократно или с помощью минипомпы — хронически, в черную субстанцию. Предпочтительно использовать более старых животных. На 21 день после унилатеральной инъекции ЛПС (2 мкг) в черную субстанцию крыс линии Вистар потери ДА нейрона как в стриатуме, так и в черной субстанции достигают 50% [4].

4.6. Моделирование ПС интракаудальным введением антител к дофамину

Антитела к ДА получают иммунизацией кроликов по стандартной схеме конъюгатом ДА-белок. Гамма-глобулин из сывороток контрольных и исследуемых животных очищают от антител к белку-носителю методом иммунной хроматографии. Животным под гексеналовым наркозом по координатам стереотаксического атласа в ростральные отделы ХЯ билатерально имплантируют регистрирующие никромовые электроды. Через 5–6 дней после операции в каждое ХЯ вводят иммуноглобулины, содержащие антитела к ДА, по 200 мкг белка в объеме 5 мкл со скоростью 1 мкл/мин. Внутримозговые введения проводят с помощью микроинъектора в область, расположенную на расстоянии 1 мм от регистрирующего электрода. Регистрацию электрической активности проводят до и после введения антител на протяжении 5–7 ч и в течение 1–2 последующих суток. Исследуемые вещества вводят на фоне развернутой картины ПС.

Введение антител к ДА приводит к выраженному снижению двигательной активности, появлению периодов «застывания», периодической акинезии, совпадающих с периодами высокоамплитудной ЭЭГ активности в ХЯ. Через 20–25 мин после введения антител к ДА у большинства животных развивается приступообразный мелко- и среднеамплитудный тремор головы, который может сохраняться до 24 ч. Возникновение тремора коррелирует с появлением средне- и высокоамплитудной пароксизмальной активности в ХЯ. Редукция олигокинезии, ригидности и тремора сопровождается нормализацией электрической активности в ХЯ.

4.7. Повреждение токами высокой частоты нигростриатного проводящего пути в вентромедиальных отделах покрышки ствола мозга у приматов

На этой модели впервые получены прямые доказательства связи повреждения компактной части черной субстанции вследствие ретроградной дегенерации ее нейронов и

снижения содержания ДА в ипсилатеральном стриатуме. Разрушение у обезьян токами высокой частоты вентромедиальной тегментальной области на границе ростральных отделов моста со средним мозгом приводит к повреждению черной субстанции и снижению содержания ДА в ХЯ на стороне операции. При этом на стороне ипсилатеральной повреждению развиваются гипокинезия, ригидность и тремор конечностей.

4.8. Моделирование паркинсонического синдрома нейротоксином МФТП у приматов

Приматы являются наиболее чувствительными к нейродегенеративному эффекту МФТП. Введение МФТП проводят внутривенно, как правило, в условиях кетаминевой анестезии. Стабильный ПС развивается при повторных введениях, причем величина и кратность доз подвержены значительным индивидуальным колебаниям (от 0,75 мг/кг однократно до 2 мг/кг – 20 инъекций). У животных развивается выраженная гипокинезия, тремор конечностей при произвольных движениях, ригидность при пассивных движениях. Симптомы сохраняются на протяжении нескольких месяцев после последнего введения МФТП, выздоровления не наступает.

Другим методом создания ПС является введение МФТП в сонные артерии (0,5 мг/кг в 40 мл гепаринизированного физиологического раствора в течение 20 мин). В этом случае гипокинезия и тремор развиваются на стороне контралатеральной инфузии и затрагивают преимущественно верхнюю конечность. У некоторых животных наблюдается ипсилатеральное вращение. Симптомы гемипаркинсонизма сохраняются несколько месяцев. Эффекты исследуемых препаратов оценивают на фоне развернутой картины ПС.

4.9. Экспериментальный ПС, вызванный введением столбнячного токсина в ХЯ крыс

Введение столбнячного токсина приводит к локальному нарушению тормозных механизмов в ростральной части обоих ХЯ и к развитию у животных ряда невропатологических синдромов, в том числе ПС, который наблюдается на поздних стадиях патологического процесса.

Микроинъекции столбнячного токсина проводят по координатам стереотаксического атласа в оба ХЯ крыс. Фоновую активность нейронов ХЯ исследуют у наркотизированных животных. Анализ распределения нейронов по частоте импульсной активности показывает, что у животных с ПС в исследуемой области увеличивается число нейронов с более высокой частотой генерации потенциалов. Эффекты исследуемых препаратов оценивают на фоне развившихся проявлений ПС.

4.10. Ротеноновая модель паркинсонического синдрома

Ротенон является высоколипофильным веществом, способным свободно проникать через ГЭБ и биологические мембраны. Механизм действия ротенона, как и механизм действия МФТП, связан с митохондриальной дыхательной цепью. Преимуществом ротенонового метода моделирования болезни Паркинсона является способность ротенона провоцировать дофаминергическую нейродегенерацию, наиболее схожую по своим симптомам и молекулярно-биологическим признакам с таковыми у болезни Паркинсона. Олигокинезия, вызванная ротеноном, хорошо купируется препаратом L-DOPA.

Для моделирования болезни Паркинсона ротенон применяется по преимуществу на клеточных структурах и в эмбриологических исследованиях. На взрослых животных, в основном на крысах, ротенон применяется значительно реже в связи с его низкой химической стабильностью в животных тканях и физиологических жидкостях. Животным ротенон вводится инфузионно, с помощью микронасосов, преимущественно внутривенно.

Также используются субкутанный и внутрибрюшинный инъекционные способы введения (Fleming et al, 2004b).

У крыс инфузионное системное введение ротенона в течение недели вызывает билатеральное поражение стриатума и бледного шара, ДА нейродегенерацию в черной субстанции (с уменьшением количества нейронов на 30%). На уровне поведения действие ротенона проявляется в виде снижения количества вертикальных стоек, гипокинезии и даже в выраженной катаlepsии [5].

Недостатком модели является низкая селективность действия препарата — ротенон способен поражать практически все органы животных, вызывая некроз и даже неопластические изменения, в связи с чем ряд симптомов, которые ранее относили к паркинсоноподобному действию препарата — олигокинезию, проблемы с инициацией движения, можно отнести к общему ухудшению самочувствия исследуемых животных. Другим недостатком ротенона является его низкая химическая стабильность. Для формирования экспериментального паркинсонизма требуется большой период хронического введения ротенона (от 1 недели до 3 месяцев). Так, при подкожном введении ротенон растворяют в растительном масле и вводят в дозе (2 мг/кг/день) в течение 4 недель.

Высоко воспроизводимой моделью ПС у крыс (возраст 12–14 месяцев) является системное введение ротенона в дозе 2,75 или 3 мг/кг/день/7 дней внутривентриально в специально приготовленном растворе. У животных развивается брадикинезия, постуральная неустойчивость и/или ригидность, которые отменяются введением апоморфина [2]. Готовят маточный раствор ротенона 50 в 100% диметилсульфоксиде (ДМСО) и разбавляемый нейтральным триглицеридом Miglyol 812 N до достижения концентрации в 2,75 или 3,0 мг/мл ротенона в 98% Miglyol 812 N и 2% ДМСО. Раствор готовится 2–3 раза в течение недели, хранится в темноте, перед введением тщательно перемешивается. Раствор вводится в расчете 1 мл на 1 кг веса животного. Поведение животных изучают в 3, 6, и 9 дни эксперимента. Используют ряд тестов для выявления экстрапирамидных нарушений, а также тест апоморфиновой вертикализации. Апоморфин вводится в дозе 1 мг/кг подкожно, через 5 мин проводят оценку вертикальной активности, а через 10 мин — постуральной неустойчивости.

Также используется унилатеральное введение ротенона (12 мкг в 0,5 мкл димексида со скоростью 0,1 мкл/мин.) в «medial forebrain bundle» по координатам (AP:+0,2; L:±1,8; DV: 8 мм) стереотаксического атласа.

Интраингитральное однократное унилатеральное введение ротенона в малых дозах на сегодняшний день предлагается как одна из адекватных моделей ПС у крыс [19], которая воспроизводит длительные нейрохимические и нейрпатологические изменения, схожие с изменениями при БП в nigrostriatalной системе. Применение данного способа введения ротенона (в дозах 3-, 6- и 12-мкг) не вызывает изменений в периферических органах на протяжении 4 недель наблюдения.

Ротенон, растворенный в ДМСО, вводят в компактную зону черной субстанции правого полушария по стереотаксическим координатам (AP: 5,0 мм; L: 2,0 мм; DV: 8,0 мм) со скоростью 0,2 мкл/мин, иглу выводят из мозговой ткани спустя 5 мин после введения.

В течение первых 72 ч после операции проводят наблюдения на наличие любой аномальной активности крыс, например, появление ротационных движений. Тест апорфиново-индуцированного вращения проводят через 2 недели после интраингитрального введения ротенона еженедельно на протяжении 1,5 месяцев, а затем раз в месяц до достижения 6 месяцев, в зависимости от задач исследования. Апоморфин вводят в дозе 1,5 мг/кг и наблюдают за вращениями животного в течение 30 мин.

4.11. Модель L-дофа индуцированной дискинезии

Уже после 2–3 лет постоянного приема ДОФА-содержащих средств (ДСС) развиваются двигательные флюктуации и дискинезии более чем у 40% больных, риск появления которых увеличивается на 10% в год при продолжительной L-дофа терапии. Причинами двигательных флюктуаций являются: прогрессирующая, нарастающая с течением заболевания деген-

нерация nigростриарных нейронов, изменение функционального состояния и чувствительности дофаминергических рецепторов, колебание уровня леводопы в плазме, связанное с приемом ДСС, нарушение способности к захвату леводопы, синтезу из леводопы дофамина и нарушение депонирования дофамина и его высвобождения в синаптическую щель [15]. Факторами риска для появления L-дофа индуцируемых дискинезий (ЛИД) являются молодой возраст начала заболевания, продолжительность лечения и дозы леводопы, тяжесть и представленность признаков БП и женский пол. Поиск препаратов для предупреждения и лечения этого серьезного осложнения является крайне актуальным.

В последние несколько десятилетий для исследования ЛИД активно используются гемипаркинсонические крысы [15]. В условиях этой модели БП крысы получают внутримозговую унилатеральную инъекцию 6-ГОДА, что вызывает ипсилатеральное разрушение ДА нейронов и вращение крыс в сторону, противоположную стороне поражения. После инъекции дофаминовых агонистов, таких как апоморфин и L-дофа наблюдается контралатеральное вращение, а в ответ на введение дофаминовых антагонистов — амфетамина — крысы вращаются в ипсилатеральном направлении. На основе данного факта построена модель дискинезии, вызванной хроническим введением L-дофа [1, 9].

Спустя 3 недели после введения 6-ГОДА крысам вводят L-дофа в терапевтической дозе 6–10 мг/кг внутривнутрибрюшинно в течение 15 дней и бенсеразид (DL-serine 2-(2,3,4-trihydroxybenzyl) hydrazine hydrochloride) в дозе 15 мг/кг, подкожно, растворенный в физиологическом растворе с добавлением 0,1% аскорбиновой кислоты.

4.12. Оценка L-дофа индуцированной дискинезии по шкале аномальных непроизвольных движений

Шкала аномальных непроизвольных движений у крыс, вызванных ЛИД, включает стереотипные движения и контраверсивную ротацию [20]. Выделяют три типа стереотипий: дискинезия конечностей, осевая дискинезия и жевательная дискинезия. Дискинезия конечностей рассматривается как повторяющиеся миоклонические движения или дистонические положения передней конечности стороны противоположной поражению. Осевые дискинезии определяются как сгибания или осевое вращение шеи и туловища в направлении контралатеральной стороне поражения. Оролингвальная (орофациальная) дискинезия выражается в повторяющихся жевательных движениях челюсти, которые могут сопровождаться высыванием языка. Ротационное поведение определяется как повороты или вращательные движения в направлении противоположной стороне введения 6-ГОДА. Оценка аномальных непроизвольных движений проводится в баллах и основана на их продолжительности: 0 — отсутствие аномальных движений; 1 — редкие аномальные движения, которые занимают меньше 50% времени наблюдения; 2 — частые аномальные движения, которые занимают 50% времени наблюдения; 3 — аномальные двигательные акты, происходящие непрерывно, но прерываемые сенсорными стимулами (например, постукивание по боксу); 4 — непрерывные, непрерываемые сенсорными стимулами аномальные двигательные акты.

За каждой крысой наблюдают в течение 1 мин на протяжении 140 мин через каждые 35 мин. Баллы, полученные при оценке разных видов стереотипий и ротационного движения крысы, суммируются. Вычисляется среднее значение по группе.

5. Сопутствующие нейропсихотропные эффекты противопаркинсонических лекарственных средств, побочное действие и острая токсичность

В дополнение к данным об основной противопаркинсонической активности следует представить данные о других эффектах препарата и острой токсичности. Учитывая спектр фармакологической активности известных препаратов, близких по структуре исследуемому, определяют наличие или отсутствие седативного или активирующего эффектов, влияние на обучение и память, агрессивность и другие возможные эффекты.

Для оценки седативного или активирующего действия регистрируют поведение в открытом поле и в актометрах любого типа, используют тест залезания на сетку; изучение

влияния на обучение и память можно провести в тестах пассивного и активного избегания: для изучения миорелаксантного действия используются тесты вращающегося стержня, рефлекса подтягивания на перекладине, тест бокового положения; для оценки агрессивности можно использовать провоцирующий «драку» электрический ток. Исследование дополнительных эффектов проводят в широком диапазоне доз.

Острая токсичность изучается на двух видах животных, на которых изучалась основная активность, при тех же путях введения. Рассчитывается LD_{50} .

6. Изучение эффектов противопаркинсонических лекарственных средств при длительном введении и отмене

Учитывая, что лечение больных паркинсонизмом проводится длительными курсами, а также имеющиеся данные о снижении эффективности большинства известных противопаркинсонических препаратов при длительном применении, следует проводить оценку эффективности исследуемого вещества на нескольких базисных тестах при курсовом введении (не менее 1 мес.).

С целью оценки возможного синдрома отмены следует провести оценку основных показателей поведения и рефлексов животных после отмены длительного введения препарата (через 36–72 ч). Поскольку существует возможность усиления симптомов ПС на фоне резкой отмены препарата, целесообразно оценить реакцию животных по основным проявлениям ПС на основных моделях.

7. Исследование механизма действия противопаркинсонических лекарственных средств

Представляются данные по изучению механизма действия, имеющиеся на данный момент. Рекомендуются радиолигандные исследования, изучение сдвигов нейромедиаторного баланса, особенно ДА, АЦХ, серотонина.

8. Изучение взаимодействия противопаркинсонических лекарственных средств с другими препаратами

В связи с преобладанием заболеваемости паркинсонизмом среди людей пожилого возраста, имеющих, как правило, ряд сопутствующих заболеваний и принимающих другие препараты, рекомендуется оценить взаимодействие нового препарата с транквилизаторами, снотворными, а также с этанолом и, желательно, сердечно-сосудистыми препаратами.

9. Изучение общей фармакологической активности противопаркинсонических лекарственных средств, влияния на сердечно-сосудистую систему, дыхание

Наблюдение за состоянием животных осуществляют на мышах и крысах при введении препарата в широком диапазоне доз. При этом определяется повышение или снижение возбудимости, наличие судорог, гиперкинезов, изменение цвета кожных покровов, взъерошивание шерсти, птоз, стереотипия, груминг. Изучается пиннеальный, болевой, роговичный рефлексы, влияние на температуру тела, потребление воды и пищи. Влияние на ССС, дыхание и на периферические отделы нервной системы изучается на интактных или наркотизированных кошках, кроликах или крысах по влиянию на уровень кровяного давления, ритм сердечной деятельности, дыхания, а также на реакции, вызванные введением нейромедиаторов, например, адреналина, норадреналина, ацетилхолина, серотонина.

Заключение

В заключении кратко суммируются полученные данные о спектре противопаркинсонической активности, анализируются дополнительные и побочные эффекты, представляются сведения о преимуществах нового препарата перед известными средствами сходной направленности действия.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Bishop C., Taylor J.L., Kuhn D.M., Eskow K.L., Park J.Y., Walker P.D. MDMA and fenfluramine reduce L-DOPA-induced dyskinesia via indirect 5-HT_{1A} receptor stimulation. 2006. *Eur J Neurosci* 23: 2669–2676.
2. Cannon J.R., Tapias V.M., Na H.M., Honick A.S., Drolet R.E., Greenamyre J.T. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis.* 2009. 34(2): 279–290.
3. Colpaert F.C. Pharmacological characteristics of tremor, rigidity and hypokinesia induced by reserpine in rat. *Neuropharmacology*, 1987; 26(9): 1431–40.
4. Dutta G., Zhang P., Liu B.. The Lipopolysaccharide Parkinson's disease animal model: mechanistic studies and drug discovery. *Fundam Clin Pharmacol.* 2008. 22(5): 453–464.
5. Fleming S.M., Salcedo J., Fernagut P.O., Rockenstein E., Masliah E., Levine M.S., Chesselet M.F. Early and Progressive Sensorimotor Anomalies in Mice Overexpressing Wild-Type Human α -Synuclein. *J. Neurosci.* 2004a. 24: 9434–9440.
6. Fleming S.M., Zhu C., Fernagut P.O., Mehta A., Dicarolo C.D., Seaman R.L., Chesselet M.F. Behavioral and immunohistochemical effects of chronic intravenous and subcutaneous infusions of varying doses of rotenone. *Exp Neurol.* 2004b. 187(2):418–29.
7. Heikkila R.E., Cabbat F.S., Manzino L., Duvoisin R.C. Effects of 1-methyl-4-phenyl-1,2,5,6-tetrahydropyridine on neostriatal dopamine in mice. *Neuropharmacology*, 1984; 23(6): 711–3.
8. Kirik D., Rosenblad C., Bjorklund A. Preservation of a functional nigrostriatal dopamine pathway by GDNF in the intrastriatal 6-OHDA lesion model depends on the site of administration of the trophic factor. *Eur J Neurosci*, Nov 2000; 12(11): 3871–82.
9. Lindgren H.S., Rylander D., Ohlin K.E., Lundblad M., Cenci M.A. The «motor complication syndrome» in rats with 6-OHDA lesions treated chronically with L-DOPA: relation to dose and route of administration. 2007. *Behav Brain Res* 177:150–159.
10. Liu Y., Qin L., Wilson B., Wu X., Qian L., Granholm A.-C., Crews F.T., Hong J.-S. Endotoxin induces a delayed loss of TH-IR neurons in substantia nigra and motor behavioral deficits. *Neurotoxicology.* 2008. 29(5): 864–870.
11. Meredith G.E., Sonsalla P., Chesselet M.-F. Animal Models of Parkinson's Disease Progression. *Acta Neuropathol.* 2008; 115(4): 385–398.
12. Morpurgo C. Influence of phenothiazine derivatives on the accumulation of brain amines.
13. Ogawa №., Hirose Y., Ohara S., Ono T., Watanabe Y. A simple quantitative bradykinesia test in MPTP-treated mice. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol*, 1985; 50(3): 435–41.
14. Putterman D.B., Munhall A.C., Kozell L.B., Belknap J.K., Johnson S.W.. Evaluation of levodopa dose and magnitude of dopamine depletion as risk factors for levodopa-induced dyskinesia in a rat model of Parkinson's Disease's. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics.* 2007. Vol. 323, № 1: 277–284.
15. Sanberg P.R., Bunsey M.D., Giordano M., and Norman A.B. The catalepsy test: its ups and downs. *Behav Neurosci*, 1988; 102(5): 748–59.
16. Sonsalla P.K., Heikkila R.E. The influence of dose and dosing interval on MPTP-induced dopaminergic neurotoxicity in mice. *Eur J Pharmacol.* 1986; 129(3): 339–45.
17. Tillerson J.L., Miller G.W. Grid performance test to measure behavioral impairment in the MPTP-treated-mouse model of parkinsonism. *J Neurosci Methods.* 2003; 123(2): 189–200.
18. Xiong №., Huang J., Zhang Z., Xiong J., Liu X., Jia M., Wang F., Chen Ch., Cao X., Liang Z., Sun S. Stereotaxical Infusion of Rotenone: A Reliable Rodent Model for Parkinson's Disease. *PLoS One.* 2009; 4(11): e7878.
19. Winkler C., Kirik D., Bjorklund A., Cenci M.A. L-DOPA-induced dyskinesia in the intrastriatal 6-hydroxydopamine model of parkinson's disease: relation to motor and cellular parameters of nigrostriatal function. *Neurobiol Dis*, 2002; 10(2): 165–86.

ГЛАВА 14

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВОСУДОРОЖНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: д. м. н., проф. Т.А. Воронина; к. б. н. Л.Н. Неробкова

Введение

Эпилепсия представляет собой хроническое заболевание, характеризующееся повторными непровоцируемыми приступами нарушений двигательных, чувствительных, вегетативных, мыслительных или психических функций, возникающих вследствие чрезмерных нейронных разрядов в сером веществе коры головного мозга. Распространенность эпилепсии в популяции высока и достигает 0,5–0,75%, а среди детей — до 1% [3]. Диагноз эпилепсии основывается на регистрации моторных судорог и изменений электрической активности мозга (ЭЭГ). Эпилептические судороги представляют собой аномальные синхронизированные разряды, возникающие среди большой популяции нейронов. В зависимости от вовлекаемой нейрональной популяции могут возникать моторные, поведенческие нарушения, изменение сознания. Судороги являются однотипными для определенного больного, но очень существенно различаются между отдельными пациентами. Согласно Международной классификации эпилепсий, эпилептических синдромов и схожих заболеваний, принятой в 1989 г., эпилепсия не рассматривается как единое заболевание с различными приступами, а подразделяется на отдельные формы (эпилептические синдромы), имеющие свои электро-клинические особенности и различающиеся по прогнозу подходы к терапии. Эта классификация основана на классических представлениях о фокальных и генерализованных формах эпилепсии. Локальные формы эпилепсии диагностируются в том случае, если фокальный генез эпилептических приступов подтверждается данными ЭЭГ и методами нейровизуализации. В 2001 году комиссией ILAE был представлен новый проект классификации эпилепсий, согласно которой диагноз эпилепсии также ставится на основании анатомо-электро-клинических исследований [3].

Согласно симптоматической классификации судороги разделяют на парциальные (фокальные) и генерализованные. Парциальные судороги подразделяются на простые парциальные судороги с сохранным сознанием и комплексные парциальные судороги с нарушением сознания, когда пациент полностью не осознает окружающее; парциальные судороги могут переходить во вторично генерализованные с тонико-клоническими судорогами. Генерализованные судороги подразделяются на состояния, протекающие только с потерей сознания (абсансы) и с нарушением моторной активности (миоклонус, клонус, тонические, клонические, атонические судороги). Атонические и клонико-тонические судороги сопровождаются потерей сознания. Эпилептический статус характеризуется тем, что судорожные припадки следуют один за другим без восстановления сознания.

На основании анализа механизмов возникновения парциальных и вторично-генерализованных приступов была сформулирована концепция о корковом эпилептогенном очаге, играющем роль «водителя ритма». Показано, что гиперсинхронный разряд из первичного эпилептогенного очага распространяется на другие определенные участки мозга за счет чего формируется динамичная эпилептическая система с образованием вторичных эпилептогенных очагов, которые в свою очередь приобретают детерминантные свойства [1, 3, 6, 11].

Современные противоэпилептические препараты включают вещества различных классов химических соединений и механизма действия, многие из которых известны довольно давно: фенобарбитал (1912 г.), фенитоин (1938 г.), этосуксимид (1958 г.), клоназепам (1964 г.), карбамазепин (1967 г.), оксикарбамазепин, препараты вальпроевой кислоты (1974 г.), вигабатрин (1989 г.), ламотриджин (1991 г.), габапентин (1993 г.), топирамат (1995 г.), тиагабин (1996 г.), леватирацетам, фелбамат и др. Классификации противоэпилептических препаратов представлены в обзорах и книгах [2, 16, 39]. Несмотря на имеющееся структурное сходство — химическая структура фенобарбитала послужила основой для создания препаратов из классов гидантоина (фенитоин), суксинимида (эtosуксимид) и оксазолидина (триметацион), — эти вещества обладают различными противосудорожными эффектами. Фенобарбитал и фенитоин эффективны при подавлении генерализованных тонико-клонических судорог и простых комплексных парциальных судорог, тогда как этосуксимид эффективен в подавлении абсансов. Различны и основные механизмы их действия — фенитоин блокирует вольтаж-зависимые натриевые каналы, а этосуксимид блокирует кальциевые-T каналы. Появившиеся в 80-е годы противоэпилептические препараты нового поколения составили альтернативу препаратам первого поколения у 25% пациентов. В настоящее время наиболее широко применяемыми препаратами являются вальпроаты, фенитоин, карбамазепин. Эти препараты при изучении в эксперименте новых противосудорожных веществ следует в первую очередь использовать как эталонные.

Поиск новых противоэпилептических препаратов, в том числе и нового поколения, ведется прежде всего на основе оптимизации структур известных препаратов, изучения взаимосвязи структура–активность, что позволяет усилить противосудорожную активность, снизить побочные эффекты и улучшить нейропротекторные свойства. Другая стратегия включает изыскание новых препаратов на основе представлений о механизмах действия известных средств, что приводит к открытию мишеней, возможно и не вовлекаемых в эпилепсию, но участвующих в реализации действия противоэпилептических веществ. На настоящий момент наиболее продуктивной стратегией изыскания новых противоэпилептических веществ принято считать программу, включающую различные элементы обозначенных выше подходов.

При создании новых препаратов с противоэпилептической активностью необходимо также представлять, к какому типу судорог будет тропно действие будущего препарата в клинике, и на основании этого строить стратегию экспериментального изучения нового соединения.

1. Методики скрининга противоэпилептических веществ

Впервые батарея методов для изучения противоэпилептических веществ в эксперименте была предложена Goodman [22] и Swinyard [35]. Первое место в предложенной ими стратегии занимали методики максимального электрошока и антагонизма с пентентетразолом (коразолом), которые и до настоящего времени остаются основными моделями в первичных скрининговых исследованиях противоэпилептических препаратов. За рубежом наиболее часто для оценки противоэпилептических веществ в эксперименте используется (с различными модификациями) программа, разработанная в США, — ADDP (Antiepileptic Drug Development Program).

Настоящие Методические рекомендации по экспериментальному изучению веществ с потенциальной противоэпилептической активностью основываются на обозначенных выше подходах к поиску современных противоэпилептических препаратов с учетом их механизма действия и имеющихся представлений о патогенезе эпилепсии и ее проявлениях в клинике.

Первый этап выявления потенциальных противоэпилептических препаратов состоит в оценке противосудорожных свойств веществ в скрининговых исследованиях на моделях первично-генерализованной эпилепсии, включающих судороги, вызванные электри-

ческим (тест максимального электрошока) и химическим воздействием (тест антагонизма с коразолом) у мышей и крыс [1, 11, 26, 28, 31].

Программа исследования включает несколько последовательных фаз.

Выявление противосудорожной активности и определение ее уровня по величинам $ЭД_{50}$ (эффективная доза, оказывающая противосудорожный эффект у 50% животных). Исследования проводятся на мышах с использованием внутрибрюшинного введения вещества по тестам максимального электрошока (МЭШ) и антагонизма с коразолом (подкожное введение).

Определение уровня неврологического дефицита по величинам $ТД_{50}$ (доза, вызывающая нейротоксический эффект у 50% животных) по тесту вращающегося стержня в исследованиях на мышах при внутрибрюшинном введении вещества. Вычисление терапевтической широты действия соединения по показателям $ТД_{50}/ЭД_{50}$.

Определение острой токсичности вещества ($ЛД_{50}$) у мышей при внутрибрюшинном введении.

Определение активности соединения при введении внутрь мышам по тестам максимального электрошока (МЭШ), антагонизма с коразолом (подкожное введение) и вращающегося стержня.

Определение противосудорожной активности соединения при введении внутрь у другого вида животных — крыс — по тесту антагонизма с коразолом.

Сравнение активности нового соединения с активностью известных противосудорожных средств по тестам максимального электрошока (МЭШ), антагонизма с коразолом (подкожное введение) и вращающегося стержня.

Выбор для первой стадии скрининга противосудорожных веществ именно тестов максимального электрошока (МЭШ) и антагонизма с коразолом (подкожное введение) обусловлен качественным различием в развитии и проявлении этих судорожных припадков [35, 43]. Принято считать, что судороги, вызываемые МЭШ, моделируют «большие, Grant mal» судорожные припадки, а судороги, вызываемые подкожным введением коразола — «малые, petit mal» припадки. Эти тесты являются обязательными и в программе ADDP. Основной компонентой судорог при МЭШ является тоническая экстензия задних конечностей, и ее устранение вызывает фенитоин, карбамазепин, но не бензодиазепины и триметадиион. Основной компонентой коразоловых судорог являются клонические судороги и их устраняют бензодиазепины, триметадиион, вальпроат, но на них оказывает слабое действие фенитоин.

1.1. Тест максимального электрошока (МЭШ)

Эксперименты проводятся на мышах и крысах. Животные получают через корнеальные или пиннеальные электроды электрические стимулы (50 Hz, 50 mA для мышей и 50 Hz, 150 mA для крыс), длительностью 0,2 с. Используемый показатель — максимальная тоническая экстензия задних конечностей, которая возникает у 100% контрольных животных. Оценивается способность исследуемого вещества предупреждать развитие тонической экстензии при его введении внутрибрюшинно или внутрь перед проведением МЭШ. Для определения $ЭД_{50}$ — эффективной дозы вещества, оказывающей противосудорожный эффект у 50% животных, используется по меньшей мере 3 дозы вещества, и каждая доза испытывается на 8–10 животных. В качестве препаратов сравнения рекомендуется использовать фенитоин, карбамазепин и вальпроат.

1.2. Судороги, вызванные коразолом при его подкожном введении

Исследования проводят на беспородных белых мышах-самцах или мышах Crl:NMRI BR) массой 19–29 г. Каждая доза испытывается на 10 животных. Коразол вводится подкожно в область шейного отдела спины. В связи с высокой гигроскопичностью коразола и нестабильностью действующей дозы на первом этапе исследования определяется кривая зависимости доза–эффект для коразола. Животные наблюдаются в течение 30–60 мин

после инъекции коразола с регистрацией основного показателя — первых генерализованных клонических судорог с утратой рефлекса переворачивания. На основе этих данных рассчитывается методом пробит-анализа (Litchfield, Wilcoxon) доза, вызывающая судороги у 97% животных ($СД_{97}$). Эта доза может колебаться в зависимости от качества коразола от 50 до 120 мг/кг. После введения дозы $СД_{97}$ у всех контрольных животных развиваются судорожные проявления в следующей последовательности. 1. Одно или более миоклонических подергиваний всего тела. 2. Повторяющиеся клонические судороги передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 с без потери рефлекса переворачивания. 3. Генерализованные клонические судороги передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания. 4. Тоническая экстензия передних конечностей с потерей рефлекса переворачивания. 5. Тоническая экстензия передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания. У 90–100% контрольных животных после введения коразола обязательно должны наблюдаться судорожные проявления, описанные в пунктах 1–3. Для определения противосудорожной активности нового исследуемого соединения коразол вводят после соединения на пике его максимального эффекта и затем осуществляют регистрацию судорог в течение 30–60 мин. Животные, у которых не наблюдаются после введения вещества и затем коразола судороги в течение 30 мин, описанные в пункте 2 — повторяющиеся клонические судороги передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 с без потери рефлекса переворачивания или судороги последующих 3–5 стадий — рассматриваются как защищенные. Исследуется несколько доз соединения и на основании полученных данных методом пробит-анализа рассчитывается $ЭД_{50}$ и 95% доверительные интервалы (Litchfield, Wilcoxon).

1.3. Оценка нейротоксичности (ухудшение моторной функции)

Нейротоксичность у мышей и крыс прежде всего оценивается по нарушению координации движений по тесту вращающегося стержня. Неспособность животных удерживаться на вращающемся стержне в течение 1 мин, хотя бы один раз из 3-х попыток, учитывается как показатель нарушения этой функции. Для мышей, как правило, используется стержень диаметром 2,5 см и скоростью вращения 6 оборотов в минуту, а для крыс — диаметром 6 см и скоростью вращения 8 оборотов в минуту. Контрольные мыши удерживаются на вращающемся стержне по несколько минут, тогда как крысы требуют нескольких посадок на стержень. Исследуется несколько доз нового соединения и затем методом пробит-анализа рассчитывается $ГД_{50}$ (доза, оказывающая нейротоксическое действие у 50% животных) и 95% доверительные интервалы (Litchfield, Wilcoxon). Кроме того, возможно визуальное наблюдение за животными (крысы) с регистрацией нарушения походки, поз, мышечного тонуса.

1.4. Острая токсичность соединений

Острая токсичность изучается на двух видах животных, на которых проводилось исследование противосудорожной активности, при внутрибрюшинном и пероральном путях введения. Животные помещаются в индивидуальные клетки со свободным доступом к воде и пище. Регистрация гибели животных осуществляется через 24 ч после введения вещества. Вещество вводится не менее чем в 3–4 дозах. На основании полученных результатов рассчитывается $ЛД_{50}$ (Litchfield, Wilcoxon).

2. Методики судорог, используемые для изучения спектра противосудорожных эффектов исследуемых веществ

В зависимости от результатов исследования, полученных в скрининге, проводится более углубленное изучение действия новых веществ. Методы для дальнейшего изучения подбираются в зависимости от спектра противосудорожных эффектов изучаемого препарата.

2.1. Методики, моделирующие первично-генерализованные судороги

2.1.1. Судороги, вызванные пикротоксином при его подкожном введении

Исследования проводят на беспородных белых мышах-самцах или мышах Crl:NMRI BR) массой 19–29 г. Каждая доза испытывается на 10 животных. Пикротоксин вводится в дозе, вызывающей судороги у 97% животных (обычно доза 2,5 мг/кг), подкожно в область шейного отдела спины. Животные наблюдаются в течение 30–60 мин после инъекции пикротоксина. Соединение, с учетом пика его максимального эффекта, вводится до введения пикротоксина. В качестве критерия оценки противосудорожного действия нового вещества используется его способность подавлять развитие повторяющихся клонических судорог передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 с без потери рефлекса переворачивания. Исследуется несколько доз исследуемого соединения и на основании полученных данных методом пробит-анализа рассчитываются ЭД₅₀ и 95% доверительные интервалы (Litchfield, Wilcoxon).

2.1.2. Судороги, вызванные бикукуллином при его подкожном введении

Исследования проводят на беспородных белых мышах-самцах или мышах Crl:NMRI BR) массой 19–29 г. Каждая доза испытывается на 10 животных. Бикукуллин вводится в дозе, вызывающей судороги у 97% животных (обычно доза 2,7 мг/кг), подкожно в область шейного отдела спины. Животные наблюдаются в течение 30–60 мин после инъекции бикукуллина. Исследуемое соединение вводится, с учетом пика его максимального эффекта, до введения бикукуллина. В качестве критерия оценки противосудорожного действия нового вещества используется его способность подавлять развитие вызываемых бикукуллином повторяющихся клонических судорог передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 с без потери рефлекса переворачивания. Исследуется несколько доз исследуемого соединения и на основании полученных данных методом пробит-анализа рассчитываются ЭД₅₀ и 95% доверительные интервалы (Litchfield, Wilcoxon).

2.1.3. Судороги, вызванные стрихнином при его подкожном введении

Исследования проводят на беспородных белых мышах-самцах или мышах Crl:NMRI BR) массой 19–29 г. Каждая доза испытывается на 10 животных. Стрихнин вводится в дозе, вызывающей судороги у 97% животных (обычно доза 1,2 мг/кг), подкожно в область шейного отдела спины. Животные наблюдаются в течение 30–60 мин после инъекции стрихнина. Исследуемое соединение вводится, с учетом пика его максимального эффекта, до введения стрихнина. В качестве критерия оценки противосудорожного действия нового вещества используется его способность подавлять развитие тонических судорог, вызываемых стрихнином. Исследуется несколько доз нового соединения и на основании полученных данных методом пробит-анализа рассчитываются ЭД₅₀ и 95% доверительные интервалы (Litchfield, Wilcoxon).

2.1.4. Судороги, вызванные тиосемикарбазидом

Антагонизм с тиосемикарбазидом оценивается в исследованиях на мышах по способности исследуемых веществ предупреждать развитие судорог у животных. Оценку противосудорожного эффекта проводят по изменению латентного времени первого судорожного приступа, по наличию судорог и гибели животных. Тиосемикарбазид, как правило, в дозе 28 мг/кг (ЭД₉₇ — доза, вызывающая судороги и гибель у 97% животных), вводят внутрибрюшинно через 10–40 мин после введения исследуемого вещества. «Защищенными» считают животных, которые выживают в течение 90 мин после введения тиосемикарбазид.

2.1.5. Судороги, вызванные камфорой

Исследования проводятся на белых беспородных мышах-самцах массой 20–24 г. Камфора вводится в дозе 1 г/кг подкожно или внутрибрюшинно в масляном растворе.

Исследуемое вещество вводится до введения камфоры и затем регистрируется его способностью ослаблять выраженность судорог и выживаемость животных. Рассчитываются показатели ЭД₅₀.

2.1.6. Судороги, вызванные N-метил-D-аспартамом (NMDA) или квисквалатом

Исследования проводят на беспородных белых мышках-самцах или мышках Crl:NMRI (BR) массой 19–29 г. Каждая доза испытывается на 10 животных. NMDA или квисквалат вводят в желудочки мозга. В низких дозах NMDA или квисквалат вызывают интенсивные эпизоды клонических судорог, а при увеличении дозы примерно в 10 раз в картине судорог преобладает тоническая экстензия передних конечностей. Дозы, вызывающие эти судороги у 97% животных, могут варьировать. Наиболее часто для NMDA и квисквалата они составляют 0,2 мг/5мл для клонических судорог и 3 мг/5мл для тонических судорог. Животные наблюдаются в течение 30 мин после инъекции NMDA или квисквалата. Исследуемое соединение вводится, с учетом пика его максимального эффекта, до введения NMDA или квисквалата. В качестве критерия оценки противосудорожного действия нового вещества используется его способность подавлять развитие клонических и тонических судорог, вызываемых NMDA или квисквалатом. Исследуется несколько доз нового соединения и на основании полученных данных методом пробит-анализа рассчитываются ЭД₅₀ и 95% доверительные интервалы (Litchfield, Wilcoxon). Подробно методика описана в [34,36].

2.1.7. Методика определения судорожного порога для судорог, вызванных коразолом

Коразол (0,1% раствор) вводится (титруется) внутривенно в хвостовую вену мышей со скоростью 0,3 мл/мин (желательно использовать инфузионный насос). У контрольных животных при такой инфузии появляются следующие типы судорог. 1. Одно или более миоклонических подергиваний всего тела. 2. Повторяющиеся клонические судороги передних и/или задних конечностей длительностью более чем 3 с без потери рефлекса переворачивания. 3. Генерализованные клонические судороги (клонус) передних и задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания. 4. Клонические судороги, за которыми следует тоническая экстензия передних конечностей с потерей рефлекса переворачивания. 5. Тоническая экстензия задних конечностей с утратой рефлекса переворачивания (наблюдается не всегда, поскольку часто животные погибают раньше развития этой стадии).

В качестве критерия оценки противосудорожного действия нового вещества наиболее часто используется его способность предупреждать развитие 1, 3 и 4-й стадий судорог. Чтобы определить пороги судорожной реакции для различных стадий используются группы животных по 10–12 мышей для каждой дозы. Исследуемое вещество вводится внутривенно, и затем через определенный интервал времени, с учетом пика действия вещества, начинается титрование коразолом. Эффект вещества учитывается отдельно для каждой стадии как процент увеличения количества коразола, необходимого для получения судорог, характерных для этой стадии. Рассчитывается значимость различий в дозах коразола, требуемых для получения судорог у контрольных и получавших ЛС животных, обычно используя Student's t-тест. В случае получения статистически значимых эффектов по этим данным рассчитывается показатель TID₅₀ (threshold increasing dose) — доза увеличивающая порог судорог к коразолу на 50%, как правило, методом логарифмической линейной регрессии.

2.1.8. Методика киндлинга, вызванного введением коразола

Фармакологический киндлинг моделируется в исследованиях на мышках и крысах путем повторных введений коразола в дозе, не вызывающей судорожных состояний [6].

Мышам коразол вводят в подпороговой дозе, как правило, 30 мг/кг внутривнутрибрюшинно с интервалами не менее 24 ч. Крысы получают коразол в дозе 35 мг/кг по той же схеме. Оценку судорожных реакций у животных определяют по 4-балльной шкале: 0 баллов — отсутствие судорожных реакций, 1 балл — подергивания головы или отдельных мышц тела, 2 балла — серийные повторные подергивания всего тела, 3 балла — клонико-тонические судороги с «позой кенгуру» и «барабанный бой». 4 балла — клонико-тонические судороги с падением набок и постприступной депрессией, повторные клонико-тонические судороги и смерть. Наблюдения проводятся в течение 25 мин после введения коразола.

2.1.9. ЭЭГ исследование первично-генерализованной эпилептиформной активности, вызванной бемегридом

Первично-генерализованная эпилептиформная активность (ЭПА) в эксперименте создается в основном на крысах при внутримышечном введении 0,5% раствора бемегрида в дозе 10 мг/кг или коразола в дозе 25–30 мг/кг. Эксперименты проводятся на крысах массой тела 250–280 г с хронически вживленными электродами в сенсомоторную кору (координаты: 1,5–2 мм вперед или назад от брегмы и 2 мм вправо или влево от сагиттального шва) и некоторые подкорковые структуры, наиболее часто — в область дорзального гиппокампа (координаты: 3 мм назад от брегмы, 3 мм вправо или влево от сагиттального шва, на глубину 3 мм от поверхности кости) или миндалевидный комплекс. Операция по вживлению хронических электродов осуществляется, как правило, под нембуталовым наркозом за 5 дней до проведения эксперимента. Запись электрической активности обычно проводят в условиях свободного передвижения животного по камере. Регистрация биопотенциалов мозга осуществляется на чернилопишущем электроэнцефалографе или любым другим способом, позволяющим регистрировать и количественно оценить изменения эпилептиформных разрядов в электрограммах исследуемых структур и оценить противосудорожный эффект препарата. Исследуемое вещество вводят за несколько мин до введения бемегрида таким образом, чтобы пик их активности приходился на пик активности бемегрида. Оценка противосудорожного действия веществ проводится по изменению числа разрядов за минуту, длительности отдельных разрядов и общей длительности разрядов за минуту. Предполагается, что в основе действия веществ на число разрядов и их длительность лежат различные механизмы, и антиэпилептические эффекты могут выражаться как в уменьшении числа разрядов, так и в снижении их длительности, либо в сочетании этих эффектов.

2.1.10. Судороги, вызванные коразолом у рыб (zebrafish –Danio rerio)

Введение рыбам (zebrafish) коразола вызывает у них стереотипное поведение и клонические судороги. Выраженность эффекта зависит от дозы коразола. Внеклеточная регистрация электрографических разрядов после введения коразола осуществляется из области optic tectum рыбы. Эпилептиформные электрические разряды блокируются тетродоксидом, а также вальпроатом и диазепамом, и эффект препаратов имеет дозозависимый характер [13].

3. Методики, моделирующие парциальные (фокальные) и вторично-генерализованные судороги в хроническом эксперименте

Необходимость использования «очаговых» моделей эпилепсии при оценке действия противоэпилептических препаратов очевидна, так как известно, что противоэпилептические средства, которые успешно применяются при первично-генерализованной эпилепсии, часто оказываются неэффективными при различных формах очаговой и вторично-генерализованной эпилепсии (у 20–30% больных). Кроме того, показано, что во многих случаях эпилепсии, имеющей первично-генерализованные формы, могут существовать трудно диагностируемые очаги-генераторы [7].

Наиболее адекватными моделями для воспроизведения в эксперименте парциальных (фокальных) психомоторных судорог являются методики киндлинга, вызываемого повторной электрической стимуляцией (начиная с подпороговых значений тока) миндалины, гиппокампа или других областей лимбической системы, и кобальтовая модель эпилепсии [20]. В условиях этих моделей развиваются фокальные судороги, которые имеют сходство с комплексными парциальными судорогами у человека. Если продолжать электрическую или химическую стимуляцию, в дополнение к фокальным судорогам развиваются вторичные генерализованные судороги. Однажды развившись, повышенная чувствительность к электрической или химической стимуляции остается постоянной. При этих моделях развивается хроническая дисфункция мозга, вызывающая не только повышенную чувствительность к судорогам, но и длительное нарушение поведения.

3.1. Методика киндлинга, вызванного электрической стимуляцией миндалины

Исследование проводится на белых крысах — самцах или самках, беспородных или линии Вистар. У анестезированных животных, используя стерилитаксический прибор, вживляется один биполярный электрод в правую базолатеральную миндалину. Координаты электродов от брегмы — AP — 2.2, L — 4.7, V — 8.7. Индифферентный электрод помещают на череп над контралатеральной париетальной корой. После 2 недель после операции начинают моделирование киндлинга. Электрическая стимуляция миндалины осуществляется от электрического стимулятора (500 мА, 1 м/с, 50/с в течение 1 с) один раз в день до тех пор, пока не возникает 10-ти последовательных 5-стадийных судорог.

Оценку судорог при киндлинге осуществляют, как правило, по классификации Racine [29] по следующим стадиям: 1 — замирание, закрытие глазной щели, потергивание усов, принюхивание, фациальный клонус; 2 — наклон головы, связанный с более выраженным фациальным клонусом; 3 — клонус одной передней лапы; 4 — запрокидывание, часто связанное с билатеральным клонусом передних лап; 5 — запрокидывание с утратой равновесия и сопровождаемое генерализованными клоническими судорогами.

Электрическая активность миндалины регистрируется через биполярный электрод, вживленный в эту структуру мозга до и после стимуляции. Начинают стимуляцию с 10 мА и затем интенсивность увеличивается каждый день на 20% с интервалами в 1 мин, до тех пор пока не возникает разряды последействия продолжительностью более 3-х с — ЭЭГ спайки с амплитудой, по крайней мере в два раза превышающей обычную амплитуду, и частотой более 1/с. Определение порогов для разрядов последействия осуществляют с интервалами в два-три дня, до тех пор, пока все животные не воспроизводят судорожные пороги. У животных с киндлингом, кроме основного показателя — порога судорожной реакции, регистрируют длительность судорог — лимбических (стадии 1–2) и/или моторных судорог (стадии 3–5) и длительность разрядов последействия. Исследуемые вещества вводят животным со стабильным судорожным порогом и регистрируют ослабление описанных выше судорожных реакций. Повторные эксперименты на этих же крысах с тем же веществом или с другим препаратом можно проводить с интервалом в 7 дней. В заключение следует провести гистологические исследования по определению правильности нахождения биполярных электродов в миндалине [38].

Модель киндлинга, вызванная электростимуляцией миндалины, является наиболее распространенной моделью киндлинга. Однако кроме нее можно использовать киндлинг, вызванный электростимуляцией гиппокампа или других областей лимбической системы [43].

3.2. Методика эпилептогенного хронического очага, вызванного аппликацией кобальта у крыс

Эксперименты проводят на белых беспородных крысах-самцах массой тела 180–220 г с хронически вживленными электродами. Эпилептогенный очаг создается аппликацией

порошка металлического кобальта на поверхность сенсомоторной коры левого полушария (координаты — 1.5 мм, вперед от брегмы и 1.5–2 мм латеральнее сагитального шва). Операции проводят в условиях анестезии (как правило, под нембуталовым наркозом — 40 мг/кг, в/м). В черепе крысы просверливается отверстие диаметром 1 мм, в которое насыпают порошок металлического кобальта на высоту 2 мм. Канюлю закрепляют на поверхности черепа при помощи висват-цемента или любой зубопротезной быстротвердеющей пластмассы. Одновременно в мозг крысы вживляют электроды, изготовленные из нихромовой проволоки (диаметром 90–120 микрон), в лаковой изоляции для регистрации электрограмм. Концы электродов припаивают к посеребренным штырькам, которые закрепляются на кости черепа, так же как и канюля. Электроды вживляют в ипсилатеральную и контрлатеральную (по отношению к очагу) зону сенсомоторной коры и некоторые структуры лимбико-гипоталамического комплекса. Индифферентный электрод вживляют в носовую кость черепа. Биоэлектрическую активность исследуемых структур регистрируют у свободно передвигающихся животных ежедневно начиная со 2-го дня после аппликации кобальта. Ежедневное мониторирование электрической активности мозга крыс позволяет выявить особенности развития эпилептической системы в различные сроки после аппликации эпилептогена и выбрать наиболее информативные периоды для воздействия антиэпилептическими средствами. Подсчитывают число и длительность разрядов в минуту, длительность одного разряда, а также латентное время возникновения отдельных пароксизмов в каждой исследуемой структуре, что позволяет определить наиболее точно место приложения вещества и сделать предположение о возможном механизме действия вещества.

В развитии эпилептиформной активности крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом можно выделить стадии, различающиеся по электрофизиологическим и нейрохимическим характеристикам [4, 9, 10]. В первые два дня после операции в электрограммах всех исследуемых областей отмечаются эпилептиформные разряды, доминирующие в основном в электрограммах, записанных с поверхности двигательной коры в непосредственной близости от «эпилептогенного» очага. В это время у крыс отмечаются отдельные подергивания передней правой лапы или головы. Следует отметить, что на протяжении одного исследования в электрограммах одной и той же крысы могут присутствовать разнообразные пароксизмы: сгруппированные острые волны, высокоамплитудные острые волны, множественные пики, комплексы острых волн и комплексы «пик-волна».

К 3–4 дню после аппликации кобальта отмечается тенденция к генерализации эпилептиформной активности в зеркальный очаг и подкорковые структуры. К 5–6 дню после операции у всех крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом регистрируются генерализованные эпилептиформные разряды, одинаковые по амплитуде и синхронно возникающие во всех исследуемых структурах, в это время у животных отмечаются подергивания правой и левой передних лап, головы и туловища. Генерализованная активность сохраняется обычно в течение нескольких дней, с постепенным нарастанием ее в электрограммах подкорковых образований. Затем отмечается постепенное ослабление ЭпА в «истинном» очаге и некоторое усиление в «зеркальном» очаге и подкорковых структурах. Приблизительно к концу второй недели после аппликации кобальта эпилептиформная активность в электрограммах всех исследуемых областей ослабевает, возникая лишь при световой или звуковой стимуляции.

Таким образом, в развитии ЭпА в электрограммах мозга крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом в сенсомоторной области коры можно выделить три стадии: 1-й этап — начало развития эпилептической активности с наличием пароксизмальных разрядов в электрограммах коры ипсилатерального полушария и значительно меньшей выраженностью ее в других отведениях (24–48 ч после аппликации кобальта). 2-й этап — наличие генерализованных эпилептиформных разрядов как в контрлатеральном полушарии, так и в подкорковых структурах (5–6 сутки). 3-й этап — уменьшение эпилептических разря-

дов в кортикограммах первичного (истинного) очага и сохранность их в электрограммах зеркального очага и подкорковых структур (14 суток).

Исходя из этого изучение влияния новых веществ на ЭпА желательно проводить отдельно на каждом этапе. Наиболее важно исследовать действие исследуемых веществ в начальной стадии развития эпилептической системы (1–2 день после аппликации кобальта и на стадии генерализации ЭпА (через 5–6 дней после аппликации эпилептогена). Оценивается способность веществ устранять или ослаблять проявления судорожной активности в электрограммах исследуемых структур мозга по числу разрядов за минуту, общей длительности разрядов за минуту и длительности отдельных разрядов в каждой исследуемой структуре. Влияние веществ на вторично-генерализованные судороги оценивали по изменению ЭпА в электрограммах зеркального очага и подкорковых структур.

3.3. Модель парциальных судорог, вызванных аппликацией оксида алюминия в исследованиях на кошках

Для создания хронического эпилептогенного очага в экспериментах на животных используется применение оксида алюминия в опытах на кроликах и кошках. Эпилептиформная активность, регистрируемая в электрограммах сенсомоторной коры и подкорковых структур наблюдается в отдаленные сроки после аппликации эпилептогена и сохраняется в течение нескольких месяцев. Наиболее часто используется модель, предложенная Guergero-Figueroa [23] в исследованиях на кошках. Эпилептогенный очаг создается путем нанесения оксида алюминия в одну из специфических структур мозга (дорзальный гиппокамп, миндалина и пр.). При введении эпилептогена в область дорзального гиппокампа правого полушария регистрирующие электроды вживляются кошкам через 1 месяц после имплантации эпилептогена, так как только к этому времени появляются заметные изменения электрической активности в зоне первичного очага. Электроды вживляются в оба гиппокампа, миндалину и сенсомоторную кору обоих полушарий. Анализ развития первичного и вторичных очагов и формирования эпилептической системы проводится по изменению характера эпилептиформной активности (ЭпА). Регистрируется число разрядов и их длительность. При этом ЭпА может регистрироваться как во время двигательных (моторных) пароксизмов, так и без них. У животных с гиппокампальными эпилептогенными очагами наблюдается повышенная агрессивность, изменяется эмоционально-поведенческий статус. Таким образом, эта модель может использоваться не только для оценки специфического влияния антиэпилептических веществ на ЭпА, но и оценки их влияние на эмоциональную сферу в поведении животных. Однако данная модель применима в условиях хорошо финансируемой фирмы, так как требует длительного содержания животных в условиях вивария.

Использование криогенных очагов эпилепсии требует специальной техники и оборудования, что затрудняет широкое применение этой модели при изучении противосудорожных веществ.

3.4. Модель парциальных судорог, вызванных аппликацией пенициллина

Эксперименты обычно проводятся на крысах линии Вистар или белых беспородных крысах-самцах массой тела 180–250 г. За сутки до эксперимента в черепе животных просверливаются отверстия 2×4 мм над симметричными областями сенсомоторной коры головного мозга и устанавливаются монополярные корковые серебряные электроды для отведения электрической активности с указанных областей. Очаги эпилептической активности создаются аппликацией фильтровальной бумаги, смоченной раствором натриевой соли бензилпенициллина в концентрации 20000МЕ/мл. Исследуемые антиэпилептические вещества вводят либо на фоне устойчивой эпилептиформной активности, либо за 30 мин до создания очагов. Электрокортикограмму регистрируют у свободно передвигающихся животных. Оценку противосудорожных свойств веществ проводят по

изменению амплитудно-частотных характеристик эпилептиформных разрядов, их числу и продолжительности существования очагов [22].

4. Модель эпилептического статуса

Эксперименты проводятся на белых беспородных крысах-самцах массой тела 220–250 г с хронически вживленными электродами и кобальт-индуцированным эпилептогенным очагом в сенсомоторной области коры. Эпилептогенный очаг создается по методике, описанной в пункте. Начиная с 4-го дня после аппликации кобальта, ежедневно проводят ЭЭГ-мониторинг. Когда у крыс появляются отдельные клонические подергивания передних лап и/или мордочки, а в электрограммах исследуемых структур мозга отмечается стойкая эпилептиформная активность, проводят провокацию эпилептического статуса. Обычно наиболее благоприятными являются сроки на 7–8 день после аппликации кобальта, когда у всех крыс отмечаются стойкие изменения электрической активности отдельные клонические подергивания передних лап или головы. Эпилептический статус вызывают внутримышечным введением тиалактоном гомоцистеина (DL-homocysteine thiolactone (НСТ) в дозе 5,5 ммоль/кг, разводимого в 3,5 мл/кг нормального физиологического раствора непосредственно перед использованием. Мониторинг электрической активности проводится сразу после инъекции НСТ и до конца эксперимента, что позволяет определить точное время наступления генерализованных клонико-тонических приступов (ГКТП) и определить временные интервалы между последовательными приступами [42]. Для оценки способности веществ устранять развившийся статус исследуемые вещества вводят сразу после окончания второго приступа ГКТП. Контрольной группе животных в те же сроки вводят физиологический раствор в равных объемах. После этого наблюдение проводят не менее 30 мин. Способность веществ устранять эпилептический статус оценивается по уменьшению числа ГКТП, наблюдаемых после введения антиэпилептического вещества, и по длительности интервала между приступами ГКТП. Регистрируется процент животных, у которых после введения исследуемого вещества в различных дозах отсутствовали приступы ГКТП, и на основании этих данных рассчитывается ЭД₅₀.

Использование НСТ для провокации генерализованных тонико-клонических судорог у крыс с кобальтовым эпилептогенным очагом позволяет также оценить влияние веществ на вторично-генерализованные судороги. Развивающиеся при этом моторные и/или электрографические приступы оцениваются по их длительности, числу и характеру. При оценке моторных судорог учитывается наличие отдельных подергиваний передних конечностей, головы или отдельных мышц тела, комплексные подергивания, клонико-тонические судороги с «позой кенгуру» и «барабанный бой», клонико-тонические судороги с падением набок и постприступной депрессией, учитывается процент животных, у которых отмечается боковое положение. Кроме того, регистрируется появление агрессии или гиперактивности.

5. Генетические модели эпилепсии

5.1. Аудиогенные судороги у мышей линии DBA/2J

Исследования осуществляются на мышках линии DBA/2J возрастом 21–22 дня и массой 6–10 г. Мышей помещают в круглые пластиковые клетки (19–20 см диаметр) и включают звуковой сигнал 110 dB(12 kHz) в течение 60 с, регистрируя в этот период наличие судорог. Судороги оцениваются по балльной шкале: 0 — отсутствие судорог, 1 — дикий бег менее чем 10 с, 2 — дикий бег более 10 с, 3 — клонические судороги, 4 — экстензия передних конечностей/флексия задних конечностей, 5 — тонические судороги, 6 — остановка дыхания. Исследуемое соединение вводится до помещения животных в звуковую камеру. Статистические различия между контрольной и получавшими ЛС группами рассчитываются, как правило, по Mann-Whitney U-тесту.

5.2. Модель аудиогенной эпилепсии у крыс линии Молодкиной-Крушинского и NER крыс (Noda epileptic rats)

Аудиогенную эпилепсию моделируют и изучают на крысах линии Крушинского-Молодкиной (КМ), для которых характерно наличие обусловленной эпилептиформной реакции на звуковое раздражение [12]. Крыс подвергают акустическому воздействию в звукоизолированной камере размером 30х55х45 см в течение 90 с (сила звука 60–120 дБ). Звук вызывает у крыс резкое двигательное возбуждение, переходящее в клонико-тонический припадок. Для оценки наблюдаемого эффекта используются следующие количественные показатели аудиогенной реакции: латентный период возникновения двигательного возбуждения в ответ на звуковое воздействие (в с), интенсивность судорожного припадка (в баллах от 0 до 4) и характер судорожной реакции (одно- или двухволновой). Интенсивность судорожного припадка оценивается по следующей шкале: 0 баллов — отсутствие двигательного возбуждения, 1 балл — двигательное возбуждение (беспорядочный бег, прыжки), не заканчивающееся судорожным припадком, 2 балла — двигательное возбуждение, заканчивающееся падением животного на брюшко с последующими клоническими судорогами, 3 балла — двигательное возбуждение, заканчивающееся падением животного набок с клоническими судорогами, 4 балла — двигательное возбуждение с падением животного набок с тоническим напряжением всей мускулатуры и временной остановкой дыхания. Исследуемое вещество вводится до начала звуковой экспозиции, с таким расчетом, чтобы пик действия вещества приходился на время экспозиции. Оценка противосудорожных эффектов проводится по сумме баллов в контрольной и получавших ЛС группах, а также по изменению латентного времени возникновения двигательного возбуждения. Путем мутации выведены NER (Noda epileptic rats) крысы, у которых каждые 30 ч спонтанно возникают тонико-клонические судороги без внешнего раздражения [33].

5.3. Исследования на линиях животных с генерализованными эпилептическими абсансами

Изучение антиэпилептических свойств веществ по способности угнетать абсансы проводятся на генетических или мутантных линиях животных. Известна генетическая линия крыс WAG/Rij с генерализованными эпилептическими абсансами. Эксперименты на этих крысах позволяют использовать не только электрофизиологические, но и поведенческие методы анализа. При этом анализируется влияние веществ на число и длительность разрядов «пик-волна» и характер поведения [40].

Мутантная линия летаргических мышей Lh/Lh, у которых отмечаются спонтанные эпилептические абсансы, также используется для оценки антиабсансной активности новых веществ [21]. Предполагается, что в механизме нарушений, связанных с эпилептическими абсансами, ключевую роль играет подтип ГАМК-В рецептора, поэтому его агонисты усиливают судорожную активность и могут быть использованы для анализа антиабсансной активности. В связи с тем, что использование линейных животных не всегда доступно, в экспериментах на крысах абсансы могут быть вызваны введением пентилентетразола или гамма-оксибутирата [21].

6. Изучение спектра нейро-психотропной активности и побочных эффектов

В связи с тем, что известные противосудорожные препараты обладают, помимо основного, противосудорожного эффекта, другими проявлениями действия, следует изучить более подробно спектр нейро-психотропной активности нового препарата и получить сведения о его побочных эффектах. Следует получить данные о наличии или отсутствии у изучаемого вещества седативного или активирующего, анксиолитического и миорелаксантного действия, исследовать его возможное влияние на память. Для выявления этих эффектов следует использовать общепринятые тесты: регистрацию поведения в открытом поле и в различных актометрах, тест залезания на сетку, методики конфликтной

ситуации и приподнятого крестообразного лабиринта; для изучения миорелаксантного действия используются тесты вращающегося стержня, рефлекса подтягивания на перекладине, удерживания на перевернутой сетчатой платформе, тест бокового положения. Изучение эффектов новых соединений на процессы обучения и памяти следует проводить с использованием методик условных рефлексов активного и пассивного избегания, лабиринтных моделей. Исследование этих эффектов проводится в диапазоне терапевтических доз, оказывающих противосудорожный эффект.

Для расширения представлений о механизме действия нового соединения следует изучить его влияние на проявления действия различных нейромедиаторных анализаторов, например, на эффекты ареколина, треморина, 5-окситриптофана, фенамина, резерпина, дофамина, апоморфина, флумазенила, дизоцилпина и других.

Изучение побочных эффектов следует осуществлять в более широком диапазоне доз: от средних терапевтических до субтоксических, использовать не менее двух видов животных и путь введения, соответствующий предполагаемому клиническому. Данные по побочным эффектам нового препарата сопоставляются с данными, полученными для эталонных препаратов. Информация о побочных эффектах дополняется результатами, полученными в разделе «Изучение общей фармакологической активности».

7. Изучение толерантности и возможной лекарственной зависимости при длительном применении противосудорожного препарата и его отмене

В связи с тем, что противосудорожные препараты применяются, как правило, длительными курсами, необходимо исследовать эффекты нового вещества при его длительном применении (введение не менее 1 месяца). При хроническом введении препарата изучается его переносимость и развитие толерантности по противосудорожным, сопутствующим и побочным эффектам. Кроме того, необходимо провести исследования по изучению возможного абстинентного синдрома при отмене препарата после его длительного введения.

8. Исследование механизма действия нового противосудорожного соединения

Представляются данные по изучению механизма действия, имеющиеся на настоящий момент. Поскольку патомеханизм развития эпилепсии до настоящего времени еще полностью не раскрыт и не ясны точные молекулярные мишени для воздействия новых противоэпилептических веществ, изучение механизма их действия осуществляется, как правило, на основе представлений о механизме действия известных препаратов. Рекомендуется оценить действие новых веществ на функционирование натриевых и кальциевых Т-каналов, исследовать их действие на ГАМК-ергическую и возбуждающую глутаматергическую нейротрансмиссию. Поскольку в последние годы интенсивные и перспективные исследования ведутся среди антагонистов АМРА подтипов глутаматных рецепторов [30] или активаторов калиевых каналов [32], желательно получить данные о влиянии нового препарата на эти механизмы. В частности, с целью оценки роли глутамата и кальция в индукции и поддержании эпилептогенеза можно использовать модели current-clamp в опытах *in vitro*. На культуре нейронов гиппокампа показано, что однократная 30-минутная экспозиция глутамата вызывает повреждение нейронов, что приводит к появлению у них спонтанных повторяющихся эпилептиформных разрядов и высокочастотных спайков [18]. Антагонисты каннабиноидных рецепторов CB1 вызывают активность, подобную эпилептическому статусу, на модели эпилепсии в опытах *in vitro* на культуре гиппокампальных нейронов [18].

Появлению новых мишеней воздействия противоэпилептических веществ может способствовать исследование тканей из эпилептического очага человека или анализ генома человека с наследственной эпилепсией. Познания в этой области могут привести к созданию компенсаторной терапии.

9. Взаимодействие нового противосудорожного препарата с другими психотропными препаратами

В связи с широким использованием противосудорожных препаратов в наборе средств комбинированной терапии следует изучить комбинированное действие нового соединения с известными и наиболее часто применяемыми нейропсихотропными средствами, в частности, этанолом, снотворными, транквилизаторами, антидепрессантами и др.

10. Изучение общей фармакологической активности противосудорожного препарата, влияния на сердечно-сосудистую систему и дыхание

Наблюдение за состоянием животного осуществляется на мышах и крысах при введении препарата в широком диапазоне доз: от не оказывающих заметного влияния на общее состояние до вызывающих гибель. При этом определяется повышение или снижение общей возбудимости, увеличение или снижение двигательной активности, наличие тремора, судорожных подергиваний, судорог, гиперкинезов, изменение цвета кожных покровов, взерошивание шерсти, катаlepsия, птоз, стереотипия, груминг и т.д. Изучается пиннеальный, болевой и роговичный рефлекс, влияние на температуру тела, потребление воды и пищи.

Влияние на ССС, дыхание и на периферические отделы нервной системы изучается на интактных или наркотизированных кошках, кроликах или крысах по влиянию на уровень кровяного давления, ритм сердечной деятельности (желательно и других показателей работы сердца), дыхание, а также на реакции, вызванные введением нейромедиаторов, например, адреналина, норадреналина, ацетилхолина, серотонина, и в ответ на раздражение периферического отрезка блуждающего нерва и др.

11. Изучение фармакокинетики и биодоступности исследуемого вещества

Исследование фармакокинетики и биодоступности является необходимым и важным звеном исследования для любого препарата, и особенно с противосудорожным действием, в связи с необходимостью в последующем в значительном числе случаев осуществления фармакокинетического мониторинга в клинике. Изучение и расчет показателей фармакокинетики и биодоступности не отличается от таковых при изучении препаратов других типов действия.

Заключение

Изложенный выше комплекс методов позволяет выявить эффективные противосудорожные средства, определить их преимущества перед известными препаратами, возможные побочные эффекты и в дальнейшем предложить их для КИ в качестве противозлептических средств.

В заключении к отчету, представляемому в Минздравсоцразвития России, резюмируются данные, характеризующие всю совокупность противосудорожных эффектов представляемого соединения, а также сопутствующих нейротропных эффектов. Описываются выявленные побочные эффекты. Анализируются основные преимущества нового препарата перед известными средствами сходной направленности действия.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Воронина Т.А., Вихляев Ю.И., Неробкова Л.Н. и др. Характеристика фармакологических свойств феназепама. Методы исследования. — Кн. Феназепам (ред. С.А. Андронати) — Киев: изд. Наукова Думка, 1982. — С. 145–150.
2. Воронина Т.А. Фармакология современных противосудорожных средств.- Антиконвульсанты в психиатрической и неврологической практике (ред. А.М. Вейн, С.Н. Мосолов). — СПб.: Мед. инф. агенство, 1994. — С. 3–30.
3. Гусев Е.И., Коновалов А.Н., Бурд Г.С. Неврология и нейрохирургия. — 2004. — 450 с.
4. Дюмаев К.М., Воронина Т.А., Смирнов Л.Д. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС. — Издательство института биомедицинской химии РАНН, 1995.
5. Карпова М.Н., Глебов Р.Н., Панков О.Ю., Германе С.К., Клуша В.Е., Дубур Г.Я. Влияние блокатора СА-каналов риодипина на очаговую и генерализованную эпилептическую активность — Бюлл. экспер. биол. и мед., 1989. — Т. 108. — № 11. — С. 553–554.
6. Крыжановский Г.Н. Киндлинг как модель формирования эпилептической активности. Успехи физиологических наук. — 1988. — Т. 19. — № 4. — С. 12–31.
7. Крыжановский Г.Н. Общая патофизиология нервной системы. — М., 1997.
8. Крыжановский Г. Н. Дизрегуляционная патология. — М., 2002.
9. Неробкова Л.Н., Воронина Т.А. Нарушение обучения и структуры сна у крыс с эпилептогенным кобальтовым очагом в сенсомоторной области коры. — Бюлл. эксп. биол. и мед., 1988. — № 4. — С. 397–400.
10. Поздеев В.К. Медиаторные процессы и эпилепсия. — Л.: Наука, 1983.
11. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Незнамов Г.Г., Жердев В.П. Феназепам. 25 лет в медицинской практике. — М.: Наука, 2007. — 381 с.
12. Симеохина А.Ф., Федотова И.Б., Кузнецова Л.М. — Крысы линии Крушинского-Молодкиной как модель для изучения патологических состояний и методов их регуляции. Лаб. животные. — 1993. — Т. 3. — № 4. — С. 202–210.
13. Baraban SC, Taylor MR, Castro PA, Baier H -Pentylentetrazole-Induced Changes in Zebrafish Behavior, Neural Activity, and c-fos Expression-Neuroscience 2005; 131(3): p. 759–768.
14. Baraban C Zebrafish as a Simple Vertebrate Organism for Epilepsy Research in // Animal Models of Epilepsy: Methods and Innovations // Editor(s): Scott C. Baraban Series: Neuromethods, 2008, Volume No. 40, p. 59–74.
15. Commission on Classification and Terminology of the International League Against Epilepsy, *Epilepsia*, 1981, v. 22, p. 489–501.
16. Dichter M.A., Overview: The neurobiology of epilepsy, in J. Engel, T.A. Pedley (eds): *Epilepsy: A comprehensive Textbook*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia New York 1997.
17. Dam M., Gram L.(eds.) — *Comprehensive Epileptology* Raven Press, New York, 1991.
18. DeLorenzo RJ, Sun DA, Blair RE, Sombati S — An *in vitro* model of stroke-induced epilepsy: elucidation of the roles of glutamate and calcium in the induction and maintenance of stroke-induced epileptogenesis- *Int.Rev Neurobiol.* 2007; 81 p: 59–84.
19. Deshpande LS, Sombati S, Blair RE, Carter DS, Martin BR, DeLorenzo RJ. Cannabinoid CB1 receptor antagonists cause status epilepticus-like activity in the hippocampal neuronal culture model of acquired epilepsy. — *Neurosci Lett.* 2007, Jan 3; 411(1): p. 11–16.
20. Echaz Javier, Stephen Wong, Brian Litt — Seizure Analysis and Detection *In vivo*. — in // *Animal Models of Epilepsy: Methods and Innovations* // Editor(s): Scott C. Baraban Series: Neuromethods, 2008, Volume No. 40, p. 203–233.
21. Hosford D.A., Wang Y., Liu C.C., Snead O.C. Characterization of the antiabsence effects of SCH 50911, a GABA-B receptor antagonist, in the lethargic mouse, gamma-hydroxybutyrate and pentylentetrazole models. — *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1995. — V. 274. — № 3. — pp. 1399–1403.
22. Goodman L.S., Swinyard E.A., Toman J.E., Laboratory technics for the identification and evaluation of potentially antiepileptic drugs — *Proc. Am. Fed. Clin. Res.* — 1945. — V. 2. — pp. 100–111.
23. Guerrero-Figueroa R., Barros A., Lester B. and, Heath R.-Electrophysiological Studies of Hippocampal Epileptiform Discharges During Emotional Stages. — *Acta Neurol. Latinoamer.* — 1966. — V. 12. — pp. 6–26.
24. Levy R.H., Mattson R.H., Meldrum B.S. (eds) — *Antiepileptic Drugs*, 4th ed., Raven Press, New York, 1995.
25. Loscher W., Nolting B., - The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs. IY. Protective indices. — *Epilepsy Res.*, 1991a. — V. 8. — p. 1–10.

26. Loscher W., Fassbender C.P., Nolting B.,- The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs.II.Maximal electroshock seizure models.- *Epilepsy Res.*, 1991b. – V. 8. – p. 79–94.
27. Loscher W., Honack D., Fassbender C.P., Nolting B. The role of technical, biological and pharmacological factors in the laboratory evaluation of anticonvulsant drugs.III. Pentylentetrazol seizure models. – *Epilepsy Res.*, 1991ñ. – V. 8. – p. 171–189.
28. Porter R.J., Hessie B.J., Cereghino J.J. et al. Advances in the clinical development of antiepileptic drugs.- *Federation Proc.* – 1985. – V. 44. – p. 2645–2649.
29. Racine R.J. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II.Votor seizure. – *Electroenceph. Clin. Neurophysiol.* – 1972. – V. 32. – p. 295.
30. Rogawski M.A. in Stone T.W.(ed) – *CNS Neurotransmitters and Neuromodulators: Glutamate*, 1995. – V. 2. – CRC, Boca Ration, FL. – pp. 219–237.
31. Rostock A., Tober Ch., Rundfeldt C.et al. – D-23129: a new anticonvulsant with a broad spectrum activity in animal models of epileptic seizures – *Epilepsy research.* – 1996. – V. 23. – p. 211–223.
32. Rundfeldt C.- The new anticonvulsant retigabine (D-23129) acts as an opener of K⁺ channels in neuronal cells.- *Europ. J Pharmacol.* – 1997. – V. 336. – p. 243–249.
33. Sasa M., Hanaya R., Iida K., Akimitsu T., Kurisu K., Noda A., Serikawa T. [A novel epilepsy animal model (NER)] *Nihon Shinkei Seishin Yakurigaku Zasshi.* 1997 Feb; 17(1): p. 35–38.
34. Singh N.A., Swinyard E.A., White H.S. Effect of prototype anticonvulsants on N-methyl-D-aspartate (NMDA) induced seizures in mice. – *Fed. Am. Soc. Exp. Biol.*, 1988 – V. 2. – A 1068.
35. Swinyard E.A. Laboratory evaluation of antiepileptic drugs. Review of laboratory methods, *Epilepsia*, 1969, V. 10, pp. 107–119.
36. Swinyard E.A. Wolf H.H., White H.S., et al. Characterization of the anticonvulsant properties of F-721. – *Epilepsy Res.* – 1993. – V. 15. – p.35–45.
37. *SCRIP Reports – Epilepsy: A mature market or long-term prospect?* PJB Publications Ltd., Richmond, 1997.
38. Tober Ch. Rostock A., Rundfeldt Ch, Bartsch R. – D-23129: a potent anticonvulsant in the amygdala kindling model of complex partial seizures. – *Europ. J. Pharmacol.* – 1996. – V. 303. – pp. 163–169.
39. Unverferth K., Rundfeldt C. Antiepileptics. – *Ulmann's Encyclopedia of industrial chemistry*, sixth edition, – Wiley-VCH Verlag GmbH, D-69469 Weinheim, 1999. – p. 1–12.
40. Van Luijtelaa E.L., Coenen A.M. Effects of remacemide and its metabolite FPL 12495 on spike-wave discharges, electroencephalogram and behaviour in rats with absence epilepsy. – *Neuropharmacology.* – 1995. – V. 34. – № 4. pp. 419–425.
41. Walton N.Y. and Treiman D.M. Experimental secondarily generalized convulsive status epilepticus induced by D.L. – homocysteine thiolactone. *Epilepsy Res.*, 1988. – V. 2. – pp. 79–86.
42. Walton N.Y., Jaing Q., Hyun B., Treiman D.M. Lamotrigine vs. phenytoin for treatment of status epilepticus: comparison in an experimental model. *Epilepsy Res.*, 1996. – V. 24. – pp. 19–28.
43. White H.S., Patel S., Meldrum B.S. Anticonvulsant profile of MDL 27,266: an orally active, broad spectrum anticonvulsant agent. – *Epilepsy Res.* – 1992. – V. 12. – p. 217–226.
44. White H.S., Wolf H.H., Swinyard E.A. et al. A neuropharmacological evaluation of felbamate as a novel anticonvulsant. – *Epilepsia.* – 1992b. – V. 33 (3). – p.564–572.
45. Wong M. Stabilizing dendritic structure as a novel therapeutic approach for epilepsy. *Expert Rev Neurother.* – 2008 Jun; 8(6): p. 907–915.

ГЛАВА 15

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ НЕЙРОЛЕПТИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. Р.У. Островская; чл.-корр. РАМН, проф. К.С. Раевский;
д. м. н., проф. Т.А. Воронина; д. б. н., проф. Т.Л. Гарибова; д. м. н., проф. Г.И. Ковалев;
к. м. н. В.С. Кудрин; к. м. н. В.Б. Наркевич; к. м. н. П.М. Клодт*

Введение

Шизофрения (Schizophrenia — от греч. schizo — раскалывать, phren — ум, разум) — тяжелое психическое заболевание, распространенность которого, согласно различным статистическим данным, составляет от 0,1% до 1%. Шизофрения возникает преимущественно в молодом возрасте (15–25 лет) и протекает с быстро или медленно развивающимися изменениями личности особого типа. Прогрессирование заболевания ведет не только к ухудшению качества жизни, но и значительной дезадаптации больных в обществе. Проблема лечения шизофрении является одной из важнейших задач современной психиатрии.

Основными ЛС, применяемыми на протяжении последних 50 лет в терапии психотических состояний, являются нейролептики (антипсихотики). Наряду с их применением при лечении острых проявлений эндогенных заболеваний, они широко используются при различных невротоподобных расстройствах, включающих обсессивно-фобические, сенесто-ипохондрические, деперсонализационно-дереализационные, сверхценные нарушения, развивающиеся в рамках малопрогрессирующего шизофренического процесса, который протекает с постепенным углублением проявлений эмоциональной дефицитарности, когнитивных нарушений, формированием психопатоподобных и/или астенических изменений личности.

Известно, что используемые в клинической практике для лечения шизофрении классические нейролептики эффективны преимущественно в отношении продуктивных симптомов шизофрении, а их систематическое применение приводит к развитию неврологических нарушений экстрапирамидного типа и усугублению дефицитарной симптоматики заболевания. Возможности коррекции дефицитарной симптоматики связывались с атипичными нейролептиками последней генерации, обладающими, наряду с антидофаминовым действием, также серотонино-негативным эффектом. К ним относятся вещества разного химического строения: дибензазепины (клозапин и его аналоги), бензамиды (сульпирид), производные гамма-карболина (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. Однако эти препараты проявляют побочные эффекты, связанные с явлениями гиперпролактинемии: ожирение, сахарный диабет, гипертоническая болезнь, половые дисфункции. К тому же до 25–30% больных полностью резистентны к действию всех известных нейролептиков. Эти обстоятельства, так же как и разнообразие индивидуальных проявлений шизофрении у различных людей, диктуют необходимость поиска принципиально новых стратегий создания высокоэффективных антипсихотиков, лишенных побочных эффектов.

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 nigro-стриатной 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 родством к последнему.

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

Некоторые из этих методов достаточно трудоемки, требуют специального оборудования, в связи с чем могут рассматриваться в качестве дополнительных. Идеология и экспериментальные подходы, изложенные выше, легли в основу настоящих методических рекомендаций.

Методы изучения специфической активности нейролептиков

Все методы следует разделить на три группы:

поведенческие методы;

методы определения нейрорецепторного профиля соединения (в том числе методы радиолигандного связывания);

биохимические и другие дополнительные методы.

1. Поведенческие методы изучения специфической активности нейролептиков

1.1. Влияние на феномен «вертикализации», вызванной введением апоморфина у мышей

Исследования проводятся на мышах согласно методике [15]. Животных помещают в цилиндрические стандартные камеры с плексигласовым дном, высотой 14 и диаметром 12 см, изготовленные из проволочного прутка толщиной 2 мм при расстоянии между прутьями 1 см. Апоморфин (2–5 мг/кг) вводят подкожно непосредственно перед помещением животных в камеры. Регистрация стереотипного поведения проводится многократно каждые 2 мин. на протяжении 1 ч. Фиксируются следующие поведенческие показатели: количество лап животного на сетке (феномен «вертикализации»), обнюхивание, грызение, лизание, кусание при каждом наблюдении. Одновременно в исследовании наблюдается до 30 животных. По окончании исследований подсчитывается суммарный балл стереотипии для каждого животного за весь период наблюдений. При оценке число баллов соответствует числу лапок на сетке. Для других форм стереотипного поведения используются следующие критерии: обнюхивание — 1 балл (слабая стереотипия), грызение, лизание и кусание — 2 балла (выраженная стереотипия). Для каждой экспериментальной группы подсчитывается величина *Mim* с использованием критерия Манна-Уитни.

Данный тест имеет большее прогностическое значение для выявления собственно психотропного действия, чем тест апоморфиновой стереотипии у крыс, поскольку как типичные нейролептики, так и соединения с атипичным профилем обладают способностью угнетать феномен «вертикализации». Тест позволяет выявить способность веществ блокировать дофаминергическую передачу в мезолимбической системе мозга. В то же время следует отметить, что подобный эффект характерен также и для некоторых веществ, не обладающих антипсихотическими свойствами — пропранолола, диазепамы, амитриптилина, миансерина, ареколина, физостигмина и др.

В качестве модификации описанного теста предлагается использование амфетамина (2,5 мг/кг, внутривенно) вместо апоморфина.

1.2. Влияние на стереотипное поведение, вызванное введением апоморфина у крыс

Данный тест является одним из наиболее информативных и широко используется для выявления способности веществ блокировать дофаминергическую нейротрансмиссию в nigrostriatalной системе мозга. Подобное действие характерно для соединений с типичным профилем нейролептической активности. В качестве экспериментальных животных используются крысы. Животным подкожно вводится агонист дофаминовых рецепторов апоморфин в дозах 0,3–1 мг/кг. Оценивается интенсивность стереотипных реакций: приюхивания, грызения, лизания. Принята трехбалльная шкала оценки поведенческих феноменов, согласно которой отдельным стереотипным движениям (в том числе непостоянному приюхиванию) приписывается оценка в 1 балл, в то время как наличие непродолжительно длящейся интенсивной стереотипии (в том числе лизания и грызения) оценивается в 2 балла. Постоянная интенсивная стереотипия оценивается в 3 балла. Оценку проводят повторно в течение 1 мин через 15–30 мин после введения апоморфина, наблюдение ведется в течение 1–2 ч. Учитывается интенсивность и общая продолжительность стереотипного поведения.

Данный тест специфичен для нейролептиков, являющихся производными фенотиазина и бутирофенона. В то же время некоторые атипичные нейролептики, такие как сульпирид и клозапин, не оказывают заметного влияния на апоморфиновую стереотипию, карбидин может ее усиливать. В связи с этим результаты данного теста не могут считаться решающими для заключения о наличии антипсихотического эффекта.

Угнетение стереотипии указывает на способность исследуемого вещества оказывать угнетающее влияние на дофаминергическую нейротрансмиссию в nigrostriatalной системе мозга.

1.3. Влияние на эффекты малых (пресинаптических) доз апоморфина

Апоморфин в малых дозах (0,01–0,15 мг/кг) вызывает зевательные движения у крыс, что предположительно связано с влиянием на пресинаптические дофаминовые рецепторы. Для проведения теста группе из 8–10 животных вводится апоморфин в дозе 0,1 мг/кг, после чего подсчитывается число зевак каждого животного в течение часа. Известно, что нейролептики обладают способностью угнетать этот эффект апоморфина даже в малых дозах. Данный тест является наиболее чувствительным из существующих в настоящее время методик, позволяющих выявить способность нового соединения блокировать пресинаптические рецепторы дофамина.

1.4. Влияние на рвоту, вызванную апоморфином

Исследования проводят на собаках. Апоморфин вводят в дозе 0,1 мг/кг в вену и регистрируют появление рвоты. Все известные нейролептики угнетают рвоту, вызванную апоморфином, блокируя дофаминовые рецепторы рвотного центра продолговатого мозга.

1.5. Влияние на амфетаминовую гиперактивность у мышей

Амфетамин (фенамин) вызывает увеличение спонтанной двигательной активности у мышей, что связывают с усилением дофаминергической нейротрансмиссии предположи-

тельно в мезолимбической системе головного мозга. Животным спустя 15–30 мин после исследуемого вещества подкожно вводят амфетамин в дозе 2,5–10 мг/кг и регистрируют двигательную активность в актометре в течение 1–2 ч. Типичные нейролептики проявляют дозозависимый антагонизм по отношению к эффекту амфетамина, в то время как атипичные действуют, как правило, значительно слабее или не угнетают амфетаминовую гиперактивность. Вещества с антидепрессантной активностью могут усиливать эффект амфетамина.

1.6. Влияние на амфетаминовую стереотипию у крыс

Исследования проводят на крысах. Животным подкожно вводят амфетамин (фенамин) в дозе 2,5–5 мг/кг и через 15–30 мин регистрируют интенсивность стереотипных движений, используя шкалу, аналогичную описанной в разделе 1.2. Типичные нейролептики угнетают амфетаминовую стереотипию в отличие от атипичных, не проявляющих подобной активности в этом тесте. Более того, некоторые атипичные нейролептики (сульпирид, клозапин, карбидин) могут потенцировать стереотипию, что, очевидно, указывает на возможный антидепрессивный компонент в спектре их фармакологического действия.

1.7. Влияние на угнетение «стартл-реакции» и ее препульсовое ингибирование

Хотя указанные тесты четко позволяют выявить нейролептическую активность исследуемого вещества, более важную информацию о его клинических перспективах может дать «трансляционная» модель шизофрении [13], в качестве которой используется нарушение предстимульного торможения (ПСТ) в акустическом стартл-рефлексе (АСР). Этот феномен, который может быть воспроизведен как на человеке, так и на животных, заключается в уменьшении реакции вздрагивания на внезапный сверхпороговый звуковой раздражитель предшествующим слабым подпороговым стимулом. ПСТ является проявлением торможения сенсомоторных реакций (sensorimotor gating), дефицит которого лежит в основе нарушения селективного внимания у шизофреников [7]. Терапия нейролептиками устраняет дефицит ПСТ. Дефицит ПСТ, характерный для больных шизофренией, в эксперименте моделируется введением дофамино-позитивных либо глутамат-негативных веществ.

Исследования проводятся на крысах-самцах массой 250–300 г. За 24 ч до процедуры угашения АСР животных адаптируют к экспериментальной камере в отсутствие звуковых сигналов. При проведении сеанса угашения крыс помещают в экспериментальную камеру и в течение 5 мин регистрируют реакцию замиранья, затем предъявляют 10 сильных звуковых раздражителей длительностью 500 мс с интервалом между стимулами 20 с. Спустя 24 ч после обучения животных вновь помещают в экспериментальную камеру, в течение 5 мин регистрируют поведение замиранья с последующим тестированием долговременного привыкания АСР (10 звуковых стимулов через 20 с). Регистрация АСР осуществляется с помощью специальной камеры, соединенной через электронную систему тензоусилителя с самописцем и компьютером. Амплитуда АСР измеряется в течение 100 мс после подачи звукового раздражителя. Подача сильных звуковых сигналов осуществляется через усилительную головку. В качестве стимула используют широкополосный шум длительностью 500 мс и громкостью 110 дБ, а в качестве фонового, маскирующего звукового сигнала применяют широкополосный шум громкостью 72 дБ. Регистрацию реакции замиранья — времени полного отсутствия движения животного, включая движение вибрисс, осуществляют визуально. Если непосредственно перед акустической стимуляцией животному предъявляется дополнительный звуковой сигнал, наблюдается так называемое препульсовое ингибирование, т.е. уменьшение реакции на звуковой сигнал. Поскольку нейролептики избирательно подавляют феномен препульсового ингибирования, метод является достаточно специфичным.

1.8. Тест экстраполяционного извлечения

Исследования проводят на крысах массой 220–280 г, по методике [1] в экспериментальной установке, которая представляет собой цилиндрическую емкость с водой (диаметр 35 см, высота 40 см), наполненную водой с температурой 22°C на глубину 17,5 см от дна. В центре сосуда укреплен прозрачный стеклянный цилиндр диаметром 9 см, высотой 22 см, нижний край которого погружен в воду на глубину 2,5 см. Крыс помещают внутрь цилиндра хвостом вниз и наблюдают за поведением на протяжении 2 мин. Регистрируется латентный период двигательной активности, число безуспешных попыток избегания, реализуемых в форме прыжков, и латентный период подныривания. После совершения подныривания (или, в случае отсутствия подныривания, — по истечению срока тестирования).

1.9. Влияние на ориентировочно-двигательную реакцию и локомоторную активность

Исследования проводятся на мышах или крысах. Для определения ориентировочной реакции животное помещают в открытое поле, пол которого разделен на секторы. Подсчитывают число вставаний на задние лапы (вертикальная составляющая ориентировочной реакции), число пересеченных квадратов (горизонтальная компонента), а также число заглядываний в отверстия в полу (норковое поведение, отражающее исследовательскую активность) за 2,5–5 мин наблюдения.

Для регистрации двигательной активности используются различные типы актометров. В настоящее время наиболее распространенным является фотоэлектрический актометр типа «Варимекс». Источники света находятся напротив фотоэлементов, расположенных на различных уровнях внутри камеры. Пересечение животным луча света регистрируется счетчиком, данные могут выводиться на компьютер.

Для определения двигательной активности животных предварительно адаптируют к экспериментальной камере в течение 30 мин для исключения ориентировочной компоненты двигательной активности. В зависимости от задачи исследования наблюдение осуществляется в течение 0,5–4 ч.

Данные тесты позволяют выявить общее депримирующее действие. В то же время они не являются специфическими, поскольку многие вещества других фармакологических групп (снотворные, седативные, транквилизаторы) также способны угнетать ориентировочно-двигательную реакцию и локомоторную активность животных.

1.10. Изучение каталептогенных свойств веществ

Каталепсия, т.е. способность животного удерживать искусственно приданную ему позу, является одним из проявлений побочных нежелательных экстрапирамидных эффектов препаратов с нейролептической активностью. Для оценки каталептогенного действия вещества используют несколько разновидностей методов, позволяющих оценить способность животного (крысы, мыши) сохранять искусственно приданную позу [16]. Наиболее часто применяют тест «поза лектора». Передние лапы животного помещают на горизонтальную проволочную перекладину, расположенную на высоте 4 см (мыши) или 10 см (крысы), регистрируют время сохранения позы и определяют количество животных в группе удержавших «позу лектора» в течение 60 с [5]. В другом варианте, по Моргуно [10], регистрируется удержание лап на ступеньках высотой 3 см и 10 см (тест «лестница») и удержание животного на параллельных стенках. В тесте «лестница» оценивается способность крысы в течение 10 сек не возвращать в исходное положение лапу, поднятую на ступеньку. Глубина каталепсии оценивается по 6-балльной системе: 1 — только одна из передних лап остается на нижней ступеньке; 2 — последовательно обе лапы остаются на нижней ступеньке; 3 — только одна из передних лап остается на верхней ступеньке; 4 — последовательно обе лапы остаются на верхней ступеньке.

В тесте двух параллельных стенок крысу помещают между этих стенок высотой 11 см таким образом, чтобы передними конечностями она опиралась на одну стенку, а задними — на другую, так чтобы спина животного оставалась прямой. Фиксируется длительность удержания животного в этой неестественной позе. Максимальное время наблюдения составляет 120 с. При альтернативной оценке критерием наличия катаlepsии считают пребывание в неподвижном состоянии на перекладинах (стенках) в течение 45 с. Попытки придать животному нужную позу продолжаются не более 1 мин.

Катаlepsию можно оценивать и количественно с использованием различных шкал интенсивности. При этом в качестве критерия катаlepsогенного действия используют способность животных сохранять заданную позу в течение 60–120 с наблюдения. Тестирование проводят обычно каждые 30 мин в течение 3–4 ч, что позволяет получить информацию о динамике развития и продолжительности действия исследуемого вещества. Широко распространена шкала Di Chiara-Morelli, где 1 балл соответствует 15–29 с удержания позы, 2 балла — 30–59 с и 3 балла — 60 с и более. Следует, однако, учитывать, что при повторном тестировании интенсивность катаlepsии может увеличиваться не только за счет фармакологического эффекта вещества, но и вследствие выработки обстановочного условного рефлекса.

1.11. Изучение дискинетического потенциала нейролептиков

Длительное применение нейролептиков может вызывать у больных неврологические нарушения в виде дискинезии. Наиболее опасное осложнение длительного приема нейролептиков — поздняя дискинезия. Предполагается, что одной из причин развития дискинезии является компенсаторное увеличение числа дофаминовых рецепторов в ЦНС в ответ на длительную блокаду дофаминергической передачи, вызванную нейролептиками. Имеется корреляционная связь между дискинетическим потенциалом нейролептиков и их способностью вызывать гиперчувствительность дофаминовых рецепторов стриатума при повторном введении. Способность нейролептиков вызывать компенсаторное повышение активности дофаминергической системы удается выявить в эксперименте на животных при повторном введении веществ с их последующей отменой.

Исследования проводят на крысах. Исследуемые вещества вводят ежедневно в течение 3–4 нед. Параллельно контрольным группам животных вводится изотонический раствор NaCl и галоперидол 0,3–1 мг/кг внутривентриально в качестве эталонного препарата. Затем вещества отменяют и на 4–5-й день после отмены контрольным и получавшим ЛС животным вводят апоморфин 0,5 мг/кг. Каждые 15 мин в течение часа оценивают интенсивность апоморфиновой стереотипии. Если у животных, получавших изучаемое соединение, наблюдается усиление апоморфиновой стереотипии по сравнению с контрольной группой, то это свидетельствует о развитии гиперчувствительности дофаминовых рецепторов, а следовательно, о возможности появления дискинезии в условиях хронического применения. Биохимические доказательства гиперчувствительности могут быть получены с использованием методов радиолигандного связывания и определением величины V_{max} , отражающей число функционирующих дофаминовых рецепторов.

1.12. Влияние на ректальную температуру

В исследованиях используются мыши или крысы. Температуру измеряют при помощи электротермометра с ректальным датчиком. У мышей ректальная температура определяется при погружении электрода на глубину 1,5–1,8 см, у крыс — на глубину 2,5 см. Для большинства нейролептиков характерно гипотермическое действие.

1.13. Оценка влияния на гипногенный эффект барбитуратов

Известно, что потенцирование наркотического действия барбитуратов является свойственным для многих известных нейролептиков. Исследования проводят на мышах

массой 20–22 г. Предполагаемый нейролептик вводят внутривентриально за 10 мин до гексенала (30 мг/кг, внутривентриально). Указанная доза гексенала является подпороговой, т.е. при ее использовании засыпает лишь часть животных. Определяют процент уснувших животных, время наступления сна и длительность сохранения бокового положения (в минутах). Увеличение процента уснувших животных свидетельствует о повышении порога чувствительности к действию барбитуратов. Отсутствие у нейролептика влияния на длительность гексеналового сна позволяет предположить, что он не оказывает угнетающего влияния на микросомальные системы печени, метаболизирующие барбитураты. Это позволяет охарактеризовать препарат как «истинный потенциатор» по классификации [4].

1.14. Влияние на 5-окситриптофановый гиперкинез у мышей

Предшественник серотонина — 5-окситриптофан — вызывает у мышей характерный гиперкинез в виде резких встряхиваний головой (twitches) продолжительностью 30–60 мин, что объясняется активацией серотонинергической системы ЦНС. Группе из 8–10 мышей вводится внутривентриально 5-окситриптофан в дозе 300 мг/кг через 30 мин после введения исследуемого вещества. Подсчитывается число встряхиваний головой за 1 мин для каждого животного с интервалами 10 мин в течение 60 мин. Многие нейролептики угнетают встряхивания, что указывает на наличие у них центрального серотониноблокирующего действия. В ряде работ высказывается предположение о том, что антигаллюцинаторный эффект нейролептиков может быть связан с блокадой серотониновых рецепторов в ЦНС.

1.15. Влияние на ареколиновый тремор

Данный тест используется для выявления центрального М-холиноблокирующего действия веществ. Исследования проводят на мышах. Изучаемое вещество вводится однократно за 30 мин до подкожного введения ареколина в дозе 25 мг/кг. Регистрируется длительность тремора. О наличии антихолинергического действия говорит уменьшение продолжительности тремора или его полное устранение.

1.16. Влияние на условные рефлексы

Исследования проводятся на мышах или крысах. Используются методики, позволяющие быстро выработать условный рефлекс у животных. Наиболее часто применяются методы условного рефлекса активного или пассивного избегания, позволяющие изучить влияние соединений на скорость выработки и угасания условной реакции оборонительного типа.

1.16.1. Условный рефлекс активного избегания (УРАИ)

Известно, что оборонительные условные рефлексы проявляют высокую чувствительность к угнетающему действию нейролептиков. В связи с этим данная методика может быть рекомендована для включения в число обязательных тестов расширенного этапа изучения новых нейротропных соединений с потенциальной нейролептической активностью.

Сущность метода заключается в том, что крыса, стремясь избежать болевого раздражения через электродный пол, взбирается на вертикальный стержень и удерживается на нем в течение всего периода безусловного раздражения. Условным сигналом является звук (или свет); через 5 с к нему присоединяется электрическое раздражение, длящееся также 5 с. Как правило, крыса быстро усваивает безусловную реакцию бегства, а затем у нее возникает условно-оборонительный рефлекс, получивший название условного рефлекса избегания.

Для исследования веществ отбираются лишь крысы с прочным коротколатентным условным рефлексом (процент положительных реакций на условный сигнал без подкре-

пления в контрольных исследованиях должен быть не ниже 85–90%). Вещества вводятся внутривенно или пер ор в дозах, оказывающихся эффективными по тесту феноминовой локомоторной гиперактивности или апоморфиновой вертикализации у мышей. В исследованиях по изучению влияния на угашение УРАИ применяется только условный сигнал без болевого подкрепления. Реакция учитывается по степени увеличения латентного периода условной реакции, а также в альтернативной форме, т. е. по числу животных в группе, у которых подавление условного рефлекса было полным.

Все известные нейролептики замедляют выработку условного рефлекса и ускоряют его угашение. В отличие от психотропных веществ других фармакологических групп нейролептики влияют на угашение условного рефлекса в дозах, не вызывающих подавления двигательной активности.

Результаты исследований с условно-оборонительным рефлексом избегания обнаруживают удовлетворительную корреляцию с активностью нейролептиков в клинике при лечении психически больных.

1.16.2. Условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ)

Обучение основано на врожденном стремлении крыс к пребыванию в небольшом затемненном пространстве. Преимущество метода состоит в том, что в зависимости от изменения схемы введения веществ можно оценить их влияние на различные этапы формирования памятного следа — образование, фиксацию и воспроизведение приобретенного навыка избегания.

Выработку и воспроизведение условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) осуществляется в 2-секционной установке, состоящей из платформы размером 24,5×6 см, подвешенной над полом на высоте 1 м и освещенной лампой мощностью 60 Вт, и камеры размером 39×39×39 см с электродным полом и черными стенками. Электродный пол набран из металлических прутьев диаметром 3 мм, расстояние между прутьями — 11 мм. Отделение с электродным полом отгорожено от платформы гильотинной дверью, закрывающей отверстие 6×6 см.

Крысу помещают на ярко освещенную платформу хвостом к отверстию в камеру с электродным полом. Фиксируют латентный период первого захода в отделение с электродным полом (переходом считается перемещение животным всех 4 лап в другое отделение установки). По истечении 3 мин, в тот момент, когда животное находится в камере с электродным полом, отверстие в перегородке закрывается и через пол наносится неустраняемое электроболевое раздражение в виде 5 ударов током силой 0,45 мА и длительностью 1 с каждый. После этого крыса извлекается из установки.

Сохранность УРПИ оценивают через 24 ч после обучения. Для этого крысу снова помещают на висющую платформу и регистрируют время захода в камеру и время пребывания в камере. Воспроизведение УРПИ через 24 ч позволяет оценить долгосрочные мнестические процессы.

2. Определение нейрорецепторного профиля нового соединения

2.1. Общая стратегия исследования

Исследованиями последнего времени установлено, что рецепторы нейротрансмиттеров, прежде всего дофамина и серотонина, являются гетерогенными и подразделяются на несколько подгрупп. Так, среди дофаминовых рецепторов принято выделять 2 основные подгруппы, обозначаемые как D1 и D2, последние, в свою очередь, включают в себя D1 и D5 подтипы (подгруппа D1-подобных рецепторов) и D2, D3, D4 (подгруппа D2-подобных рецепторов). Принципиальное отличие между рецепторами состоит в том, что первые активируют синтез циклического АМФ, вторые либо его угнетают, либо не оказывают влияния. Описано также несколько подтипов серотониновых рецепторов, сходство к которым проявляют многие из современных антипсихотических

средств. Наиболее важными для понимания механизма нейролептического действия являются рецепторы 5-НТ₂ подтипа. Для всех указанных выше подтипов нейрорецепторов созданы вещества — лиганды, проявляющие ту или иную степень избирательного действия, в основе которого лежит специфическое сродство (аффинитет) к данному рецептору. В переднем мозге наиболее широко представлены рецепторы D₁, D₂ и 5-НТ₂ подтипов, с которыми взаимодействуют практически все известные в настоящее время нейролептики.

В связи с этим определение способности нового соединения с предполагаемой антипсихотической активностью связываться с указанными подтипами рецепторов является обязательным условием его доклинического изучения. Нейролептики последнего поколения, включая клозапин, оланзепин, рисперидон, проявляют высокую степень сродства (аффинитета) к рецепторам D₁, D₂ и 5-НТ₂ подтипов [6,14]. В качестве лиганда, способного связываться с обоими подтипами рецепторов, используется меченый спироперидол (спиперон). Высокой избирательностью в отношении 5-НТ₂ подтипа рецепторов обладает кетансерин, являющийся, как и спироперидол, антагонистом (блокатором) этих рецепторов и широко используемый в качестве радиолиганда при скрининге соединений с нейролептической активностью. Важное значение для характеристики рецепторного профиля новых нейролептиков имеет определение степени их сродства к альфа-адренорецепторам ЦНС. Из числа наиболее распространенных антипсихотических препаратов аминазин, галоперидол и клозапин обладают способностью связываться с этими рецепторами наряду с высоким аффинитетом к рецепторам D₂ и 5-НТ₂ типа.

В последнее время большой интерес привлекают к себе два других подтипа дофаминовых рецепторов — D₃ и D₄, относящиеся к D₂-подобным. Способностью связываться с этими рецепторами обладают атипичные нейролептики, в частности клозапин. Принято считать, что наибольшую прогностическую значимость в плане предсказания нейролептической активности новых химических соединений имеет их сродство к дофаминовым рецепторам D₂ подтипа, наиболее широко представленным в областях мозга, где локализованы окончания дофаминергических нейронов (стриатум, прилежащее ядро, префронтальная, цингулярная, фронтальная кора, обонятельный бугорок).

Для большинства нейролептиков установлена высокая степень корреляции между характеристиками связывания вещества с D₂ рецептором, с одной стороны, и средней терапевтической дозой, обеспечивающей антипсихотический эффект в клинике, — с другой. Поскольку избирательные лиганды D₁ подтипа дофаминовых рецепторов не прошли антипсихотической активности в клинике, для практических целей скрининга можно считать достаточным определение количественных характеристик сродства (обычно это IC₅₀, т.е. концентрация вещества, при которой имеет место 50% вытеснение ³H-спироперидола) данного соединения к D₂ дофаминовому рецептору. Перспективными принято считать соединения, проявляющие сродство к D₂, 5-НТ₂ и альфа-адренорецепторам в нанограммовом диапазоне концентраций (IC₅₀, в пределах 10⁸ М) [8, 9]. При наличии активности этого уровня целесообразно провести более широкое изучение рецепторного профиля вещества, включая определение IC₅₀ по связыванию с 5-НТ₁, 5-НТ₃ серотониновыми рецепторами [12], бета-адренорецепторами, мускариновыми холинорецепторами, D₁, D₃, D₄-подтипами дофаминовых рецепторов, гистаминовыми рецепторами, сигма-сайтом NMDA-рецепторного комплекса, ГАМК-рецептором, транспортными белками, обеспечивающими обратный захват дофамина и других нейротрансмиттеров. Эти исследования позволяют получить достаточно полный «нейрорецепторный профиль» соединения.

2.2. Методика радиолигандного связывания

В настоящее время методы радиолигандного связывания, используемые для характеристики способности нового соединения связываться с тем или другим рецептором (подтипом рецептора), являются наиболее важными в скрининге нейролептиков. Метод радиолигандного связывания позволяет непосредственно качественно и количественно

но оценить взаимодействие вещества с рецепторами, изучить связь между структурой и действием и провести сравнительную оценку соединений по силе взаимодействия с рецептором. По сравнению с поведенческими методами скрининга и биохимическими методами, методы радиолигандного связывания просты в техническом отношении и не требуют больших количеств животных, реактивов и исследуемых веществ, что особенно важно при работе с большим числом соединений.

В качестве радиолиганда дофаминовых рецепторов используется ^3H -спиперон с удельной активностью 15–40 Ки/ммоль. ^3H -спиперон метит также 5-НТ2 серотониновые рецепторы, поэтому его с успехом можно применять для оценки взаимодействия веществ с 5-НТ2 рецепторами. Рекомендуется изучить влияние веществ на связывание с препаратами мембран, полученными из различных структур мозга (стриатума, лимбической системы и фронтальной коры). В стриатуме и структурах лимбической системы ^3H -спиперон связывается, главным образом, с дофаминовыми (D2), во фронтальной коре — с серотониновыми (5-НТ2) рецепторами [14].

Исзуемые структуры выделяют из мозга 3–4 крыс, взвешивают и гомогенизируют в ледяном 50 мМ Трис-НСl буфере (рН = 7,5; t = 20 °С) в стеклянном гомогенизаторе с тефлоновым пестиком (900–1000 об/мин, 7–10 пассажей). Гомогенат центрифугируют 30 000 g 20 мин при 0–4 °С, осадок ресуспендируют в 5 мМ трис-буфере, содержащем 120 мМ NaCl, 2,5 мМ CaCl, 6 мМ KCl и 1 мМ MgCl (рН = 7,1 при t = 37 °С).

Суспензию мембран (0,1 мг белка/мл) инкубируют с ^3H -спироперидолом (0,1–0,25 нМ) в отсутствие и присутствии различных концентраций исследуемых веществ (0,1–10 мкМ) при 25 °С 30 мин или 37 °С 10–15 мин и связанный спиперон выделяют фильтрованием на стекловолоконных фильтрах типа GF/B («Whatman»). Радиоактивность, оставшуюся на фильтрах, подсчитывают методом жидкостного сцинтилляционного счета. Рассчитываются концентрации веществ, угнетающие связывание ^3H -спиперона на 50% (1Сд). Большинство известных нейролептиков угнетают связывание ^3H -спиперона в наномикромолярном диапазоне концентраций. Поскольку как агонисты, так и антагонисты дофаминовых рецепторов вытесняют ^3H -спиперон из мест связывания, то для их разграничения рассчитывают коэффициент Хилла. Для большинства антагонистов он близок к 1, а для антагонистов — значительно ниже 1. У известных нейролептиков способность вытеснять ^3H -спиперон обнаруживает достаточно высокую степень корреляции с их антипсихотическим действием и выраженностью экстрапирамидных расстройств.

Аналогично проводится исследование связывания ^3H -спиперона с серотониновыми рецепторами фронтальной коры [8]. Если изучаемое вещество в наномолярных концентрациях вытесняет радиолиганд из мест связывания, идентифицированных как серотониновые рецепторы, это указывает на наличие серотониноблокирующего действия. Для определения аффинитета исследуемого соединения к другим рецепторам используются соответствующие радиолиганды.

3. Биохимические методы, используемые для углубленного анализа действия нейролептиков на моноаминергические системы

3.1. Влияние на содержание катехоламинов, серотонина и их метаболитов структурах мозга крыс

Наиболее чувствительным, точным и общепринятым является в настоящее время метод высокoeffективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ/ЭД) (10). Для определения содержания моноаминов в структурах мозга рекомендуется использовать ВЭЖХ/ЭД в обращенных фазах с ионпарным реагентом октилсульфатом натрия. Маточные растворы моноаминов и внутреннего стандарта 3,4-диоксибензиламина (ДОБА) с концентрацией 0,5 мкмоль/мл готовятся 2 раза в месяц 0,1 Н HClO₄ с добавлением 1% метабисульфата натрия. Рабочие стандарты (0,5 нмоль/мл), необходимые для калибровки прибора, готовятся ежедневно.

Вещество с предполагаемой нейролептической активностью вводится внутривентриально или перорально за 60 мин до декапитации крыс. Структуры мозга (стриатум, прилежащее ядро перегородки, гипоталамус и др.) выделяют на холоде, замораживают в жидком азоте и взвешивают. При анализе моноаминов навеску ткани гомогенизируют в 20 объемах 0,1 н HClO_4 , с добавлением ДОФА (0,5 нмоль/мл). Затем образцы центрифугируют при 15 000 g в течение 5 мин. Для определения катехоламинов, серотонина (5-ОТ), 5-оксииндолуксусной кислоты (5-ОИУК), 3,4-диоксифенилуксусной кислоты (ДОФУК) и гомованилиновой кислоты (ГВК) 20 мкл чистого надосадка наносят на колонку путем прямой инъекции. Разделение изучаемых веществ проводят на хроматографе типа LC-304 T (BAS), снабженном инжектором 7125 Reodyne 20 мкл петлей для нанесения образцов. Используют колонку Biophase RP-18 октадецилсилановую 4,6 250 мм, защищенную предколонкой RP-18 4,6 мм 30 мм, 20 мкм колонку термостатируют при 45°C. В качестве детектора используют амперометрический детектор LC-4B со стеклогуглеродным электродом TL-5. Потенциал, приложенный к рабочим электродам, составляет +850 мВ против Ag/AgCl электрода сравнения RE-3. Скорость потока – 1 мл/мин. Для определения катехоламинов, серотонина, 5-ОИУК, ДОФУК и ГВК используют следующую подвижную фазу. Маточные растворы 0,02 М лимонной кислоты и 0,02 М NaH_2PO_4 , буфера, содержащего 0,269 мМ ЭДТА, смешиваются в пропорции 2,45:1. Затем добавляется 0,3 мМ ОСН и 10% ацетонитрила, pH = 3,0 устанавливается добавлением фосфорной кислоты. Подвижную фазу фильтруют, применяя вакуумный насос, через целлюлозные фильтры (0,2 мкм) типа «Миллипор» или «Владипор».

Известные нейролептики вызывают повышение содержания метаболитов ГВК и ДОФУК, что свидетельствует об увеличении скорости метаболического оборота дофамина. Последнее может рассматриваться как компенсаторная реакция, развивающаяся в ответ на блокаду дофаминовых рецепторов нейролептиками.

По этому тесту типичные нейролептики более активны, чем атипичные. Определение содержания аминов и их метаболитов в различных структурах мозга позволяет выявить структурную избирательность действия веществ. Используют, как правило, стриятум, прилежащее ядро перегородки, фронтальную кору мозга.

Для более детальной характеристики взаимодействия новых соединений с нейротрансмиттерными системами мозга рекомендуется использовать методику определения скорости метаболического оборота моноаминов с применением ингибитора декарбоксилазы L-ароматического аминокислот (соединение NSD-1015), а также технику внутримозгового микродиализа, позволяющую оценить влияние вещества на пресинаптическую регуляцию биосинтеза и высвобождения нейротрансмиттера (дофамина, серотонина). Последние методы могут рассматриваться как дополнительные.

3.2. Метод внутримозгового микродиализа у свободноподвижных животных

Методика внутримозгового микродиализа у свободноподвижных животных может использоваться для определения внеклеточного содержания моноаминов мозга в дорзальном и вентральном стриатуме (прилежащее ядро) в условиях *in vivo*. Известно, что соединения с нейролептической активностью повышают внеклеточное содержание метаболитов ДА – ДОФУК и ГВК. В исследовании используются концентрические микродиализатные зонды СМА12 (СМА/Microdialysis AB, Швеция).

Крыс наркотизируют хлоралгидратом (400 мг/кг, в/б) и фиксируют в стереотаксисе. Затем, в прилежащее ядро имплантируют направляющие канюли для микродиализных зондов СМА12 с проницаемостью 20000 ДА (СМА Microdialysis) по координатам AP + 1,7 мм; L – 2,6 мм; DV – 8,2 мм [11], под углом 10 градусов к сагиттальной плоскости и фиксируют их к костям черепа. Через 48 ч после операции зонды помещают в направляющую канюлю и в течение двух часов производят перфузию искусственной цереброспинальной жидкостью со скоростью 2 мкл/мин [3]. Сбор диализатов происходит

каждые 20 мин. В течение первых 60 мин собирают 3 базальных образца, затем животным внутривенно вводят изучаемое соединение. После этого собирают еще 5–8 диализных проб. Содержание моноаминов и их метаболитов в диализатах определяют методом ВЭЖХ с электрохимической детекцией [10].

3.3. Модель прерывания импульсной активности нейронов (гаммабутиролактоновая модель)

Одним из наиболее информативных подходов к характеристике фармакологических свойств соединений с нейролептической активностью может быть изучение способности веществ устранять эффект агонистов ДА рецепторов, подавляющих синтез дофамина, на модели прерывания импульсной активности нейронов (гамма-бутиролактоновая модель). Введение гамма-бутиролактона (ГБЛ) в дозе 750 мг/кг, в/б, позволяет блокировать импульсную активность ДА нейронов [2]. При этом нарушается регуляция синтеза дофамина, которая осуществляется ДА нейронами черной субстанции и постсинаптическими рецепторами в стриатуме. В условиях пониженного уровня ДА в межсинаптической щели происходит снижение ингибирующего влияния Д2 ауторецепторов на тирозингидроксилазу (ТГ) — фермента, лимитирующего скорость синтеза ДА. Нейролептики, конкурируя с агонистами ДА рецепторов за места связывания пресинаптических рецепторов ДА, повышают активность ТГ и, следовательно, скорость синтеза ДА. Применение ингибитора декарбоксилазы ароматических аминокислот — NSD-1015 в гаммабутиролактоновой модели позволяет оценить влияние исследуемого вещества на способность ТГ синтезировать предшественник ДА — диоксифенилаланин (ДОФА), который в нормальных условиях практически не определяется. Для определения содержания ДОФА и моноаминов в структурах мозга рекомендуется использовать ВЭЖХ/ЭД, описанный выше (раздел 3.1).

3.4. Изучение влияния на уровень секреции пролактина

Секреция пролактина регулируется дофаминергическими волокнами тубероинфундибулярного тракта, берущего начало в области аркуатного и перивентрикулярного ядер гипоталамуса. Дофаминовые рецепторы преимущественно Д2 подтипа локализованы на секреторных клетках переднего гипофиза, где они выполняют функцию ингибиторного контроля секреции пролактина. Нейролептики при введении людям или экспериментальным животным, блокируя Д2 дофаминовые рецепторы, вызывают усиление секреции пролактина, что может быть причиной таких нежелательных побочных эффектов, как галакторея, аменорея, бесплодие, гиперплазия молочной железы.

Нейролептики нового поколения, благодаря своему низкому сродству к Д2 рецепторам тубероинфундибулярной системы, как правило, не вызывают пролактинемии.

Для оценки возможного влияния нового соединения с предполагаемой нейролептической активностью на дофаминергическую передачу в тубероинфундибулярной системе крысам вводят вещество в терапевтической дозе однократно или в течение 2 нед., определяя уровень пролактина в плазме крови радиоиммунологическим методом.

Заключение

Применение широкого набора тестов поведенческого, радиолигандного и биохимического анализа позволяет с достаточно высокой степенью вероятности выявить соединения, обладающие антипсихотическим эффектом, и предсказать особенности их действия в клинических условиях.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Бондаренко Н.А. Избирательный эффект нейролептиков на нарушение дофамин-зависимого поведения у крыс в тесте экстрополяционного извращения // Бюлл. эксп. биол. и мед. 1990, №11. — С. 506–508.
2. Давыдова А.И., Клодт П.М., Кудрин В.С., Кузнецова Е.А., Наркевич В.Б. Нейрохимическое изучение эффектов афобазола и ладастена на синтез и метаболизм моноаминов и их метаболитов в структурах мозга крыс Вистар в условиях введения ингибитора декарбоксилазы ароматических кислот NSD-1015 // Экспер. и клинич. фармакол., 2010. — Т. 73. — №3. — С. 38–42.
3. Benveniste H., Hüttemeier P.C. Microdialysis —theory and application. Prog Neurobiol., 1990. — V. 35. — P. 195–215.
4. Brodie B.B., Shore P.A., Silver S.L. Potentiating action of chlorpromazine and reserpine. Nature, 1955. — V. 175. — P. 1133–1134.
5. Costall B., Naylor R.J. On catalepsy and catatonia and the predictability of the catalepsy test for neuroleptic activity. Psychopharmacol (Berl.), 1974. — V. 34. — P. 233–241.
6. Faedda G., Kula N., Baldessarini R.J. Pharmacology of binding 3H-SCH-23390 to D-1 dopaminergic receptor sites in rat striatal tissue. Biochem. Pharmacol., 1989. — V. 38. — P. 473–480.
7. Geyer MA, Krebs-Thomson K, Braff DL, Swerdlow NR. Pharmacological studies of prepulse inhibition models of sensorimotor gating deficits in schizophrenia: a decade in review. Psychopharmacology (Berl), 2001. — V. 156. — P. 117–154.
8. Leysen J.E., Niemegeers J.E., Van Nueten J.M., Laduron P.M. [3H] Ketanserin (R 41 4680, a selective 3H- ligand for serotonin2 binding sites: binding properties, brain distribution, and functional role. Mol.Pharmacol., 1982. — V. 21. — P. 301–314.
9. Millan M.J., Dekeyne A., Rivet J.-M., Dubuffet T., Lavielle G., Brocco H. S33084, a Novel, Potent, Selective, and Competitive Antagonist at Dopamine D3-Receptors: II. Functional and Behavioral Profile Compared with GR218,231 and L741,626. JPET, 2000. — V. 293. — № 3. — P. 1063–1073.
10. Morpurgo C. Effects of antiparkinsonian drugs on a phenothiazine-induced catatonic reaction. Arch. Int. Pharmacodyn., 1962. — V. 137 (1–2). — P. 92–96.
11. Paxinos G., Watson C., The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates, 5th ed., Elsevier Academic Press Amsterdam, Boston, 2005.
12. Rydelek-Fitzgerald L., M. Teitler, Fletcher P.W., Ismaiel A.M., Glennon R.A. NAN-190: agonist and antagonist interactions with brain 5-HT1A receptors. Brain Res, 1990. — V. 532. — P. 191–196.
13. Swerdlow N.R., Geyer M.A. Clozapine and haloperidol in an animal model of sensorimotor gating deficits in schizophrenia. Pharmacol. Biochem. Behav., 1993. — V. 44. — P.741–744.
14. Sun W., Ginovart N., Ko F., Seeman P., Kapur S. *In vivo* Evidence for Dopamine-Mediated Internalization of D2-Receptors after Amphetamine: Differential Findings with [3H]Raclopride versus [3H]Spiperone. Mol. Pharmacol., 2003. — V. 63. — P. 456–462.
15. Vasse M., Protais P., Costentin J., Schwartz J.-C. Unexpected potentiation by discriminant benzamide derivatives of stereotyped behaviors elicited by dopamine agonists in mice. Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 1985. — V. 329. — P.108–116.
16. Vogel H.G. Drug discovery and evaluation: pharmacological assays. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2008. — P. 715–774.

ГЛАВА 16

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ТРАНКВИЛИЗИРУЮЩЕГО (АНКСИОЛИТИЧЕСКОГО) ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. Т.А. Воронина; академик РАМН С.Б. Середенин;
к. б. н. М.А. Яркова; к. б. н. М.В. Воронин*

Введение

Анксиолитические (син. транквилизирующие, антитревожные, антифобические, атарактические, психорелаксирующие) средства представляют группу психотропных веществ, применяемых для лечения различных невротических, неврозоподобных, психопатических и психопатоподобных состояний, сопровождающихся тревогой, страхом, беспокойством, повышенной раздражительностью, эмоциональной лабильностью, бессонницей, возбуждением, напряженностью. Анксиолитики эффективны при эмоциональном стрессе, фобиях, навязчивостях, ипохондрических синдромах, неглубоких депрессивных состояниях, психогенных психозах, панических состояниях. Больными с хроническим течением заболевания анксиолитики часто употребляются постоянно и являются жизненно необходимыми препаратами. Препараты этой группы применяются также как снотворные и противосудорожные средства, используются для купирования алкогольной и наркоманической абстиненции и в период ремиссии больных хроническим алкоголизмом, назначаются для премедикации при подготовке к хирургическим операциям и т.д. Анксиолитики применяются и в амбулаторной практике при стрессе, различных экстремальных ситуациях и здоровыми людьми, деятельность которых связана с работой в чрезвычайных и осложненных условиях.

Термин «транквилизатор» появился в 1957 году и произошел от латинского «tranquillo-are» — успокаивать, делать безмятежным, и успокаивающие средства подразделились на большие транквилизаторы, которые потом составили группу антипсихотических средств (нейролептиков), и малые транквилизаторы, которые образовали группу анксиолитиков (anxiety — тревога).

К настоящему времени группа анксиолитиков включает более 100 препаратов, которые относятся к различным классам химических соединений и отличаются по механизму действия. Наиболее известными анксиолитическими средствами, применяемыми в клинике уже почти 40 лет, являются препараты бензодиазепинового ряда (диазепам, феназепам, хлордиазепоксид, оксазепам, лоразепам, гидазепам, медазепам и др.). Спектр их фармакологической активности, кроме специфического анксиолитического эффекта, включает другие проявления действия: противосудорожное, седативное, амнезирующее, миорелаксантное, что не является желательным при лечении невротических состояний. Кроме того, при длительном применении бензодиазепинов возможно возникновение лекарственной зависимости.

В последние годы появились анксиолитики нового типа, с большей избирательностью собственно анксиолитического эффекта и меньшими побочными эффектами. В противоположность классическим бензодиазепинам, являющимся прямыми агонистами бензодиазепиновых рецепторов, новые вещества обладают тропностью к определенным подтипам бензодиазепиновых, ГАМК рецепторов, имеют свойства агонистов-

антагонистов, частичных агонистов этих рецепторов, оказывают модулирующее влияние на ГАМК-бензодиазепиновый рецепторный комплекс (мексидол, афобазол). В лечебную практику внедряются препараты с серотонинергическим механизмом действия: агонисты серотонин-1А и дофаминовых рецепторов (буспирон, гепирон, ипсаперон и др.), антагонисты серотонин-2 рецепторов (ритансерин, пиренпирон, ципрогептадин и др.) и серотонин-3 рецепторов (ондансетрон, закоприд и др.) и ингибиторы обратного захвата серотонина (флуоксетин, венлафаксин и др.). Избирательным анксиолитическим эффектом обладают лиганды сигма-1 рецепторов (афобазол). Поиск новых анксиолитиков ведется среди веществ, влияющих на аденозиновую, интерфероновую, опиоидную, нейропептидную системы. Исследуются: антагонисты кортиколиберина, холецистокинина, нейрокининовых рецепторов 2-го, 3-го и особенно 1-го типа, соматостатиновых рецепторов 3-го и 1-го типа, агонисты нейропептида Y и др.

Классическая методология изучения анксиолитических средств сложилась на основе изучения фармакологических свойств широко известных препаратов бензодиазепинового ряда. Однако появление анксиолитиков нового типа с различным и поликомпонентным механизмом действия требует и новых методических подходов к их изучению, расширения, уточнения и изменения традиционной программы исследования.

В настоящих рекомендациях представлен унифицированный методический подход к изысканию и изучению веществ с различным механизмом действия, обладающих анксиолитической (транквилизирующей) активностью и предлагаемых для клинического изучения.

1. Методы изучения специфической анксиолитической активности

В связи с многообразием методов, используемых для изучения анксиолитической активности, представляется целесообразным выделить основные, базисные методы исследования, которые дают наиболее полную информацию и являются общепринятыми в России и за рубежом и таким образом являются наиболее желательными при изучении нового препарата, и дополнительные методы, расширяющие представления о специфической анксиолитической активности.

1.1. Исследования, доказывающие наличие анксиолитической активности по базисным поведенческим тестам

Исследования, проводимые с использованием методов, представленных в данном разделе, являются определяющими для препарата и поэтому должны быть выполнены с соблюдением следующих требований.

По каждому тесту следует использовать вещество не менее чем в 3-х дозах, рассчитанных в соответствии с LD_{50} соединения (не более $1/10$ от LD_{50}).

Должен быть использован такой способ введения вещества, который соответствует предполагаемому клиническому способу применения препарата.

По меньшей мере по одному из основных тестов должна быть изучена кривая зависимости доза–эффект в возможно более широком диапазоне доз и определена продолжительность анксиолитического эффекта при использовании того пути введения, который соответствует предполагаемому клиническому применению.

Исследование анксиолитической активности должно быть обязательно проведено в сравнение с наиболее известными эталонными препаратами.

В связи с разнообразием вариантов используемых методик каждый используемый метод должен быть подробно описан в соответствующем разделе перед изложением результатов.

При проведении исследований следует использовать не менее трех методов, которые основаны на наказуемом поведении (тест конфликтной ситуации по Vogel) и на ненаказуемом поведении (методика приподнятого крестообразного лабиринта), и третий тест по выбору.

1.1.1. Методика конфликтной ситуации по Vogel

Методика конфликтной ситуации по Vogel, основанная на создании у животных состояния беспокойства, тревоги и страха с использованием наказующего раздражителя, подавляющего проявления условного или безусловного поведения, используется для оценки анксиолитиков уже почти 40 лет, является наиболее широко применяемой методикой при оценке транквилизаторов с момента их появления и обязательно используется при оценке анксиолитиков нового поколения. Данная методика позволяет оценить анксиолитические/анксиогенные эффекты веществ разного химического строения и механизма действия. На этой модели выявляются анксиолитические эффекты транквилизаторов первого поколения (этанол, барбитураты, мепробамат, триоксазин), препаратов, реализующих свое действие через системы ГАМК и возбуждающих аминокислот, адreno-серотонин-, дофаминергические, опиоидные системы, а также анксиолитические/анксиогенные эффекты гормонов, нейропептидов, нейротрофинов [1, 2, 11, 22, 32, 38].

Наиболее известной и широко применяемой методикой конфликтной ситуации является модель в варианте Vogel [42], создаваемая у грызунов путем подавления болевым электрическим раздражителем питьевого рефлекса при потреблении ими воды (пищи) из чашки или трубки-поилки и основанная таким образом на столкновении двух мотиваций — питьевой и оборонительной (страха наказания при попытке удовлетворения питьевой потребности) [1, 2, 8, 10, 32]. Классическая методика конфликтной ситуации по Vogel воспроизводится на крысах. Однако в последние годы методика конфликтной ситуации по Vogel модифицирована для мышей различных видов и также используется для оценки новых анксиолитиков [13].

Принцип методики конфликтной ситуации состоит в том, что наказующий фактор подавляет привычное для животного поведение, в результате чего создается ситуация невозможности осуществления необходимой мотивации, рассогласование желаемого и действительности, что подкрепляется страхом получения болевого раздражения. Эффект анксиолитиков заключается в преодолении страха перед наказующим фактором и в восстановлении значимого для животного поведения, что выражается в увеличении числа наказуемых ответов, в данном случае взятий воды, несмотря на получение при этом болевых раздражений. Методика имеет хорошую воспроизводимость, четкие контроли и высокую степень корреляции с клиническими эффектами.

Одним из вариантов методики [8] является следующая. Предварительно крыс лишают воды на 48 ч, не ограничивая пищу, и затем вырабатывают навык взятия воды из поилки, помещая крысу в камеру, где она находит поилку с водой и начинает пить. Камера имеет размер 275×275×450 мм, электродный пол и поилку с водой (сосуд с соском на стене), расположенную на высоте 5 см от пола. На следующий день крысу помещают в камеру на 10 мин и через 10 с после начала питья каждое взятие воды наказывается электроболевым раздражением (от 0,2 до 1 мА). В результате, чтобы удовлетворить питьевую мотивацию, крыса должна преодолеть чувство страха перед наказанием. Число наказуемых взятий воды за 10 мин нахождения в камере является мерой анксиогенного состояния. Анксиолитики устраняют чувство тревоги и страха и увеличивают число наказуемых взятий воды.

1.1.2. Методика приподнятого крестообразного лабиринта

Методика основана на навыке предпочтения грызунами темных нор, естественного страха нахождения на открытых площадках и падения с высоты. Описание и оценка метода наиболее подробно представлены в работах [21, 41, 29, 35, 36].

Одним из вариантов приподнятого крестообразного лабиринта (ПКЛ) является установка, которая состоит из крестообразно расходящихся от центральной площадки под прямым углом 4-х рукавов: два противоположных, открытых, без стенок, и два закрытых, темных. Центральная площадка и пол открытых рукавов, как правило, прозрачны, тог-

да как пол и стенки закрытых рукавов покрашены в темный цвет. Эксперименты проводятся как при обычном освещении, так и при дополнительном освещении открытых рукавов. Наиболее часто используемые размеры ПКЛ для крыс: рукава 10×10×50(60) см, центральная площадка 10×10×10 см, ПКЛ приподнят на 80–100 см; для мышей рукава составляют 5×5×20 (25) см, центральная площадка — 5×5×5 см, ПКЛ приподнят на 25(30) см. Непосредственно перед началом эксперимента животных выдерживают (от 3-х до 5-ти мин) в темных клетках. Затем животное помещают в ПКЛ на центральную площадку, головой к открытому рукаву и в течение определенного интервала времени (5 мин или 5+5 мин, или 3+3 мин, или поминутно 5 мин) регистрируют время пребывания животных в открытых, закрытых рукавах, а также на центральной площадке, количество заходов в открытые и закрытые рукава, латентный период первого захода в открытый рукав, число свешиваний с открытых рукавов.

Контрольные интактные животные предпочитают большую часть времени проводить в закрытых, темных рукавах. Анксиолитический эффект препарата оценивается по увеличению числа заходов в светлые рукава и времени нахождения в них, без увеличения общего числа заходов и по числу свешиваний с открытых рукавов. Время нахождения на центральной площадке позволяет оценить показатель принятия решения. По общему числу заходов в открытые и закрытые рукава и вертикальным стойкам можно оценить общую двигательную активность. Эмоциональность крыс оценивается также по числу мочеиспусканий и болюсов.

В некоторых исследованиях используется *приподнятый zero-лабиринт*, который представляет собой кольцевую приподнятую платформу с чередуемыми двумя открытыми и двумя закрытыми четвертями круга.

1.1.3. Поведение в открытом поле мышей с активным (линия C57Bl/6) и пассивным (линия Balb/C) типами эмоционально-стрессовой реакции

Известно, что в зависимости от индивидуальных, наследственных, конституционных характеристик эмоционально-стрессовое воздействие по-разному влияет на отдельных особей. У одних — стрессовый ответ сопровождается активацией деятельности и ее продуктивности, а у других эмоциональный стресс приводит к дезорганизации поведения или к пассивному отстранению от решения проблем. Генетическая гетерогенность популяции по эмоционально-стрессовой реакции и зависимость эффекта транквилизаторов от характера поведения выявляется и в эксперименте, особенно отчетливо в условиях методики открытого поля.

Методика открытого поля в традиционном варианте, как известно, широко используется в психофармакологии для изучения влияния веществ на ориентировочно-исследовательское поведение, двигательную активность и для выявления анксиолитического действия. Однако без учета характера эмоционально-стрессовой реакции животных в условиях этой модели анксиолитическое действие не выявляется отчетливо. В противоположность этому оценка транквилизаторов с использованием фармакогенетического подхода с анализом фенотипических особенностей позволяет не только выявить специфический анксиолитический эффект, но и дифференцировать его от других проявлений действия [9, 10, 30]. Особенно продуктивен этот подход для выявления и оценки селективных анксиолитиков [39, 40].

Методика освещенного открытого поля представляет собой квадрат или круг со стенками и прозрачной крышкой. Вариантом методики для мышей может служить камера, размером 40×40×20 см с прозрачной крышкой. Пол камеры равномерно разделен линиями на 9 квадратов с 16 отверстиями диаметром 2 см. Предварительно мышей инбредных линий C57Bl/6 и Balb/C перед экспериментом в течение 3-х мин выдерживают в темноте, после чего помещают на один из периферийных квадратов открытого поля. Наблюдение за животным производится в течение 3–5 мин, как правило, с поминутной регистрацией. Фиксируется число пересеченных квадратов на периферии и в центре (отдельно), число

вертикальных стоек, число заглядываний в отверстия, количество болюсов и мочеиспусканий. У мышей линии C57Bl/6 обмечается активный тип реакции на эмоционально-стрессовое воздействие, а у мышей линии Balb/C — наоборот, пассивный тип поведения.

Анксиолитики оказывают отчетливый анксиолитический эффект у животных с пассивным типом поведения, выражающийся в устранении состояния застывания (freezing), страха, испуга и в активации поведения. В противоположность этому у мышей с активным типом поведения транквилизаторы вызывают седативный эффект. Высокую прогностическую значимость данная модель имеет не только при оценке классических транквилизаторов бензодиазепинового ряда, но и при изучении транквилизаторов нового поколения, атипичных препаратов с расщеплением анксиолитического и седативного эффектов и избирательных, селективных анксиолитиков.

1.1.4. Методика четырех пластин

Метод 4-х пластин основан на подавлении ориентировочно-исследовательского поведения грызунов электроболевым раздражителем [14, 20]. Крысу (мышь) помещают на одну из четырех пластин, составляющих пол камеры, и после ознакомления с обстановкой (15–30 сек), при переходе животного с пластины на пластину, оно получает болевое раздражение, подаваемое через пол, в результате чего повышается уровень тревожности и уменьшается число переходов. Эффект анксиолитиков заключается в уменьшении страха получения болевого наказания и в увеличении числа переходов по пластинам.

1.1.5. Методика оценки поведения в темной/светлой камере

Методика светлой/темной камеры использует естественное стремление грызунов избегать ярко освещенных мест и по идеологии близка к методике приподнятого крестообразного лабиринта [16]. Животных помещают в ярко освещенный отсек двухкамерной светлой/темной установки и за определенный период времени (3–5 мин) регистрируют число переходов между светлым и темным отсеками, длительность пребывания в светлом и темном отсеках. Анксиолитики увеличивают число переходов из одного отсека в другой и время нахождения в светлом отсеке.

1.1.6. Методика условного защитного закапывания

Методика условного защитного закапывания у грызунов относится к филогенетическим моделям анксиогенеза, где также присутствует наказующий фактор [17, 37]. Сначала крыса (мышь) получают болевое раздражение через определенный предмет, например стержень, вмонтированный в пол или стену. При повторных посадках в камеру животные предпринимают попытки закапывания наказующего предмета элементами подстилки, например, шариками, стружками, сгребаемыми лапами с пола камеры. Продолжительность закапывания оценивается как показатель тревожности. Анксиолитики обладают способностью уменьшать продолжительность этой реакции животного.

1.2. Дополнительные исследования по расширенному изучению анксиолитической активности

1.2.1. Методика конфликтной ситуации по Geller, Seifter

Методика Geller, Seifter основана на наказании болевым раздражением питьевого или пищевого рефлексов при оперантном поведении в камерах Скиннера, которые вырабатываются при подкреплении с помощью нажатия на рычаг или педаль (для грызунов) или «клевания» (для птиц) [24, 15, 28]. В отличие от классического условного рефлекса, когда реакция животного определяется вызывающим ее раздражением, выработка оперантного рефлекса характеризуется установлением временной последовательности между реакцией животного, проявляющейся время от времени в данной ситуации, и подкрепляющим раздражителем. При оперантном поведении подкрепление подается в раз-

личных режимах, либо периодически через фиксированные (FI) или переменные (VI) интервалы времени, либо с фиксированным (FR) или переменным (VR) отношением к числу условных реакций, и конфликтная ситуация осуществляется на этом фоне.

Конфликтная ситуация по Geller, Seifter хорошо формируется на основе камер Скиннера фирмы «Lafayette Instrument Co» (США) [5]. Сначала у крыс с питьевой депривацией осуществляют обучение в режиме FR4, когда животное получает подкрепление водой после 4-х нажатий на рычаг. Затем у этих же крыс вырабатывается оперантный рефлекс по VI30 расписанию, когда оперантный рефлекс осуществляется в варьирующем интервале 30 с, и после выработки этого рефлекса оба расписания совмещаются. Далее в период выполнения нажатий по расписанию FR4 вводится наказующий удар током. В результате крысы осуществляют оперантную деятельность по VI расписанию с высоким уровнем выполнения (около 180 нажатий за 3 мин), что позволяет оценить седативное или активирующее действия препарата, а по наказуемому расписанию FR4 работают с низкой частотой (около 5 нажатий за 3 мин), что позволяет оценить анксиолитическое действие препаратов, которые избирательно увеличивают оперантные ответы в FR фазе.

Результаты исследований по этому тесту стабильны и имеют высокую прогностическую значимость. Однако трудоемкость методики (для выработки рефлексов требуется месяцы), необходимость ежедневной тренировки животных, использование дорогостоящего оборудования ограничивает ее применение.

1.2.2. Методика внешнего торможения

Методика внешнего торможения условных рефлексов активного избегания в камере шаттл-бокс или питьевых рефлексов в лабиринте [1]. Принцип метода состоит в том, что у крыс сначала вырабатывается условный рефлекс, а затем в момент его выполнения включается сильный световой раздражитель, который выполняет роль внешнего торможения поведения, стрессировает животное и затрудняет выполнение условной реакции. Действие анксиолитиков заключается в устранении стрессорной ситуации и восстановлении условно-рефлекторной деятельности.

1.2.3. Методика социального обследования (контактирования) у крыс

Молодая крыса-самец — интродер (незванный, вторгающийся) — помещается к взрослой половозрелой крысе — резиденту, и фиксируется продолжительность активных социальных контактов (обнюхивание, облизывание, груминг, покусывание и т.д.) [23]. В этой ситуации наблюдается низкий уровень социального контакта интродера с резидентом. Введение крысе-интродеру анксиолитика увеличивает время, проводимое в социальных контактах с резидентом.

1.2.4. Методика изоляционного синдрома

Используют феномен нарушения поведения, возникающего у крыс (мышей) после длительной (4–12 недель) изоляции [31]. После изоляции одна группа животных становится агрессивной, а другая «починенной (тимидной)». Исследуется влияние транквилизаторов на поведение животных обоих типов, в особенности при контакте «изолированного» животного с подсаженным к нему в клетку животным, не проходившим изоляцию (интродером).

1.2.5. Методики агрессивного поведения

Наиболее известной и простой моделью является методика агрессивного поведения пары крыс (мышей), спровоцированного электроболевым раздражением через электродный пол [1]. Регистрируется число схваток между животными и порог их возникновения (по величине подаваемого на пол тока) агрессивной реакции. Агрессивное поведение создается также раздражением или удалением некоторых структур мозга, использованием межвидовой агрессивности, например, между кошкой и собакой, кошкой и мышью, или

естественной агрессивности некоторых видов диких животных. Большинство транквилизаторов обладают способностью уменьшать проявления агрессивного поведения животных.

1.2.6. Неизбегаемое электроболевое раздражение лап животных или иммобилизация путем фиксации лап или тела

Стрессорная ситуация, вызываемая неизбежным электроболевым раздражением лап животных [25] или иммобилизацией путем фиксации лап или тела мелких лабораторных животных [33], оказывает сильное воздействие на животное, вызывая нередко необратимые изменения. Под влиянием транквилизаторов наблюдается улучшение в состоянии животных.

1.2.7. Стресс по Жуже

Стресс по Жуже осуществляется путем помещения крыс на малые площадки в бассейне с водой на 24 ч, что создает условия гиподинамии, изоляции и депривации парадоксальной фазы сна. В стрессорной ситуации наряду с нарушением нейромедиаторного баланса наблюдаются стойкое денатурационное изменение белков мембранных структур, усиление процессов перекисного окисления липидов. Нарушение поведения крыс выражается в повышении уровня тревожности и эмоциональности, изменении ориентировочно-исследовательского и целенаправленного поведения, ухудшении процессов обучения [3]. Транквилизаторы, особенно атипичные, устраняют различные проявления нарушений, возникающих при этом виде стресса.

1.2.8. Методика обратимого функционального нарушения ЦНС (сбой рефлекса избегания)

Методика обратимого функционального нарушения ЦНС (сбой рефлекса избегания) построена на основе нарушения однозначности причинно-следственных отношений между раздражителями, реакцией и ее следствиями применительно к челночной камере. При этом нарушается однозначность отношений как между условным и безусловным раздражителями, так и между реакцией и ее следствием, что вызывается включением звука после выключения тока и тем, что реакция животного уже не приводит к обычному выключению тока. В результате возникает прагматическая неопределенность ситуации, срыв высшей нервной деятельности, что выражается в эмоциональной напряженности, появлении состояния тревоги и страха [7]. Транквилизаторы устраняют проявления сбоя рефлекса избегания.

1.2.9. Методика пространственной переделки рефлекса избегания в челночной камере

У крыс с уже сформированной реакцией избегания меняют место нахождения отверстия для перехода в другой отсек челночной камеры, что приводит к нарушению выполнения выработанного навыка, уменьшению числа реакций избегания и увеличению числа межсигнальных реакций [7]. Транквилизаторы уменьшают число межсигнальных реакций в этой ситуации.

1.2.10. Условная эмоциональная реакция в камере Скиннера

Предварительно у крыс вырабатывается оперантный рефлекс в камере Скиннера с нажатием на рычаг. Затем животные получают неизбежное электроболевое раздражение через электродный пол, сочетаемое с условным сигналом. При повторной посадке животного в камеру включение только условного сигнала вызывает эмоциональную напряженность и уменьшение оперантных реакций. Транквилизаторы увеличивают число оперантных ответов, подавленных условным сигналом [38]. Условную эмоциональную реакцию у животных можно вызвать и в других камерах при сочетании звукового (светового) сигнала с болевым раздражителем.

1.2.11. Методика вкусового отвращения

Питье крысами приятных на вкус растворов (например, сахарина) подавляется, когда их потребление предварительно сочетается с веществами с резким, неприятным вкусом, например, лития хлоридом. Условное вкусовое отвращение к сахарину устраняется транквилизаторами [12].

1.2.12. Методика акустической стартл-реакции

Методика акустической стартл-реакции (стартл, вызванный страхом) основана на страхе животного, возникающем при действии внезапного резкого звукового раздражителя [18, 27]. Реакция страха у животного выражается в стартл-реакции, характеризующейся вздрагиванием и замиранием животного. Реакция замирания регистрируется по времени полного отсутствия движения животного, включая движение вибрисс. Продолжительность этой реакции определяет уровень анксиогенного состояния, которое редуцируется под влиянием транквилизатора. Часто в исследовании используют условный световой или звуковой сигналы, сопряженные с электрическим током — безусловным раздражителем, и в этих условиях действие одного условного сигнала вызывает стартл-реакцию.

1.2.13. Стресс у крысят

Стресс у крысят возраста 16–20 дней возникает при отнятии их от матери или из гнезда или при воздействии холодом и выражается в характерных звуках (ultrasonic 35–55 kHz), издаваемых крысятами. Транквилизаторы бензодиазепинового ряда и буспирон обладают способностью устранять стрессорную вокализацию крысят, что свидетельствует об их анксиолитическом эффекте [11].

1.2.14. Методика вызванной стрессом гипертермии у мышей

Мышей помещают в индивидуальные клетки, им вводится препарат и через час при помощи электротермометра с ректальным датчиком (погружение электрода на глубину 1,5–1,8 см) регистрируется ректальная температура (T1 — базовый показатель) и еще через 15 мин (через 75 мин после введения вещества) делается повторное измерение температуры (T2). Различие между T1 и T2 рассматривается как стресс-вызванная гипертермия (SIH) [34]. У контрольных мышей показатель SIH (T1–T2) колеблется от +0,7 до +1,0, а после введения бензодиазепина — от -0,1 до +0,1.

1.2.15. Методика паники у крыс, вызванная лактатом

Хроническое ингибирование синтеза ГАМК в дорзомедиальном гипоталамусе крыс посредством локального введения с помощью минипомпы ингибитора ГАМК L-аллилглицина и последующей инфузией лактата натрия вызывает у животных состояние хронического беспокойства и панические реакции, уменьшает время взаимодействия животных в тесте социального обследования.

Кроме того, для изучения действия веществ с анксиолитическим действием используется целый ряд других, реже встречаемых тестов: методика консуматорного поведения (усиленного потребления пищи), стимуляция околотовопроводного серого вещества, методика лекарственной дифференцировки и лекарственной дискриминации анксиолитических и анксиогенных веществ, различные виды стресса, вызванного холодом, гипертермией, и агрессивного/оборонительного поведения и др.

2. Сопутствующие анксиолитическому эффекту психотропные эффекты, побочное действие и острая токсичность

В дополнение к данным об основном анксиолитическом эффекте должны быть представлены результаты исследования других проявлений действия нового препарата и сведения об его острой токсичности. Ориентируясь на данных о спектре фармакологической

активности известных транквилизаторов, следует представить исследования о наличии или отсутствии у изучаемого вещества седативного или активирующего, противосудорожного, снотворного, антидепрессивного и миорелаксантного действия, исследовать его влияние на обучение и память.

Для выявления этих эффектов можно использовать общепринятые тесты. Для оценки седативного или активирующего действия можно применить регистрацию поведения в открытом поле и в различных актометрах, тест залезания на сетку; для предварительной оценки снотворного эффекта — тест потенцирования гексеналового сна или других снотворных; оценка противосудорожного действия осуществляется по антагонизму с судорожными веществами (коразол, тиосемикарбазид, бикукуллин и др.) и при судорогах, вызванных максимальным электрошоком; изучение влияния вещества на условнорефлекторную деятельность и процессы обучения и памяти осуществляется с использованием рефлексов активного и пассивного избегания, лабиринтных рефлексов, оперантного поведения (используется 2 теста); для исследования антидепрессивной активности можно использовать метод поведенческой беспомощности; для изучения миорелаксантного действия используются тесты вращающегося стержня, рефлекса подтягивания на перекладине, удерживания на перевернутой сетчатой платформе, тест бокового положения. Исследование дополнительных психотропных эффектов проводится в диапазоне терапевтических, оказывающих анксиолитический эффект доз.

Изучение побочных эффектов (седативный, миорелаксантный, негативное влияние на память и др.) следует осуществлять в широком диапазоне доз от минимальных терапевтических до субтоксических. Нужно использовать не менее двух видов животных и путь введения, соответствующий предполагаемому клиническому. Информация о побочных эффектах дополняется результатами, полученными в разделе «Изучение общей фармакологической активности».

Острая токсичность изучается на двух видах животных, на которых осуществлялось исследование анксиолитической активности, при тех же путях введения; рассчитывается LD_{50} . По соотношению доз, вызывающих специфический (анксиолитический) эффект, и доз, оказывающих побочный и токсический эффект, определяется широта терапевтического действия. Данные по побочным эффектам и токсичности нового препарата сопоставляются с данными, полученными для эталонных препаратов.

3. Изучение толерантности и возможной лекарственной зависимости при длительном применении анксиолитического препарата и его отмене

Изучается переносимость препарата и развитие толерантности по анксиолитическому и побочным проявлениям действия при длительном (не менее 28 дней) введении препарата.

В связи с риском возникновения лекарственной зависимости к новому анксиолитику обязательными являются исследования по изучению развития абстинентного синдрома при отмене препарата после его длительного применения. Методология и описание этих исследований приведены в работе [4]. Кроме того, желательно провести исследования с использованием модели самовведения препарата или других методик для выявления возможного наркогенного потенциала.

4. Исследование механизма действия анксиолитического препарата

Реализация действия анксиолитиков, как известно, может осуществляться через взаимодействие с различными мишенями, например, через системы тормозных и возбуждающих аминокислот, моноаминов, гормонов, нейропептидов, нейротрофинов и др. В связи с этим следует представить данные по изучению механизма действия изучаемого анксиолитика в зависимости от направленности его нейрохимических эффектов. Рекомендуется определить нейрорецепторный профиль изучаемого вещества, в том числе используя методы радиолигандного связывания, а также другие биохимические

методы, в том числе изучение сдвигов нейромедиаторного баланса, вторичных мессенджеров и т.д.

Желательно проведение электрофизиологического анализа механизма действия вещества с анксиолитическим эффектом, в частности, оценку спектра мощности в различных структурах мозга.

5. Изучение общей фармакологической активности анксиолитического препарата, влияния на сердечно-сосудистую систему и дыхание

Наблюдение за состоянием животного осуществляется на мышах и крысах при введении препарата в широком диапазоне доз от не оказывающих заметного влияния на общее состояние до вызывающих гибель. При этом определяется повышение или снижение возбудимости, увеличение или снижение двигательной активности, наличие тремора, судорожных подергиваний, судорог, гиперкинезов, изменение цвета кожных покровов, взъерошивание шерсти, каталепсия, птоз, стереотипия, груминг и т.д. Изучается пиннальный, болевой и роговичный рефлекс, влияние на температуру тела, на потребление воды и пищи. Следует изучить влияние препарата на эффекты нейромедиаторов. Например, на эффекты ареколина, треморина, 5-окситриптофана, фенамина, резерпина, дофамина, апоморфина, бикукуллина, флумазенила, дизоцилпина и других анализаторов нейромедиаторных систем.

Влияние на ССС, дыхание и на периферические отделы нервной системы изучается на интактных или наркотизированных кошках, кроликах или крысах по влиянию на уровень кровяного давления, ритм сердечной деятельности (желательно и других показателей работы сердца), дыхание, а также на реакции, вызванные введением нейромедиаторов, например, адреналина, норадреналина, ацетилхолина, серотонина.

Заключение

Результаты экспериментального изучения нового препарата с анксиолитическим (транквилизирующим) действием должны содержать материалы, доказывающие наличие у него специфической анксиолитической активности и отличия и преимущества нового препарата перед уже известными анксиолитиками. Например, новое вещество по сравнению с уже существующими должно обладать большей избирательностью специфического анксиолитического эффекта или иметь меньшие побочные эффекты и токсичность и большую терапевтическую широту, или новое вещество должно обладать уникальным сочетанием свойств и новым механизмом действия, или новое средство предлагается для лечения таких состояний, при которых существующие препараты малоэффективны и др.

Исследования следует проводить на различных видах лабораторных животных, например, мыши и крысы, а при необходимости можно использовать и более крупных животных (кошки, собаки, кролики). Полученные данные обрабатываются статистически с помощью современных методов статистики и представляются в виде таблиц, а при необходимости и рисунков.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Воронина Т.А., Фармакология феназепам. — В кн.: Феназепам / под ред. А.В. Богатского. — Киев: Наукова Думка, 1982. — С. 87–169.

2. Воронина Т.А., Спектр фармакологической активности гидазепама и его место среди известных транквилизаторов. — В кн.: «Гидазепам» (Андронати С.А., Воронина Т.А., Головенко Н.Я. — ред.). — Киев: Наукова Думка, 1992. — С. 63–75.
3. Воронина Т.А., Неробкова Л.Н., Маркина Н.В. и др. Возможные механизмы действия мембраноактивных веществ с антиоксидантными свойствами в экстремальных ситуациях. Сб. «Клеточные механизмы реализации фармакологического эффекта» (Середенин С.Б. — ред.). — М.: Институт Фармакологии АМН СССР, 1990. — С. 54–77.
4. Гарибова Т.Л., Калинина Т.С., Воронин К.Э. Проблема толерантности и лекарственной зависимости к гидазепаму. — В кн.: Гидазепам (Андронати С.А., Воронина Т.А., Головенко Н.Я. — ред.), Киев: Наукова Думка, 1992. — С. 83–91.
5. Гарибова Т.Л., Воронина Т.А., Стефанков Д.В., Калинина Т.С. Оценка действия фармакологических средств на основе новой компьютерной программы для анализа оперантного поведения животных // Фармакол. и токсикол., 1990. — Т. 53. — № 1. — С.67–70.
6. Иноземцев А.Н., Бокиева С.Б., Воронина Т.А., Тушмалова Н.А. Обратимое функциональное нарушение реакции избегания как модель для изучения влияния транквилизаторов. — Экспер. и клин. фармакол., 1996а. — Т. 59. — № 2. — С. 3–5.
7. Иноземцев А.Н., Воронина Т.А., Прагина Л.Л. и др. Различие в эффектах пирасетама и феназепама при эмоциональном напряжении, вызываемом пространственной переделкой навыка. — Экспер. и клин. фармакол., 1996б. — Т. 59. — № 6. — С. 101–103.
8. Молодавкин Г.М., Воронина Т.А. Многоканальная установка для поиска транквилизаторов и изучения механизма их действия по методу конфликтная ситуация. — Экспер. и клин. фармакол., 1995. — Т. 58. — № 2. — С. 54–56.
9. Середенин С.Б., Ведерников А.А. Влияние психотропных препаратов на поведение линейных мышей в условиях эмоционального стресса. — Бюлл. exper. биол. и мед., 1979. — Т. 88. — № 7. — С. 38–40.
10. Середенин С.Б., Бледнов Ю.А., Наговицина Ю.А. Анализ ионной регуляции специфического связывания диазепама в зависимости от фенотипа эмоциональной стрессовой реакции. — Бюлл. exper. биол. и мед., 1992. — Т. 114. — № 11. — С. 459–461.
11. Середенин С.Б., Виглинская И.В., Колик Л.Г. Исследование анксиолитического действия нового производного 2-меркаптобензамидазола у MR и MNRA крыс. — Экспер. и клин. фармакол., 1997. — Т. 60. — № 3. — С. 3–6.
12. Barrett J.E., Animal behavior models in the analysis and understanding of anxiolytic drugs acting at serotonin receptors., In: Animal Models in Psychopharmacology., Adv. Pharmacol. Sci., (Oliver B., Mos J., Slangen J.L., eds), Birkhauser Verlag Basel, 1991. — p. 37–52.
13. Belzung C., Griebel G., Measuring normal and pathological anxiety-like behaviour in mice: a review. Behav. Brain Res, 2001. — V. 125. — p. 141–149.
14. Boissier J.R., Simon P., Aron C., A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice., Europ. J. Pharmacol., 1968. — V. 4, p. 45–51.
15. Corbett R., Fielding S., Cornfeldt M., Dunn R., GABA-mimetic agents display anxiolytic-like effects in the social interaction and elevated plus maze procedures., Psychopharmacology, 1991. — V. 104, p. 312–316.
16. Costal B., Jones B.J., Kelly M.E., et al., Exploration of mice in a black and white test box: validation as a model of anxiety., Pharmacol. Biochem. Behav., 1989, v. 32, p. 777–785.
17. Czech D.A., Quock R.M., Nitrous oxide induced an anxiolytic-like effect in the conditioned defensive burying paradigm, which can be reversed with abenzodiazepine receptor blocker., Psychopharmacology, 1993, v. 113, № 2, p. 211–216.
18. Davis M., Redmond D.E., Baraban J.M., Noradrenergic agonists and antagonists: effects on conditioned fear as measured by the potentiated startle paradigm., Psychopharmacology, 1979, v. 9, p. 307–320.
19. Dawson G.R., Tricklebank M.D., Use of the elevated plus-maze in the search for novel anxiolytic agents., Trends in Pharmacol. Sci., 1995, v. 16, № 2, p.33–36.
20. Dooley D.J., Klamt I., Differential profile of the CCK-b receptor antagonist CI-988 and diazepam in the four-plate test., Psychopharmacology, 1993, v. 112, № 4, p. 452–454.
21. File S.E., The social interaction test of anxiety., Neurosci. Protocols, 1993, v.1, p. 1–7.
22. File S.E., Animal models of different anxiety states., In: GABAa receptors and anxiety: from neurobiology to treatment., №.Y. Raven Press, 1995, p. 93–113.
23. File S.T., Zangrossi H., Sanders F.L., Mabbutt P.S., Raised corticosterone in the rat after exposure to the elevated plus-maze., Psychopharmacology, 1993, v. 113, p. 543–546.

24. Geller I., Seifter J., The effects of meprobamate, barbiturates, d-amphetamine and promazine on experimentally induced conflict in the rat., *Psychopharmacologia*, 1960, v.1, p. 482–489.
25. Imaki T., Vale W., Clordiazepoxide attenuates stress-induced accumulation of corticotropin-releasing factor mRNA in the paraventricular nucleus., *Brain Res.*, 1993, v.623, p. 223–228.
26. Insel T.R., Winslow J.T., Rat pup ultrasonic vocalizations: an ethologically relevant behaviour responsive to anxiolytics., In: *Animal Models in Psychopharmacology*, Adv. Pharmacol. Sci., (Oliver B., Mos J., Slangen J.L., eds), Birkhauser Verlag Basel, 1991, p. 15–36.
27. Kellogg C.K., Sullivan A.T., Bitran D., Ison J.R., Modulation of noise-potentiated acoustic startle via the benzodiazepine-gamma-aminobutyric acid receptor complex., *Behavioral Neurosci.*, 1991, v.105, p. 640–646.
28. Koene P., Vossen J.M., Drug effects on speed of conflict resolution in the skinnerbox., In: *Animal Models in Psychopharmacology*, Adv. Pharmacol. Sci., (Oliver B., Mos J., Slangen J.L., eds), Birkhauser Verlag Basel, 1991, p. 53–58.
29. Lister R.G., The use of plus-maze to measure anxiety in the mouse., *Psychopharmacology*, 1987, v. 92, pp. 180–185.
30. Mathis C., Paul S.M., Crawley J.N., Characterization of benzodiazepine -sensitive behavior in the A/J and C57BL/6J inbred strains of mice., *Behavior Genetics*, 1994, v. 24, p. 171–180.
31. Miczek K.A., Weerts E., Haney M., Neurobiological mechanisms controlling aggression: preclinical developments for pharmacotherapeutic interventions (review)., *Neurosci. Biobehav. Rev.*, 1994, v. 18, p. 97–110.
32. Millan M.J., Brocco M. The Vogel test: procedural aspects, γ -aminobutyric acid, glutamate and monoamines, *Europ. J. Pharmacol.*, 2003, v.463, p.67–96.
33. Nakane H., Shimizu N., Hori T., Stress-induced norepinephrine release in the rat prefrontal cortex measured by microdialysis., *American. J. Physiol.*, 1994, v. 267, № 6, p. 1559–1566.
34. Olivier B., Zethof T., Pattig S., et al., Stress-induced hyperthermia and anxiety. *Eur. J. Pharmacol.*, 2003, v. 463, p. 117–132.
35. Pellow S., Chopin P., File S.E., Driley M., Validation of open-close arm entries in an elevated plus maze as a measure of anxiety in the rat., *J. Neurosci. Meth.*, 1985, v.14, pp. 149–167.
36. Rodgers R.J., Johnson N.J., Factor analysis of spatiotemporal and ethological measures in the murine elevated plus-maze test of anxiety., *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 1995, v.52, № 2, pp. 297–303.
37. Rohmer J.G., Di Scala G., Sandner G., Behavioral analysis of the effects of benzodiazepine receptor ligands in the conditioned burying paradigm., *Behavioural Brain Res.*, 1990, v.38, p. 45–54.
38. Sanger D.J., Perrault G., Morel E., et al., Animal models and recent developments in the search for novel anxiolytics., In: *Animal Models in Psychopharmacology*, Adv. Pharmacol. Sci., (Oliver B., Mos J., Slangen J.L., eds), Birkhauser Verlag Basel, 1991, p. 3–14.
39. Seredenin S.B., Blednov Yu.A., Badyshov B.A., et al., Pharmacogenetic analysis of mechanisms of emotional stress: effects of benzodiazepines., *Annali Dell'Instituto Superiore di Sanita*, 1990, v. 26, p. 81–87.
40. Seredenin S.B., Viglinskaya I.V., Kashevskaya O.P., The pharmacogenetic approach to the evaluation of the effect of tranquilizers., In: *Biological basis of individual sensitivity to psychotropic drugs* (Seredenin S.B., Longo V., Gaviraghi G. eds.), Graffham Press Ltd., Edinburgh, UK, 1994, p. 47–56.
41. Triet D. Animal models for the study of anti-anxiety agents, a review., *Neurosci. Biobehav. Reviews*, 1985, v. 9, p. 203–222.
42. Vogel J., Beer B., Clody D., A simple and reliable conflict procedure for testing anti-anxiety agents., *Psychopharmacologia*, 1971, v. 21, p. 1–7.
43. Voronina T.A., Dissociation of anxiolytic, amnesic and anti-amnesic effects of GABA-benzodiazepine receptor ligands., In: *Biological basis of individual sensitivity to psychotropic drugs* (Seredenin S.B., Longo V., Gaviraghi G. eds.), Graffham Press Ltd., Edinburgh, UK, 1994, p. 39–46.

ГЛАВА 17

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С НООТРОПНЫМ ТИПОМ ДЕЙСТВИЯ

*Составители: д. м. н., проф. Т.А. Воронина; д. м. н., проф. Р.У. Островская;
д. м. н., проф. Т.Л. Гарибова*

Введение

Ноотропные препараты (НП) составляют особую группу нейropsychотропных препаратов, специфический эффект которых определяется способностью улучшать процессы обучения и памяти, когнитивные, интеллектуальные функции как у здоровых лиц, так и в особенности нарушенные при различных заболеваниях. В зарубежной литературе как синоним НП иногда используется термин «усилитель когнитивных функций» *cognition enhancers* [3, 42]. Спектр показаний для применения НП очень широк. Согласно международной классификации МКБ-10, НП применяют при болезнях класса V «Психические расстройства и расстройства поведения». Они используются при старении организма; психоорганических синдромах нейродегенеративного или сосудистого генеза (сенильная деменция, в том числе болезнь Альцгеймера); при острых и хронических нарушениях мозгового кровообращения, в том числе при инсультах и энцефалопатиях; после черепно-мозговых травм, нейроинфекций; при остром и хроническом утомлении, синдроме хронической усталости, при стрессе, болевых синдромах; при заболеваниях, вызванных длительным приемом алкоголя и наркотиков, терапией анксиолитиками, антипсихотическими средствами и другими депрессантами ЦНС; при астеническом, астено-депрессивном и депрессивном синдромах, невротических расстройствах, вегето-сосудистой дистонии, головокружении; для профилактики укачивания. В педиатрии НП используют при цереброастенических, энцефалопатических нарушениях, расстройствах памяти, при задержке психического и речевого развития, умственной отсталости, при последствиях перинатального поражения ЦНС, синдроме дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ). НП используется здоровыми людьми, когда в силу определенных ситуаций необходимо повысить умственную работоспособность, концентрацию внимания, улучшить продуктивность работы, способность к планированию и принятию решений, увеличить скорость извлечения памятного следа и объем памяти и т.д.

К НП относятся вещества с различным химическим строением и механизмом действия.

1. Классификация веществ с ноотропным и нейропротекторным действием

1.1. Активаторы метаболизма мозга и белково-нуклеинового синтеза

1.1.1. *Пирролидиноновые ноотропные препараты*: пирацетам, фенотропил, оксирацетам, анирацетам, прамирацетам, этирацетам, дипрацетам, ролзирацетам, небрацетам, изаце-

там, нефирацетам, детирацетам, алорацетам, тенилсетам, фасорацетам, леветирацетам, унифирам, сунифирам и др.

1.1.2. Вещества природного происхождения и близкие к ним: церебролизин, аналоги церебролизина N-PEP-12 и E021, актовегин, церебрал, липоцеребрин, цереброкурин, кортексин, пиритинол, пиявит, пантогематоген, полидан и др.

1.2. Ноотропные препараты, реализующие действие через нейромедиаторные системы

1.2.1. Холинергические вещества

1.2.1.1. Вещества, вызывающие усиление синтеза ацетилхолина и его выброса: холин хлорид, фосфотидилсерин, лецитин, ацетил-L-карнитин, МКС-231, клобенпропит, тиоперамин GT-2016, иодопроксифан, UCL-1390, AQ-0145, ZK9346-бетакарболин, линопирдин (DUP 996) и др.

1.2.1.2. Ингибиторы ацетилхолинэстеразы: донепезил, ривастигмин, галантамин, физостигмин, такрин, амиридин, нейромедин, метрифонат, велнакрин малеат, эртастигмин, зифросинол, минаприн, капроктамин, гаперзин А, фенсерин и др.

1.2.1.3. Агонисты м-холинорецепторов: ксаномелин, миламелин, сабкомелин, AF102B, цевимелин, алвамелин, УМ-796, AF151, талсаклидин (WAL2014FU), SCH-57790, SCH-72788, оксотреморин, бетанехол и др.

1.2.1.4. Агонисты н-холинорецепторов: АВТ098, АВТ089, АВТ418, эпибатид, анабазин, ТС1734, МЕМ3453, SIB-1553А, SSR180711, GTS21 и др.

1.2.2. Вещества, влияющие на систему возбуждающих аминокислот: глутаминовая кислота, мемантин, милацемид, глицин, D-циклосерин, нооглютил, ампалекс, анирацетам, унифирам, сунифирам, 4-аминопиперидины, димебон, CP101606, NPS1506 и др.

1.2.3. Вещества, влияющие на систему ГАМК: гаммалон, натрия, лития и кальция оксибутират (нейробутал), пикамилон, фенибут, пантогам, никотинамид, габапентин, PCALC36, SB737552, NS105 и др.

1.2.4. Вещества, влияющие на серотонинергическую систему: антагонист 5HT₆ рецепторов SB742457, частичный агонист 5HT₄ рецепторов SL650155, агонисты 5-HT_{1A} рецепторов — халипроден, 8-ОН-DPAT и др., антагонисты 5-HT₃ рецепторов — ондансетрон и мирисетрон.

1.2.5. Вещества, влияющие на дофаминергическую систему и ингибиторы MAO: пирибедил, сумаринол, BP897 и АВТ431, NS2330, лазабемид, селегилин, расагилин и др.

1.2.6. Вещества, влияющие на аденозиновую систему, фосфодиэстеразу: кофеин, пропентофиллин, ролипрам, МЕМ1414, НТ0712 и др.

1.2.7. Вещества, влияющие на гистаминовую систему: А349821 и др.

1.2.8. Нейропептиды и их аналоги: АКТГ 1-10 и его фрагменты, эбиратид, семакс, ноопепт, соматостатин, вазопрессин, тиролиберин и их аналоги (NC1900, FK960 и др.), нейропептид Y, субстанция P, ангиотензин-II, холицистокинин-8, ингибиторы пролилэндопептидазы (JTP-4819, S17092, ЗП-20, ЗП-22 и др.), беглимин и др.

1.3. Нейростероиды и мелатонин: 7-β-эстрадиол, эстадерм, J811, J861 дегидроэпиандростерон (DHEA) и его сульфат (DHEAS), карбенексолон, мелатонин.

1.4. Антиоксиданты: мексидол, дибунол, фосфотидилсерин, пиритинол, эксифон, цитидиндифосфохолин, тириладз месилат, меклофеноксат, атеровит, альфа-токоферол, эбселеп, эмоксипин, гингко билоба и др.

1.5. Антагонисты кальция: нимодипин, нивалдипин, циннаризин, флунаризин и др.

1.6. Церебральные вазодилататоры: винкамин, винпоцетин, ницерголин, гидергин, винконат, виндебумол, нафтидрофурил и др.

1.7. Вещества, влияющие на протеинкиназы: этимизол, CEP 1347, AS601245 и др.

1.8. Витамины и их аналоги, пищевые добавки, вещества растительного происхождения: витамины E, B6, B12, фолиаты, тиамин, лецитин (фосфотидилхолин), фос-

фотидилсерин, альфа-липовая кислота, L-карнитин, ацетил-L-карнитин, гинкго билоба, женьшень, лимонник и др.

1.9. Вещества, влияющие на нейротрофиновую систему: прямые (фрагменты NGF92-97 в β поворотной конформации, сурамин) и не прямые (аналоги аденозина) активаторы Trk рецепторов; вещества, влияющие на экспрессию и секрецию нейротрофинов (неотрофин, семакс, идебенон, агонисты и позитивные модуляторы AMPA-рецепторов); модуляторы нейротрофиновой системы (церебролизин, CEP-1347, NDD-094).

1.10. Вещества, влияющие на процесс нейродегенерации при болезни Альцгеймера: вещества, уменьшающие синтез и влияющие на агрегацию, деагрегацию и депонирование β -амилоида и производящие «очистку» амилоидных бляшек, хелатирующие металлы, вещества, уменьшающие гиперфосфорилирование белка тау и блокаду тау-агрегации, увеличивающие уровень шаперонов, противовоспалительные средства, статины и др.

1.11. Средства для лечения синдрома дефицита внимания с гиперактивностью (СДВГ) у детей и взрослых: метилфенидат, амфетамины, атомоксетин, модафинил, фенибут, фенотропил и др.

1.12. Комбинированные препараты: фезам (пирацетам, циннаризин), винтотропил (пирацетам, винпоцетин), ороцетам (пирацетам, оротовая кислота), диапирам (пирацетам, диазепам), нейронал (пирацетам, янтарная кислота, рибоксин, никотинамид, рибофлафин-мононуклеотид, пиридоксин), инстенол (гексабидин, этамиван, этафиллин), цитофлавин (янтарная кислота, рибоксин, никотинамид, рибофлафин-мононуклеотид) и др.

1.13. Вещества из разных групп: оротовая кислота, метилглюкооротат, фолиевая кислота, ганглиозиды, глюкокортикоиды, геровитал НЗ, диметиламиноэтанол (ДМАЭ), СДР-холин (цитохалин) и др.

2. Общие положения

Исследование новых веществ с предполагаемым ноотропным действием следует проводить на различных видах животных (мыши, крысы, а при необходимости и др. виды). Полученные данные обрабатываются с помощью современных методов статистики и представляются в виде таблиц и рисунков. Далее представлены методы, использование которых является обязательным для всех препаратов.

Изучение необходимо проводить в сравнении с эталонными препаратами: пирацетамом или другим препаратом пирролидиноновой группы и желательнее с эталонным препаратом, близким по химическому строению и механизму действия с новым веществом. По каждому тесту следует использовать не менее 3-х доз вещества.

Должны быть использованы по меньшей мере два пути введения, один из которых должен соответствовать предполагаемому клиническому способу применения. Для последнего необходимо представить параметры начала действия и продолжительности эффекта. С целью изучения возможных явлений толерантности и лекарственной зависимости необходимо изучить эффект предлагаемого НП в условиях длительного (не менее 1 месяца) введения с последующей отменой. Методика этих исследований описана в работе [7].

3. Методы изучения специфической ноотропной активности

Изучение специфической ноотропной активности новых веществ делится на два этапа. Первый этап — скрининг с использованием простых методов исследования влияния на обучение и память, второй — расширенное изучение спектра фармакологической активности веществ.

3.1. I этап. Влияние на обучаемость в методике условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ)

Базисной моделью для оценки влияния веществ на формирование и воспроизведение памятного следа в норме и в условиях его нарушения (амнезия) является методика

условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) [2]. Основными преимуществами этой методики является быстрота выработки рефлекса (обучение с одной пробы) и возможность дифференцированно воздействовать на различные фазы памяти.

Существует несколько вариантов методики условных рефлексов пассивного избегания, вырабатываемых в одном сочетании. Наиболее часто используемая форма УРПИ — обучение животных (крыса, мышь) в установке, состоящей из двух отсеков: затемненного и освещенного, соединенных дверцей. Помещенное в освещенный отсек (хвостом к дверце) животное довольно быстро переходит через дверь в затемненный отсек (норковый рефлекс) и затем (в различных модификациях метода либо сразу после входа, либо через определенный период пребывания в темном отсеке) получает там электрокожное раздражение через электродный пол. Параметры этого болевого раздражения (сила, длительность) могут варьировать, но они должны быть достаточными, чтобы обучить животное УРПИ. Электроболевое раздражение наносится либо в течение определенного времени, для чего дверца закрывается заслонкой, либо до тех пор, пока животное не возвратится в освещенный отсек через оставшуюся открытой дверцу. В том и другом случае животное должно обучиться не заходить в темную камеру, где оно получило болевое раздражение, и пассивно избегать неприятную ситуацию, находясь в светлом отсеке.

Могут быть использованы и другие варианты установок для обучения УРПИ. Животное помещают на освещенную, находящуюся на высоте платформу; в силу свойственного грызунам норкового рефлекса оно переходит в соединенную с платформой темную камеру, где получает обучающее электроболевое раздражение через электродный пол; о степени обучения судят по латентному времени первого захода в темную камеру и длительности нахождения на платформе при повторном помещении туда животного [27]. Еще одним вариантом является методика, в которой безопасная платформа находится в середине электрифицированного пола; при переходе на этот пол животное получает болевое раздражение и, чтобы избежать его, должно оставаться на безопасной площадке. Во всех описанных выше модификациях методики УРПИ параметры электроболевого раздражения, наносимого через электродный пол, составляют 0,3–0,6 мА.

Проверка сохранения УРПИ (воспроизведение рефлекса) состоит в повторном помещении животного в освещенный отсек, всячую платформу и т.д. через различные интервалы времени (6 или 8, или 24, или 48, или 72 ч, или 7 сут и т.д.). Наиболее часто используется интервал 24 ч. Для оценки степени обучения через эти интервалы регистрируется латентное время первого захода в темный отсек камеры, где ранее с использованием болевого раздражения проводилось обучение, и время, проведенное в светлом и темном отсеках за фиксированный интервал (2 или 3 мин).

3.2. Влияние на различные фазы памяти в методике УРПИ

Для исследования влияния веществ на фазы памяти используется методика УРПИ, описанная выше. Вещество в этом случае вводится в различные стадии формирования памятного следа [35]. Для получения данных о влиянии вещества на процесс ввода и первоначальной обработки информации вещество вводится непосредственно перед процедурой обучения, а проверка обученного осуществляется через 24 ч. Для получения данных о влиянии вещества на процесс консолидации вещество вводится непосредственно после процедуры обучения, а проверка также осуществляется через 24 ч. Для получения данных о влиянии вещества на процесс извлечения информации вещество вводится перед воспроизведением рефлекса (через 24 ч после обучения). Регистрируется во всех случаях при воспроизведении УРПИ: латентное время первого захода в опасный, темный отсек и общее время нахождения в светлом и темном отсеках за определенный интервал времени. С целью оценки влияния предполагаемого НП на процессы забывания тестирование сохранения памятного следа осуществляется спустя отдаленные интервалы (2–8 недель).

3.3. Амнезия УРПИ, вызванная электрошоком

Амнезию условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) можно вызвать многими способами, но наиболее принятыми и широко применяемыми являются амнезии, вызванные максимальным электросудорожным шоком (припадком) или введением скополамина [2,6]. Электросудорожный шок (ЭШ) наносится через электроды, наложенные на роговицу глаз (15–20 мА, 200–500 мсек) или на поверхность ушных раковин (10–100 мА, 200–500 мсек) мышей или крыс непосредственно после выработки условной реакции пассивного избегания. Воспроизведение рефлекса осуществляют через различные интервалы времени, наиболее часто через 24 или 48 ч. Регистрируется латентное время первого захода животного в темный опасный отсек и общее время пребывания животного в темном и светлом отсеках за определенный период времени (2 или 3 мин). ЭШ вызывает амнезию УРПИ, которая выражается в уменьшении латентного времени захода в темный опасный отсек и в увеличении времени пребывания в темном отсеке.

Для оценки антиамнестического действия веществ их следует вводить, в зависимости от цели исследования, или до обучения, что делается наиболее часто, или непосредственно перед действием ЭШ, или перед воспроизведением УРПИ. Ноотропный эффект во всех случаях выражается в устранении амнезирующего действия ЭШ, что характеризуется увеличением латентного времени захода в темную камеру и уменьшением времени нахождения в ней при воспроизведении рефлекса.

3.4. Амнезия, вызванная скополамином

Амнезию условного рефлекса пассивного избегания (УРПИ) вызывают введением скополамина (0,5–1,5 мг/кг, внутривенно) мышам или крысам за 30 мин до обучения УРПИ или непосредственно после обучения [46]. Воспроизведение УРПИ осуществляют через различные интервалы времени, наиболее часто через 24 ч. Регистрируются такие же показатели как при амнезии, вызванной ЭШ. Исследуемые вещества вводят или до обучения УРПИ и введения скополамина, или после проведения обучения, или перед воспроизведением рефлекса через 24 ч.

Ноотропный эффект во всех случаях выражается в устранении скополаминовой амнезии, что характеризуется увеличением латентного времени захода в опасный отсек камеры и уменьшением времени пребывания в нем при воспроизведении УРПИ.

Кроме максимального электрошока и скополамина в качестве амнезирующих агентов используют N-холиноблокатор мекамилан, ГАМК-позитивные вещества бензодиазепины, вещества, влияющие на хлорный канал барбитураты, неконкурентные блокаторы NMDA рецепторов: кетамин, дизоцилпин (МК-801), фенциклидин, конкурентный блокатор NMDA рецепторов CPP, адреноблокатор клофелин, ингибиторы белкового синтеза (циклогексимид, анизомицин), цетиловый эфир пролина, этанол.

3.5. Влияние на обучаемость в методике условного рефлекса активного избегания

Изучение влияния веществ на процесс обучения предпочтительно проводить, используя методику двустороннего избегания болевого раздражения через электродный пол в челночной камере типа Shuttle-box у мышей и крыс [45]. Использование модели активного избегания позволяет проводить обучение при многократных повторениях и оценить динамику выработки условного рефлекса. Установка состоит из двух отделений, разделенных перегородкой, в которой имеется дверца. Оба отделения имеют отдельно электрифицированный пол. Условным раздражителем является свет или звук, которые предъявляются за 6–10 с до безусловного раздражителя, которым является электроболевое раздражение (50–100 Гц, 20–30 В, 10 мсек), подаваемое через электродный пол поочередно то в одном, то в другом отделении. Чтобы не получить болевого раздражения, животное должно обучиться перебежать в другой отсек камеры во время действия условного сигнала (условный рефлекс). Избегание в другой отсек в ответ на действие болевого

раздражителя является безусловным рефлексом (реакция избавления). Схема выработки условного рефлекса активного избегания состоит в следующем. Животное получает ежедневный сеанс обучения, состоящий из стандартного числа сочетаний условного и безусловного раздражителей (например, 10, 20, 30); регистрируется число условных и безусловных ответов. Обучение продолжается или до полной выработки условного рефлекса активного избегания, когда при предъявлении условного сигнала животное выполняет рефлекс избегания в 100% и не получает болевых раздражений, или же до определенного, выбранного экспериментатором критерия. Во всех случаях ежедневно регистрируется количество условных реакций избегания и реакций избавления за сеанс обучения и время (в секундах) выполнения этих рефлексов, а также общая продолжительность обучения до выбранного критерия. Испытуемые вещества вводят перед сеансом обучения или непосредственно после сеанса обучения. Контрольной группе вводят физиологический раствор или дистиллированную воду. Ноотропные препараты ускоряют выработку условного рефлекса активного избегания, хотя их эффект в этом тесте является обычно менее четким, чем в тесте УРПИ, и проявляется в основном на начальных фазах выработки или в специальных условиях «функционального сбоя» [10].

3.6. Активность в тесте неассоциативного обучения

Перечисленные методы относятся к категории ассоциативного обучения, поскольку они базируются на оценке животным некоего ключевого (болевого или пищевого подкрепления) фактора, как обязательно ассоциирующегося с определенным условно-рефлекторным или обстановочным (контекстуальным) фактором. Наряду с этим существует неассоциативное обучение, одной из разновидностей которого является угашение, или «негативное обучение», обязанное своим названием тому, что оно сводится не к приобретению нового исследования, а к ослаблению существовавшей реакции. Одной из наиболее простых и воспроизводимых форм «негативного обучения» является угашение двигательной активности как следствие ослабления исследовательско-ориентировочной реакции в результате оценки животным окружающей обстановки как не имеющей биологического значения. Важным отличием этой формы поведения от ассоциативного обучения с отрицательным подкреплением является полное отсутствие фактора инвазивности.

Влияние НП на угашение исследовательско-ориентировочной реакции может исследоваться в экспериментах различных типов, из которых наиболее приемлемыми для повседневной фармакологической практики являются два.

1. Согласно методу [37], одиночное животное (мышь или крыса) помещается в открытое поле, в котором регистрация двигательной активности осуществляется в течение 5 мин. Повторное помещение животного в эту же ситуацию осуществляется в интервале от 2-х до 7 дней (в зависимости от задачи исследования). Предполагаемый НП вводится после первой экспозиции, таким образом оценивается эффект вещества на забывание.

2. В отличие от этих экспериментов, в которых для оценки угашения используется повторная регистрация двигательной активности, в методике угашения, разработанной в НИИ Фармакологии имени В.В. Закусова РАМН, применяется однократная, но более длительная регистрация — в течение 30 мин — срока, достаточного для развития угашения в одном сеансе, определяемого поэтому как «острое угашение». Регистрация активности осуществляется с помощью многоканального анализатора двигательной активности типа Ortovarimex или его аналога. Исследования проводятся на группе (обычно из 10 мышей), что позволяет уменьшить влияние индивидуальных различий в исходной двигательной активности и реакции на исследуемый НП. Другим важным достоинством групповой регистрации является то, что в этом случае оценивается ослабление обследования не только окружающей обстановки, но и «партнеров» по группе. Любой НП, независимо от его химической структуры, будучи введен до регистрации двигательной активности, достоверно ускоряет развитие ее острого угашения [16].

Очевидно, что метод острого угашения исследовательской реакции пригоден только для оценки «чистых» НП, не вызывающих ни стимуляции, ни угнетения исходной двигательной активности.

3.7. II этап. Влияние на обучаемость в методике условного рефлекса с положительным подкреплением

Условный пищевой или питьевой рефлекс вырабатывается у животных, как правило, в однопорочечной камере, У- или Т-образном лабиринте. Крыс с питьевой (пищевой) депривацией в течение 48 ч помещают в стартовый отсек У- или Т-образного лабиринта, в одном из рукавов которого помещена кормушка с водой (пищей). Через 30–60 с после посадки открывают дверцу стартового отсека. Световой или звуковой сигнал или щелчок открывания дверки служит условным раздражителем. Регистрируется время пробежки животного от стартового отсека до кормушки, число правильных и неправильных ответов (заходы в пустой рукав). Рассчитывается среднее для группы время выработки рефлекса до определенного критерия, процент животных с выработанным рефлексом за определенное количество сочетаний, число сочетаний, требуемое для выработки рефлекса до критерия. В качестве критерия выработки рефлекса выбирается обычно 7 или 8 правильных пробежек из 10-ти предъявляемых. При выработке пищевого рефлекса существенным представляется выбор пищевого подкрепления и условия содержания животных. В качестве подкрепления применяют кусочки хлеба или сыра массой 0,15–0,20 г, зерна подсолнечника. В условиях предшествующей выработке рефлекса пищевой депривации (48 ч) животные имеют свободный доступ к воде. Кормление животных вне эксперимента должно осуществляться в одно и то же время суток, обычно после окончания экспериментов. Пища должна быть стандартной и калорийной. За время исследования по выработке рефлекса падение массы животного не должно превышать 20% от исходного уровня. НП обычно ускоряют выработку рефлекса с позитивным подкреплением. Исключения составляют те случаи, когда предполагаемый НП обладает также анорексигенным действием.

3.8. Влияние на стратегию поведения в исследовательском крестообразном лабиринте

Для изучения влияния веществ на стратегию поведения в лабиринте используют закрытый прозрачной крышкой крестообразный лабиринт, который состоит из 4-х рукавов (прономерованных 1, 2, 3, 4), соединенных центральной камерой. Животное (мышь или крысу) помещают в центральный отсек лабиринта и регистрируют последовательность его переходов из одного рукава в другой. Тест заканчивается, когда животное осуществляет 12 таких переходов. Регистрируются следующие показатели поведения (желательно с помощью специальной компьютерной программы):

1) общее время, проведенное мышью в центральном и в боковых отсеках лабиринта; эти показатели отражают уровень двигательной активности животного, а также характеризуют интенсивность обследования ими новой среды и могут использоваться для оценки стимулирующего или седативного эффекта веществ;

2) латентный период и продолжительность первого визита в боковой отсек. Их длительность отражает уровень тревожности животного в новой обстановке и может использоваться для оценки транквилизирующего эффекта веществ;

3) «длина» первого и второго цикла патрулирования (т.е. посещения всех его четырех отсеков хотя бы один раз), исчисляемая числом подобных заходов в отсеки; чем большее число заходов требуется мышши, чтобы посетить все 4 боковых рукава (т.е. совершить один цикл патрулирования), тем менее «систематично» и менее эффективно исследование лабиринта;

4) число циклов патрулирования, совершенное за время эксперимента (как еще один показатель эффективности исследовательского поведения).

Тестируемые вещества вводятся животным до эксперимента. Показатели 3–4 используются для оценки ноотропного действия веществ. Эксперимент проводится в светлое время суток в изолированном лабораторном помещении с использованием «белого шума» интенсивностью около 70 дБ.

3.9. Распознавание новых объектов в процессе исследовательского поведения

В тесте распознавания новых объектов в процессе исследовательского поведения можно использовать как открытое поле, так и различные лабиринты. Эксперименты проводятся на мышах или на крысах, предпочтительно в светлое время дня.

При использовании открытого поля в начале эксперимента в него помещается определенный предмет, который остается в нем в течение 3-х мин тестирования. Затем этот объект удаляется; через 10 мин и 24 ч в поле вносится другой объект, отличный по форме и /или цвету. Сравнивается число приближений к объекту, его обнюхиваний при первом, втором и третьем сеансах.

При использовании крестообразного лабиринта с каждым животным тест проводится дважды с интервалом 1 ч. Во время 1-го тестирования в каждом рукаве лабиринта находилась круглая пластмассовая чашка диаметром 7 см и высотой 3 см. Перед 2-м тестированием в каждом из двух противоположных рукавов вместо крышки помещается стеклянная коническая колба высотой 7 см и диаметром дна 4 см. Регистрируется время пребывания животного в каждом из рукавов лабиринта и вычисляется индекс распознавания новых объектов как отношение продолжительности пребывания в рукавах с колбой (новый объект) к продолжительности пребывания во всех рукавах лабиринта. При отсутствии предпочтения рукавов с новыми объектами индекс распознавания составляет около 0,5.

Появление новых объектов при повторной посадке вызывает у мышей увеличение продолжительности пребывания в этих рукавах, что выражается в увеличении индекса распознавания. Скополамин (1 мг/кг) или МК-801 (0,2 мг/кг) вызывает нарушение обучения (памяти), которое выражается в виде уменьшения индекса распознавания. Способность веществ улучшать распознавание новых объектов, нарушенное скополамином или МК-801, рассматривается как свидетельство наличия у них антиамнестической активности.

3.10. Поведение в водном лабиринте Морриса

Лабиринт Морриса [34] широко используется в исследованиях, связанных с изучением механизмов пространственной ориентации и памяти и выявлением путей фармакологического воздействия на них. Лабиринт Морриса представляет собой круглый бассейн, заполненный непрозрачной водой, в которую погружена небольшая «безопасная платформа», невидимая животному. В литературе описано много вариантов режима эксперимента в исследованиях на мышах и крысах с использованием лабиринта Морриса, при этом бассейн обычно имеет диаметр 150–200 см и высоту 50–60 см, хотя описаны и бассейны значительно меньших размеров. Бассейн заполняется непрозрачной водой (например, подбеленной молоком) при температуре 26–28 °С. В бассейн помещается круглая керамическая платформа высотой 14 см. Желательно, чтобы поведение животных регистрировалось автоматически, например, с помощью автоматизированной компьютерной видеосистемы в сочетании с программой анализа передвижений Any-maze (Stoelting Co., США). Исследование в лабиринте Морриса в зависимости от задачи можно проводить по одному из двух протоколов. Для демонстрации наличия улучшающего обучения эффекта тестируемого вещества применяется протокол без предварительного ознакомления, ведущий к исходно низкому уровню обучаемости. Режим с предварительным ознакомлением применяется, когда в задачу исследования входит выявление роли той или иной медиаторной системы (в частности холинергической) в реализации эффек-

та изучаемого вещества. В этом случае введение блокатора соответствующей медиаторной системы ведет к ухудшению обучаемости. При введении на этом фоне НП можно выявить нормализующий эффект вещества и таким образом установить роль данной медиаторной системы в реализации эффекта изучаемого соединения и его антиамнестический эффект.

В общем виде процедура обучения состоит в следующем. Если до начала эксперимента проводится отбор животных, пригодных для обучения (*процедура с предварительным ознакомлением*), то платформа располагается на 1 см выше уровня воды. Животное на 20 с помещается на платформу. Затем его опускают в воду на противоположной стороне бассейна и в течение 60 с животному позволяют найти платформу и взобраться на нее. Затем крысу (мышь) повторно опускают в воду на противоположной стороне бассейна и позволяют искать платформу. Если животное в течение 60 с самостоятельно не находит платформу, ему помогают переместиться к платформе и взобраться на нее. Животные, не нашедшие самостоятельно платформу в двух попытках подряд, исключаются из исследования. В течение 2-х последующих дней платформа располагалась на 0,5 см ниже уровня воды. Ежедневно животным предоставляется по 4 попытки найти платформу в течение 60 с. Интервал между попытками составляет 20 с, в течение которого они находятся на платформе. Каждый день перед первой попыткой животное на 20 с помещается на платформу. Регистрируется время, прошедшее от момента пуска животного в воду до влезания на платформу. Животных опускают в воду в 3-х различных точках, расположенных на противоположной по отношению к платформе половине бассейна. Тестируемые препараты вводят животным перед началом изучения в каждый из двух дней исследования. Для получения амнезии по описанной выше схеме используют скополамин в дозе 0,6 мг/кг или любое вещество, нарушающее процесс обучения.

Возможен вариант, когда на 3-й день эксперимента платформу убирают и животных однократно помещают в бассейн на 60 с. Регистрируется время, в течение которого животное находилось в квадранте, где в предыдущие дни располагалась платформа, как показатель эффективности обучения, проводившегося в предыдущие 2 дня.

При проведении эксперимента *без предварительного ознакомления с установкой* платформу изначально погружают под воду на 0,5–1 см. При обучении животное помещают в дальний от платформы угол и регистрируют время необходимое для нахождения платформы. Если в течение 60 с животное само не находит платформу, его туда помещают и оставляют 10–20 с. Для каждого животного проводят 5 повторных предъявлений с интервалом 15 мин. Через 10 дней тестирование следа памяти проводится по той же схеме, что и в первый день исследования.

3.11. Транскаллозальный вызванный потенциал

Транскаллозальный вызванный потенциал (ТВП) является одним из основных тестов, позволяющем оценить скорость передачи информации между полушариями мозга [30]. Способность облегчать межполушарную передачу является одним из общих свойств всех ноотропных веществ [29]. Исследования проводят на кошках, кроликах или крысах. Животным под анестезией вживляют раздражающий биполярный электрод в прецентральный область коры одного из полушарий мозга, а регистрирующий электрод помещают в симметричной точке противоположного полушария мозга. Индифферентный игольчатый электрод вкалывают в затылочную рубцовую ткань головы животного. Эксперименты проводят через 5–6 дней после операции на бодрствующих животных, мягко фиксированных в специальном станке. ТВП получают с помощью электрической стимуляции 20–40 В, с длительностью импульса 0,2–1 мсек. Сначала определяют порог вызванного потенциала и затем исследуют действие вещества при силе раздражения, равной полутора-пороговой величине стимула. ТВП, усредненный по 20-ти реализациям, регистрируют на протяжении 500 мсек после подачи стимула. Осуществляется покомпонентный анализ ТВП, оцениваются латентные периоды, амплитуда и форма пер-

вичного позитивного (P1), первичного негативного (N1) и вторичного позитивного (P2) компонентов вызванного потенциала и их изменение на фоне введения веществ. Регистрацию и обработку данных желательнее осуществлять с помощью специализированного нейро-компьютерного анализатора.

3.12. Изучение противогипоксических свойств

Противогипоксическими свойствами обладают многие ноотропные препараты. Однако, следует учитывать, что ими обладают и другие вещества, в том числе препараты, обладающие способностью ухудшать мнестические функции, например, бензодиазепиновые транквилизаторы. С другой стороны, не все НП обладают антигипоксическим эффектом, который, таким образом, может рассматриваться как полезное дополнение к чисто ноотропным, т. е. когнитивным эффектам [4].

Для изучения противогипоксических свойств рекомендуется использовать не менее 2-х моделей гипоксий различного генеза. Во всех случаях следует регистрировать время выживания (резервное время) животных в условиях гипоксии и количество выживших и погибших животных в процентах. Испытуемое вещество вводят до начала эксперимента с учетом пика его действия.

Гипобарическая гипоксия создается в проточно-вытяжной барокамере с поглотителем CO_2 . Животных (мышей, крыс) «поднимают на высоту» 11 км (198,7–185 мм рт. ст.) со скоростью 25–50 м/сек [15]. Нормобарическая гипоксия с гиперкапнией («баночная» гипоксия) является наиболее простым методом оценки противогипоксической активности. Животных одинакового веса (разброс не более 2-х г на группу) помещают поодиночке в герметически закрываемые банки объемом 200 см³ (для мышей). Гемическая гипоксия воспроизводится путем однократного введения мышам нитрита натрия в дозе 150–250 мг/кг подкожно [21].

Кроме того, противогипоксическое действие можно оценить в условиях циркуляторной гипоксии, гистотоксической гипоксии и др. Более подробное описание методов изучения противогипоксической активности представлено в Методических рекомендациях по экспериментальному изучению противогипоксических препаратов.

3.13. Влияние на физическую работоспособность

Эксперименты на бегущей дорожке (трэдмил) или на вращающемся («беличьем») колесе проводятся на крысах. Учитывается максимальная длительность бега до отказа. Используется также такая модель, как плавание с дополнительной нагрузкой, составляющей, в зависимости от задачи, от 6 до 10% от собственного веса животного. Эксперименты проводятся на мышах и крысах. Плавание осуществляется в бассейне с предварительно отстоянной (для уменьшения содержания растворенного газа) водой при температуре воды 24–26 °С. Груз фиксируется на туловище или прикрепляется к хвосту. Учитывается длительность плавания до появления первых признаков утомления и сроки гибели животных. Наряду с этим можно регистрировать динамику изменения ЭКГ и интервалограмму RR, а также исследовать метаболические показатели мышечного утомления: содержание лактата, пирувата и их соотношение, уровень аммиака и креатинина [15].

Потенциальный НП должен быть изучен также на моделях патологических состояний, являющихся объектом клинического применения этой группы препаратов.

4. Методы моделирования патологии центральной нервной системы

4.1. Нарушения когнитивных функций, вызванные различного рода ишемическими воздействиями

Экспериментальные модели клинических форм ишемии делятся на две группы: фокальной и глобальной ишемии [31].

4.1.1. Оклюзия средней мозговой артерии

Из моделей фокальной ишемии наиболее часто применяемой является окклюзия средней церебральной артерии. По характеру вызывающего ее воздействия эта форма ишемии, в свою очередь, делится на две группы: перманентной и обратимой. Перманентная ишемия достигается путем перевязки, прижигания, введения эндотелина I. Обратимая ишемия достигается наложением на то или иное время сосудистого зажима или лигатуры. [40].

Согласно методике [18] окклюзию средней мозговой артерии (ОСМА) проводят у наркотизированных хлоралгидратом (200 мг/кг, в/б) животных. В месте шва скуловой кости с лобной делается отверстие диаметром около двух миллиметров, обнажая место пересечения средней мозговой артерии с нижней мозговой веной. Под микроскопом под левую среднюю мозговую артерию подводится специальный металлический крючок. С помощью коагулятора производится окклюзия средней мозговой артерии проксимальнее места ее бифуркации на фронтальную и париетальную ветви. При этом в поле зрения микроскопа наблюдается прекращение тока крови по средней мозговой артерии выше места окклюзии. В группе ложно оперированных животных осуществляется описанная выше процедура операции без ОСМА. Вещество с ноотропным и нейропротективным эффектом вводится крысам однократно через 4–4,5 ч после операции. За 30 мин до операции животных обучают условной реакции пассивного избегания (УРПИ) или другому условному рефлексу, а через 70 ч после ОСМА рефлекс воспроизводится. Затем для определения влияния веществ на объем инфаркта у животных извлекают головной мозг, препарируют срезы и с помощью программы МОСНА (Jandel Scientific Corp., 1991–1992, версия 1.2.0.0) проводят планиметрию, определяли площадь ипсилатерального полушария (ИП) и зоны поражения (ЗП), вычисляя объем ЗП и ИП по формуле «трапеции»: $V = d [1/2 (S_1 + S_n) + S_2 + \dots + S_i + \dots + S_{n-1}]$, где d — толщина среза, S_1, S_n, S_{n-1} — площадь ЗП и ИП для каждого среза, с последующим определением процента объема ЗП относительно объема ИП.

Другой модификацией исследования может быть ОСМА с одновременной перевязкой ипсилатеральной сонной артерией. В обоих случаях перевязка ведет к развитию ишемического повреждения, ограниченного лобно-теменной областью коры головного мозга. При перевязке проксимального отдела средней мозговой артерии развивается также ишемическое поражение подкорковых образований [22].

4.1.2. Фотоиндуцированный тромбоз

Относительно неинвазивной формой фокальной ишемии является фотоиндуцированный тромбоз. Эксперименты проводятся на крысах, под хлоралгидратной анестезией. Метод состоит во введении в подключичную вену фоточувствительной краски бенгальского розового (40 мг/кг) и облучении светом ксеноновой лампы (250 Вт), фокусируемым с помощью волоконного световода на интактной кости в области избранного отдела мозга, например, префронтальной коры [20]. Взаимодействие циркулирующей в крови краски со светом ведет к активации свободно-радикальных процессов с последующей агрегацией тромбоцитов и образованием ишемического инсульта.

Наиболее часто применяемый при перечисленных формах ишемии протокол эксперимента предусматривает обучение животного рефлексу пассивного избегания, а возможно и регистрацию его поведения в открытом поле или в анализаторе Ortovanimex, последующее ишемизирующее воздействие, послеоперационное введение предполагаемого НП (однократно или повторно — в течение срока, определяемого особенностями действия изучаемого вещества), изучение сохранности памятного условно-рефлекторного следа и повторная регистрация двигательной активности для оценки степени угашения (неассоциативное обучение). Возможно также использование протокола с профилактическим введением изучаемого НП.

4.1.3. Глобальная ишемия

Из моделей глобальной ишемии наиболее часто используемыми являются двух- или четырехсосудистая перевязка артерий у песчанок, мышей линии ddY или крыс. В случае использования модели двухсосудистой перевязки на крысах ее обычно комбинируют с гипотензивным воздействием. Состояние глобальной ишемии развивается в условиях клинической смерти. Одна из моделей клинической смерти у крыс состоит в прекращении кровообращения длительностью от 12 до 15 мин путем внутриторакального пережатия сосудистого пучка с помощью специального приспособления, подводимого под сосудистый пучок без повреждения грудной клетки. Последующая реанимация состоит в наружном массаже и искусственной вентиляции легких. Протокол эксперимента предусматривает введение предполагаемого НП с нейропротекторным действием через 30 мин после начала сердечно-легочной реанимации; в последующем оценивается неврологический статус, исследуется поведение в открытом поле, обучаемость в Т-образном лабиринте с пищевым подкреплением [13].

4.2. Моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы (геморрагического инсульта)

Моделирование интрацеребральной посттравматической гематомы (ИПГ) — геморрагического инсульта (ГИ) проводится в области внутренней капсулы правого полушария согласно методике [12]. Крысам, наркотизированным хлоралгидратом (200 мг/кг, в/б) при помощи специального устройства (мандрен-нож) в стереотаксисе осуществляют деструкцию мозговой ткани в области *capsule interna*, (координаты Н=4 мм, L=3,0 мм, А=1,5 мм от брегмы по атласу G. Paxinos) с последующим (через 2–3 мин) введением в место повреждения крови, взятой из-под языка оперируемого животного (0,02–0,03 мл). Морфологические исследования показали, что таким способом достигается локальный аутогеморрагический билатеральный инсульт в области внутренней капсулы (диаметр — 2 мм, глубина — 3 мм) без существенных повреждений выше расположенных образований мозга. Ложно оперированным животным проводят скальпирование и трепанацию черепа. Протокол эксперимента предусматривает первое введение предполагаемого НП с нейропротективным действием через 4–4,5 ч после операции и пробуждения животного от наркоза. При необходимости возможно повторное ежедневное применение тестируемого вещества. Динамику развития ИПГ исследуют в течение 14 дней с регистрацией гибели крыс, показателей поведения и состояния животных в 1-е, 3-е, 7-е и 14 сутки после операции, используя комплекс традиционных для экспериментальной нейropsychofarmacology методов [5,8]. Неврологический статус крыс определяется с использованием шкалы Stroke-index McGrow. Оценка неврологического статуса осуществляется по балльной системе. При наличии у животных нескольких симптомов неврологического дефицита тяжесть состояния определяется как сумма соответствующих баллов. Отмечается количество крыс, с легкой (от 0,5 до 2,5 Stroke-index) и с тяжелой (от 3 до 10 Stroke-index) неврологической симптоматикой, а также положительной или отрицательной динамикой развития неврологического дефицита в группе. Для определения нарушений координации движений у крыс используют тест вращающегося стержня; ориентировочно-исследовательское поведение и двигательную активность исследуют в открытом поле, уровень тревожности — в условиях методики приподнятого крестообразного лабиринта, обучение и память изучают в условиях методики условного рефлекса пассивного избегания. Могут быть использованы и другие методы. Животные делятся на следующие группы: 1 — интактные крысы; 2 — ложно оперированные животные; 3 — группа животных с ИПГ; 4 — группа животных с ИПГ, которым после операции вводится тестируемое вещество. Контрольным — 1, 2 и 3 группам крыс вводится физиологический раствор. С учетом гибели животных после операции (в среднем 50–60%) получающие ЛС группы в начале эксперимента должны состоять не менее чем из 12–15 особей.

4.3. Когнитивные нарушения, вызванные фронтальной лобэктомией

Лобэктомия моделирует ситуацию поражения мозговой ткани, вызванного массивной травмой, гематомой, опухолевым процессом. Использование именно фронтальной лобэктомии для выявления потенциальных ноотропов обусловлено представлениями о ключевой роли фронтальной коры в осуществлении когнитивных функций. Крысы подвергаются тренировке по программе активного либо пассивного избегания (одна из этих двух форм обучения для каждого эксперимента). После тестирования сохранения памятного следа, осуществляемого через 7 дней при обучении активному избеганию либо через 24 ч при обучении пассивному избеганию, крысе под наркозом производится краниотомия, вскрытие твердой мозговой оболочки и удаление (с помощью миниатюрного скальпеля) 50% объема префронтальной коры. В течение 9-ти дней, следующих за операцией, осуществляется терапия предполагаемым ноотропом (либо физиологическим раствором — для контрольной группы), после чего определяется в соответствующем тесте степень сохранения памятного следа [19, 36].

4.4. Мнестические нарушения при перинатальных повреждениях

Перинатальная патология моделируется в нескольких вариантах, соответствующих определенным видам патологических воздействий, которым может подвергаться плод или новорожденный.

В связи с высокой социальной и медицинской значимостью родительского алкоголизма и наркомании как наиболее распространенного патогенетического фактора задержки умственного развития и других видов патологии высшей нервной деятельности у детей, при оценке потенциальных НП целесообразно использовать модели этих видов патологии.

Моделируется ряд форм перинатальной алкоголизации: в течение беременности, либо в период кормления потомства, либо в оба эти периода; специально исследуется также влияние алкоголизации самцов до зачатия. Эксперименты во всех случаях проводятся на крысах. Наиболее часто применяемой при оценке эффекта НП является пренатальная алкоголизация.

Пренатальная алкоголизация. Согласно методике, разработанной в НИИ Фармакологии им. В.В. Закусова РАМН С.С. Трофимовым и Н.М. Смольниковой, пренатальная алкоголизация самок осуществляется с первого дня беременности (определяемого по моменту появления сперматозоидов во влагалищном мазке) путем введения через желудочный зонд 25% этанола в дозе 4000 мг/кг в течение всей беременности (21 день) [23, 25]. Лечение потомства предполагаемым НП (или физиологическим раствором — для группы активного контроля) на модели пренатальной алкоголизации и при всех описываемых далее видах перинатальной патологии, за исключением модели постнатального влияния ингибитора белкового синтеза и модели хронической внутриутробной гемической гипоксии, осуществляется в интервале между 8-м и 20-м днем постнатальной жизни (критический период для синтеза ДНК, РНК; глутамата, ГАМК); препарат вводится подкожно в дозах, аналогичных таковым для взрослых животных.

Пренатальное воздействие бензодиазепинов и барбитуратов моделируется введением феназепам (10 мг/кг, внутрь) и фенobarбитала (30 мг/кг, внутрь) соответственно [26].

Постнатальное угнетение белкового синтеза моделирует ситуацию, имеющую место при воздействии антибиотиков, например, левомитицина, применяемого для лечения новорожденного или кормящей матери. Ингибитор белкового синтеза циклогексимид вводится крысенку в период между 7-м и 14-м днями его жизни в дозе 0,6 мг/кг (подкожно). Такое воздействие на мозг новорожденного в критический период его раннего постнатального развития вызывает отдаленные нарушения когнитивных функций; введение ноотропов, проводимое в интервале между 8-м и 14-м днями раннего постнатального периода, ослабляет выраженность этих нарушений.

Гипоксия является распространенной причиной перинатального повреждения потомства. Значимость этой модели определяется тем обстоятельством, что кислородная недостаточность возникает при широком спектре состояний во время беременности, родов и в постнатальном периоде. Наиболее часто используемой формой модельной патологии является пренатальная гипобарическая дыхательная гипоксия и внутриутробная гемическая гипоксия.

Пренатальная гипобарическая гипоксия моделируется «подъемом» крысы на 15-й день беременности в барокамере. Разрежение, соответствующее высоте 5000 м, достигается со скоростью 500 м/мин, после чего эта степень разреженности воздуха сохраняется 15 мин. Затем с той же скоростью осуществляется подъем до высоты 8500 м. При этом разрежении крысу выдерживают 120 мин, после чего осуществляют «спуск» со скоростью 3000 м/мин. Введение предполагаемого НП, как и в случае перинатальной алкоголизации, осуществляется между 8-м и 20-м днем постнатальной жизни [24].

Хроническая внутриутробная гемическая гипоксия. Нитрит натрия в дозе 40 мг/кг (внутрибрюшинно) вводится крысе в период между 10-м и 19-м днями беременности. Предполагаемый корректор вводится с 12-го по 19-й день беременности.

Независимо от характера повреждающего воздействия, оценка состояния потомства производится по одной и той же схеме и включает следующие параметры. В 2-3-х недельном возрасте регистрируются показатели физического развития крысят, становления простых сенсомоторных реакций. В 1-месячном возрасте изучают поведение крысят в открытом поле, исследовательскую реакцию и ее угашение в приборе OPTOVARIMEX, в 2-месячном — адаптивную реакцию избавления из погруженного в воду цилиндра; у части животных в этом возрасте оценивали состояние рабочей памяти по параметрам оптимальности исследовательского поведения в крестообразном лабиринте; в 3-месячном возрасте исследовали обучаемость и память в тесте УРПИ или УРАИ. У части животных в этом возрасте оценивали способность к выработке условного рефлекса с позитивным подкреплением, используя Т-образный лабиринт с пищевым подкреплением. Поскольку, наряду с когнитивными нарушениями, у потомства, подвергшегося перинатальным повреждающим воздействиям, могут возникать изменения в состоянии эмоционального контроля, целесообразно исследовать эмоциональный статус этих животных, протестировать их на моделях приподнятого крестообразного лабиринта и конфликтного поведения.

4.5. Моделирование болезни Альцгеймера

В настоящее время разработаны несколько подходов к воспроизведению у животных состояния, моделирующего болезни Альцгеймера (БА): создание трансгенных животных, исследование на старых животных и имитация нарушений, характерных для спорадической БА.

4.5.1. Трансгенные животные как модель развития пресенильной БА

Создание трансгенных животных позволяет моделировать молекулярные процессы развития БА в течение всей жизни организма. После открытия генов, обуславливающих развитие наследственной БА, эта модель получила широкое распространение. Ее основным преимуществом является то, что при введении животному человеческих генов, отвечающих за развитие наследственной формы БА (генов APP и пресенилина, например, у мышей линии APP^{swe}/PS1) [41], у животных развиваются патогенные процессы, сходные с таковыми при БА у человека (образование амилоидных бляшек, оксидативный стресс, нарушение холинергической передачи, гибель нейронов). Это позволяет предполагать, что процессы, проходящие в ЦНС у таких модельных животных, сходны с таковыми при развитии БА у человека.

Недостатком модели является то, что она отражает только процесс развития наследственной формы БА, связанной с активностью определенных генов. При этом причины, вызывающие спорадическую форму БА, в таких моделях не учитываются.

4.5.2. Изучение памяти при естественном старении

Одной из причин развития спорадической БА является старение, поэтому моделью изучения БА являются старые животные. При исследовании старых кошек, собак, овец и приматов было обнаружено наличие таких характерных признаков БА, как амилоидные бляшки и микрофибриллы, а у более распространенных лабораторных животных, грызунов было обнаружено нарушение холинергической системы мозга и связанные с этим когнитивные нарушения.

Память старых индивидуумов характеризуется ухудшением процессов запоминания и сохранения информации на текущие события и извлечения памятного следа, а также ускорением забывания новой информации. Экспериментальные исследования по выявлению мнестических дефицитов целесообразно проводить на мышах в возрасте 14–19 мес (иногда нарушения возникают в 8-месячном возрасте) и на крысах 16–22–24-месячного возраста (иногда нарушения выявляются в 12-месячном возрасте). Для выявления нарушения обучения и памяти у старых животных предпочтительнее использовать методики рефлексов пассивного избегания, описанные выше, и тесты, выявляющие неврологические дефициты. Исследуемые вещества необходимо вводить хронически (курсовое введение не менее 2-х недель) [43].

4.5.3. Изучение поведения и памяти у мышей с ускоренным старением

Более удобной моделью, чем естественное старение, являются мыши линии SAMP8, SAMP10 и др. (senescence-accelerated mouse prone 8, prone 10), у которых процессы старения происходят быстрее, чем у мышей других линий. Было показано, что для этих мышей характерно нарушение энергетического метаболизма, изменение профиля синтеза многих генов и нарушение процессов передачи сигналов между нейронами [39]. Исследования на этих животных позволяют определить процессы, способные привести к развитию спорадической формы болезни. Животные с генетически детерминированным ускоренным старением в последние годы начали использоваться для тестирования нейропротективных препаратов [9].

4.5.4. Нарушение памяти в прогериятрических моделях

В прогериятрических моделях используют взрослых животных, у которых путем определенных воздействий (длительное введение алкоголя или холестерина, диета без витамина E, облучение лучами Рентгена и др.) моделируется ситуация ускоренного старения мозга.

Наиболее удобными являются модели нарушения памяти после потребления животными (крысы, мыши) пищи, содержащей 2% холестерина в течение 2–3-х месяцев, а также после длительной алкоголизации. Этанол вводят половозрелым мышам с 3-месячного возраста в течение 20–36 недель с питьевой водой (в виде 15% раствора). Среднесуточное потребление этанола одной мышью составляет 0,58–0,63 мл/сутки в пересчете на абсолютный спирт. Нарушения памяти выявляются в моделях пассивного и активного избегания и в тестах оценки неврологического дефицита. Следует использовать курсовое применение исследуемого вещества (не менее 2–4 недели).

4.5.5. Имитация нарушений, характерных для БА

Существуют два основных подхода к имитации нарушений, характерных для спорадической БА: хирургическое вмешательство, имитирующее выключение определенных областей мозга, и введение химических веществ, воссоздающих определенные биохимические нарушения.

К хирургическим моделям болезни Альцгеймера относят нанесение разрезов в области гиппокампа и гиппокамп-септальных связей, префронтальной коры, в области базальных ядер, обонятельной луковицы. Инъекционные модели БА подразумевают либо введение токсичных веществ, наличие которых характерно для БА, либо введение веществ, имитирующих нарушения, характерные для БА, вызывающих гибель холинерги-

ческих нейронов (холинотоксин АF-64А, b-амилоид 25-35), либо блокаду холинергических нейронов, например, скополамином.

Эти модели относительно просты и удобны, поскольку позволяют достаточно быстро сымитировать определенное патогенное состояние у получавшего ЛС животного. Главным недостатком данных моделей является то, что они неполноценно отражают реальную картину заболевания. В отличие от БА, когда происходит медленное развитие комплекса взаимосвязанных процессов, в данном случае развитие патогенных процессов происходит резко и быстро и, что наиболее существенно, воспроизводится один компонент патологии, характерной для БА.

В настоящее время такие модели могут быть актуальны на начальных этапах, как предварительные. Они позволяют оценить перспективность дальнейшего изучения потенциального препарата на других, более адекватных моделях.

4.5.5.1. Модель нейродегенеративной патологии при БА с использованием бульбэктомии

Одной из хирургических моделей БА является использование животных с предварительно удаленными обонятельными луковицами. У этих животных регистрируются поведенческие, морфологические и биохимические признаки, сходные с БА. Это проявляется в ухудшении когнитивных функций, гибели нейронов в структурах, ответственных за формирование, хранение и воспроизведение памяти, на фоне повышения уровня мозгового бета-амилоида и нарушения иммунного статуса. Эта модель воспроизводит также дефицит холинергической системы, который является одним из ведущих патогенетических звеньев, ответственных за нарушения памяти при БА [2]. В эксперименте используют мышей линии NMRI, которые были получены из колонии (Charles Rivers Laboratories, Wilmington, MA, USA) и находятся в условиях барьерного контроля в специализированном виварии (Пушино, ФИБХ). У животных, находящихся под наркозом, проводят двухстороннее удаление обонятельных луковиц путем их аспирации через трепанационное отверстие в черепе животных, находящихся под наркозом. Ложнооперированные (ЛО) животные подвергались аналогичной процедуре, но без удаления луковиц. Через 4 недели после операции животным вводят тестируемые вещества по следующей схеме: две недели до начала обучения — 1 раз в день, далее в течение недели в ходе обучения — за 1 ч до начала сеанса и далее — за 1 ч перед тестированием памяти. Через 6 недель после операции всех животных тестируют на способность к обучению с использованием водного лабиринта Морриса, УРПИ, УРАИ и др. методов, позволяющих оценить поведение и состояние животных.

4.5.5.2. Методика моделирования холинергического дефицита у крыс, вызванного скополамином

Учитывая тот факт, что важным патогенетическим фактором болезни Альцгеймера является дефицит холинергической синаптической передачи, в качестве одного из методов моделирования когнитивной патологии, наблюдающейся при этом заболевании, применяется хроническое введение скополамина [17]. Эксперименты выполняются на крысах, случайным образом разделенных на 3 группы. Крысам группы I в течение 20 дней внутрибрюшинно (в/б) ежедневно вводится 0,9% раствор NaCl, крысам II и III групп в течение 20 дней вводится скополамин в дозе 1 мг/кг/день, в/б. С 21-го по 30-й день крысам группы I (пассивный контроль) и группы II (активный контроль) вводится раствор NaCl, а крысам получающей ЛС группы III — тестируемый НП. Через 24 ч после последнего введения 0,9% раствора NaCl или НП проводится тестирование животных с использованием методов, позволяющих оценить обучение и память. Например, проводится выработка УРПИ с тестированием сохранения памятного следа через 24 ч и 30 сут после обучения УРПИ и/или УРАИ, при этом каждому животному дают 20 предъявлений в день в течение 5 дней.

4.5.5.3. Модель БА с введением амилоидного пептида 25–35 (A β 25–35) в ядра Мейнерта

Известно, что основным компонентом сенильных бляшек при БА является амилоид (1–42). Его нейротоксические эффекты воспроизводятся гидрофобным С-терминальным фрагментом, β -амилоидом 25–35 (A β 25–35). Показано, что введение A β 25–35 в базальные гиганто-клеточные ядра Мейнерта вызывает распространенные дегенеративные изменения нейронов во фронтальной коре и гиппокампе, подобные тем, которые наблюдаются при деменции Альцгеймеровского типа [32] и проявляются в различных формах когнитивных дефицитов. Электрофизиологическим эквивалентом этих нарушений является вызываемое β -амилоидом 25–35 угнетение длительной гиппокампальной потенциации.

Крысам самцам после предварительной наркотизации (хлоралгидрат, 200 мг/кг, в/б) с помощью стереотаксиса в базальные гиганто-клеточные ядра Мейнерта по координатам AP – 1,4; L – 2,7 вводят физиологический раствор или β -амилоид 25–35 в дозе 2 мг/кг (исследуемая группа). После 15-дневного перерыва крысам в течение 7 дней вводят соответственно физиологический раствор или тестируемый препарат. Затем крыс тестируют на различных моделях, позволяющих оценить способность к обучению, память, ориентировочно-исследовательское поведение, уровень тревожности.

4.5.5.4. Модель введения диабетогенного токсина стрептозоцина

Сравнительно недавно были разработаны принципиально новые инъекционные модели БА, основанные на введении диабетогенного токсина стрептозоцина (N-(метилнитрозокарбомоил)- α -D-глюкозамина).

В литературе описано два типа воздействия стрептозоцина – системное введение и введение в желудочки мозга. В первом случае действие стрептозоцина на клетки мозга не является прямым – токсин не проникает через ГЭБ. Снижение когнитивных способностей, наблюдаемое при системном введении стрептозоцина (200 мг/кг, в/б), может быть опосредовано влиянием на ткань мозга высокого уровня глюкозы, обусловленного деструктивным действием токсина на β -клетки поджелудочной железы.

Более корректную модель БА удалось воссоздать при внутрижелудочковом введении стрептозоцина. В этом случае наблюдается прямое действие препарата на нейроны. Известно, что данное вещество воздействует на клетки, обладающие рецептором к глюкозе Glut-2 и найденные в нейронах крысиного и человеческого мозга. При воздействии на клетку происходит нарушение сигнального пути инсулина и инсулин-подобных факторов роста. Также происходит нарушение метаболизма глюкозы, снижение высвобождения глутамата и развитие оксидативного стресса [33]. Крысам за 7 дней до тестирования поведения и памяти производят двустороннее введение в боковые желудочки мозга стрептозоцина в дозе 3 мг/кг. Введение стрептозоцина проводится на стереотаксическом аппарате после предварительной наркотизации (хлоралгидрат в дозе 200 мг/кг, в/б) по координатам AP – 1,5; L – 2; H – 3,5. НП вводят животным ежедневно в течение 7–14 дней после операции.

5. Анализ механизма действия потенциального ноотропа

При представлении документации по всякому фармакологическому препарату необходимо располагать данными о механизме его действия. В отношении ноотропов данные о механизме действия значительно менее исчерпывающие, чем для других групп нейротропных веществ. Известно, что механизм их действия характеризуется многокомпонентностью.

На уровне общего метаболизма эффект НП характеризуется повышением скорости оборота информационных макромолекул и активацией синтеза фосфолипидов за счет угнетения нуклеотидфосфатазы, активации аденилаткиназы и фосфорилазы A $_2$. Для многих НП показана способность предотвращать активацию перекисного окисления липидов, вызванную такими патологическими процессами, как старение, ишемия, стресс [11].

Что касается влияния НП на нейромедиаторные процессы, получены доказательства специфической роли холинергической и глутаматергической систем в реализации эффекта НП. В связи с этим при изучении нового НП может оказаться полезным изучить его влияние на число мускариновых или никотиновых рецепторов и их аффинность к соответствующим лигандам. Доказательства вовлечения глутаматергических механизмов в реализации эффекта того или иного НП могут быть получены как в исследованиях с изучением влияния данного НП на рецепторное связывание меченого глутамата, так и в электрофизиологических экспериментах. В последнем случае речь может идти как об экспериментах с внутриклеточной регистрацией активности одиночных нейронов и изучением динамики десенситизации при подведении избирательных агонистов различных подтипов NMDA и nonNMDA глутаматергических рецепторов, так и об исследованиях с изучением длительной гиппокампальной потенциации (ДГП). Последняя является глутамат-зависимым электрофизиологическим феноменом синаптической пластичности, имеющей прямое отношение к обучению и памяти. Эффект НП может оцениваться как по облегчению фоновой ДГП, так и по способности восстанавливать дефицит ДГП, обусловленный различными повреждающими воздействиями, например, пренатальной алкоголизацией [28]. Учитывая роль избыточного накопления кальция как патогенетического фактора многих патологических состояний, являющихся объектом применения ноотропов, важную информацию о механизме действия НП можно получить в электрофизиологических экспериментах с регистрацией активности потенциал-зависимых кальциевых каналов изолированных нейронов виноградной улитки [38], при изучении перекисного окисления липидов, изучении глутаматной токсичности и состояния кальциевых каналов, при исследовании противовоспалительного действия вещества.

Представление в Минздравсоцразвития России всего комплекса биохимических и электрофизиологических данных по механизму действия нового НП не является обязательным. Может быть представлен любой фрагмент, касающийся как перечисленных выше механизмов активности, так, особенно для веществ оригинальной структуры, и данные о новых аспектах действия.

6. Изучение спектра нейротропной активности потенциального ноотропа, побочных эффектов и острой токсичности

В связи с тем, что известные НП обладают, помимо основного, ноотропного эффекта, другими проявлениями действия, следует изучить более подробно спектр нейротропной активности нового препарата и получить сведения об его острой токсичности. Следует представить данные о наличии или отсутствии у изучаемого вещества седативного или активирующего, судорожного или противосудорожного, анксиолитического и миорелаксантного действия. Для выявления этих эффектов следует использовать общепринятые тесты: регистрацию поведения в открытом поле и в различных актометрах, тест залезания на сетку, антагонизм с судорожными веществами (коразол, тиосемикарбазид, бикуккуллин и др.) и максимальным электрошоком, методики конфликтной ситуации и приподнятого крестообразного лабиринта; для изучения миорелаксантного действия используются тесты вращающегося стержня, рефлекса подтягивания на перекладине, удерживания на перевернутой сетчатой платформе, тест бокового положения. Исследование психотропных эффектов проводится в диапазоне терапевтических доз, оказывающих ноотропный эффект. Изучение побочных эффектов следует осуществлять в более широком диапазоне доз: от средних терапевтических до субтоксических, использовать не менее двух видов животных и путь введения, соответствующий предполагаемому клиническому. Информация о побочных эффектах дополняется результатами, полученными в разделе «Изучение общей фармакологической активности».

Острая токсичность (регистрация гибели животных через 24 ч после введения вещества) изучается на двух видах животных, на которых проводилось исследование ноотропной активности, при тех же путях введения; рассчитывается ЛД₅₀. Данные по по-

бочным эффектам, токсичности и терапевтический индекс нового изучаемого препарата сопоставляются с результатами, полученными для эталонных препаратов.

7. Изучение общей фармакологической активности потенциального ноотропа

Наблюдение за состоянием животного осуществляется на мышах и крысах при введении препарата в широком диапазоне доз: от не оказывающих заметного влияния на общее состояние, до вызывающих гибель. При этом определяется повышение или снижение общей возбудимости, увеличение или снижение двигательной активности, наличие тремора, судорожных подергиваний, судорог, гиперкинезов, изменение цвета кожных покровов, взъерошивание шерсти, катаlepsия, птоз, стереотипия, груминг и т.д. Изучается пиннеальный, болевой и роговичный рефлекс, влияние на температуру тела, потребление воды и пищи. Следует изучить влияние препарата на эффекты соответствующих нейромедиаторных анализаторов, например, на эффекты ареколина, треморина, 5-окситриптофана, фенамина, резерпина, дофамина, апоморфина, бикуккулина, флюмазенила, дизоцилина и других анализаторов.

Влияние на ССС, дыхание и на периферические отделы нервной системы изучается на интактных или наркотизированных кошках, кроликах или крысах по влиянию на уровень кровяного давления, ритм сердечной деятельности (желательно и других показателей работы сердца), дыхание, а также на реакции, вызванные введением нейромедиаторов, например, адреналина, норадреналина, ацетилхолина, серотонина и в ответ на раздражение периферического отрезка блуждающего нерва и др.

Заключение

В заключении резюмируются данные, характеризующие всю совокупность ноотропных свойств представляемого соединения, а также сопутствующих нейротропных эффектов. Описываются выявленное побочное действие. Анализируются основные преимущества нового препарата перед известными средствами сходной направленности действия.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Бобкова Н.В., Нестерова И.В., Нестеров В.В. Состояние холинергических структур переднего мозга у бульбэктомированных мышей. Бюлл. эксперим. биол. и медицины, 2001. — Т. 131. — № 5. — С. 507–511.
2. Воронина Т. А. Экспериментальная психофармакология ноотропов. Фармакология ноотропов (ред. Вальдман А. В., Воронина Т. А.). — М.: Медицина, 1989. — С. 91–98.
3. Воронина Т.А. Перспективы применения препаратов с ноотропным, нейропротективным действием. В сб. «Фундаментальные проблемы реаниматологии (Избранные лекции и обзоры)». — Том IV. — М., 2005. — С. 84–113.
4. Воронина Т.А., Гарибова Т. Л., Хромова И.В. Диссоциация антиамнестического и противогипоксического эффектов у ноотропных и противогипоксических препаратов. Фармакол. и токсикол., 1987. — № 3. — С. 21–23.
5. Воронина Т. А. Современные проблемы фармакологии ноотропов, состояние и перспективы. Фармакол. и токсикол., 1991. — № 2. — 6–9.
6. Воронина Т.А., Середенин С.Б., Ноотропные и нейропротекторные средства Экспер и клин. фармакология, 2007. — Т. 70. — №4. — С. 44–58.
7. Гарибова Т.Л., Сопыев Ж. А. Проблемы толерантности и лекарственной зависимости к препаратам с ноотропным типом действия. Фармакология ноотропов (ред. Вальдман А.В., Воронина Т. А.). — М.: Медицина, 1989. — С. 44–53.

8. Гарибова Т.Л., Галаева И.П., Воронина Т.А., Крайнева В.А., Капица И.Г., Кириченко С.В., Макаренко А.Н., Мирзоян Г.Р., Кузнецова Е.А. Эффект нооглотила у крыс с интрацеребральной постравматической гематомой (геморрагическим инсультом). — Эксперим. и клин. фармакол., 2003. — Т. 66. — № 2. — С. 45–48.
9. Гарибова Т.Л., Литвинова С.А., Воронина Т.А., Григорьев В.В., Бачурин С.О. Эффект нооглотила на поведение и память мышей линии SAM (Senescence-accelerated mouse) с генетически детерминированным ускоренным старением. Эксперим. и клин. Фармакол., 2007. — Т. 70. — № 4. — С. 3–6.
10. Иноземцев А. Н., Прагина Л. Л., Фирова Ф. А. и др. Сравнительный анализ влияния ноотропных препаратов различной химической структуры на сбой реакции избегания у крыс. Эксперим. и клин. фармакол., 1995. — Т. 58. — С. 15–16.
11. Лысенко А.В., Ускова Н.И., Островская Р.У., Гудашева Т.А., Воронина Т.А. Дипептидный ноотроп ГВС-111 предотвращает накопление продуктов перекисного окисления липидов при иммобилизации. Экспер. и клинич. фармакол., 1997. — Т. 60. — № 5. — С. 15–18.
12. Макаренко А.Н., Косицин Н.С., Пасикова Н.В. (2002). Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных. Ж. «Высш. нервн. деят.» — Т. 52. — № 6. — С. 765–768.
13. Назаренко И.В., Каменский А.А., Гудашева Т.А., Волков А.В. Постренимационное восстановление функций ЦНС при системном введении новых пептидных аналогов пираретама. Бюлл. эксп. биол. и мед. — 1998. — Т. 123. — № 1. — С. 26–28.
14. Островская Р.У. К механизму антигипоксического эффекта делакина. Бюлл. эксп. биол. мед., 1982. — Т. 93. — № 2. — С. 42–44.
15. Островская Р.У., Клейменова Н.Н., Камышева В.А., Молодавкин Г.М., Яворский А.Н., Бойко С.С. Влияние натрия оксидбутирата на функциональные, биохимические и морфологические показатели физической работоспособности. В кн. «Фармакологическая регуляция процессов утомления» — ред. Ю.Г. Бобков. — М., 1982. С. 39–55.
16. Островская Р.У., Гудашева Т.А. Выявление активности ноотропов по показателю острого угашения ориентировочной реакции. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1991. — Т. 118. — № 5. — С. 644–647.
17. Островская Р.У., Фирова Ф.А., Трофимов и соавт. Последствие амнестического эффекта скополамина у крыс и его коррекция пираретамом. Бюлл. эксп. биол. и мед. 1995, Т. 119, № 4, С. 372–374.
18. Поварова О.В., Гарибова Т.Л., Каленикова Е.И., Галаева И.П., Крайнева В.А., Медведев О.С., Воронина Т.А. Влияние фенил-*t*-бутилнитрона (РВN), мексидола и нооглотила на зону ишемического поражения головного мозга и память у крыс с окклюзией средней мозговой артерии. Экспериментальная и клиническая фармакология., 2004. — Т. 1. — С. 3–6.
19. Романова Г.А., Трофимов С.С. Ускорение оксидбутиратом натрия и пираретамом компенсаторно-восстановительных процессов после повреждения коры головного мозга. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1986. — Т. 102. — С. 661–663.
20. Романова Г.А., Барсков И. В., Островская Р. У., Гудашева Т. А., Викторов И.В. Поведенческие и морфологические нарушения, вызванные двухсторонним фотоиндуцированным тромбозом мозговых сосудов лобной коры мозга крыс. Патологиз. и эксперим. терапия, 1998. — Т. 2. — С. 8–10.
21. Рощина Л.Ф., Островская Р.У. Влияние пираретама на устойчивость организма к гипоксии. Фармакол. токсикол., 1981. — № 2. — 210–212.
22. Топчан А.В., Мирзоян З.С., Баласанян М.Г. Локальная ишемия мозга крыс, вызванная перевязкой средней мозговой артерии. Эксперим. и клин. фармакол., 1996. — Т. 59. — №5. — С. 62–64.
23. Трофимов С.С., Островская Р.У., Смольникова Н.М. и соавт. Поведенческий и биохимический анализ терапевтического эффекта натрия оксидбутирата при алкогольной энцефалопатии у потомства. Фармакол. и токсикол., 1991. — Т. 54. — № 1. — С. 62–64.
24. Трофимов С.С., Островская Р.У., Кравченко Е.В., Смольникова Н.М., Бондаренко Н.А., Кутепова О.А., Немова Е.П., Воронина Т.А. Нарушения поведения крыс, подвергшихся внутриутробной гипоксии, и их коррекция постнатальным воздействием пираретама. Бюлл. эксп. биол. и мед., 1993. — Т. 113. — № 1. — С. 43–45.
25. Трофимов С.С., Островская Р.У., Смольникова Н.М., Немова Е.П., Воронина Т.А. Значение перинатальной алкоголизации и ее отмены в развитии отдаленных когнитивных нарушений у крыс. Эксперим. и Клин. Фармакол., 1996. — Т. 59. — № 2. — С. 44–46.
26. Чобанов Н.Г., Воронина Т.А., Любимов Б.И. Влияние феназепема и фенобарбитала, вводимых в пренатальном и раннем постнатальном периодах, на поведенческие реакции потомства крыс. Эксперим. и клин. фармакол., 1993. — Т. 56. — № 6. — С. 6–8.

27. Ader R., Weijnen J.A., Moleman P. Retention of a passive avoidance response as a function of the intensity and duration of electric shock. *Psychol. Sc.* 1972. — V. 26, P. 125–128.
Chen, M., The Alzheimer's plaques, tangles and memory deficits may have a common origin. Part III: animal model. *Front Biosci.*, 1998. — V. 3, P. 447–451.
28. Chepkova A.N., Doreulee №.V., Trofimov S.S., Gudasheva T.A., Ostrovskaya R.U., Skrebitsky V.G. Nootropic compound L-pyroglutamyl-D-alanine-amide restores hippocampal long-term potentiation impaired by exposure to ethanol in rats. *Neuroscience Letters.*, 1995. — V. 188, P. 163–166.
29. Giurgea.C. and Moyersone F. Differential pharmacological reactivity of three types of cortical evoked potentials. *Arch. Int. Pharmacodyn.* 1972, V. 188, P. 401–404.
30. Grafstein B. Organisation of callosal connections in suprasylvian gyrus of cat. *J. Neurophysiol.*, 1959, V. 22, 504–515.
31. Hunter A.J., Green A.R., Cross A.J. Animal models of acute ischemic stroke: can they predict clinically successful neuroprotective drugs? *TIPS.* 1995, V. 16, Apr., P. 123–128.
32. Liao Y.F., Wang B.J., Hsu W.M., Lee H., Liao C.Y. et. al. Unnatural amino acid-substituted (hydroxyethyl)urea peptidomimetics inhibit gamma-secretase and promote the neuronal differentiation of neuroblastoma cells. *Mol. Pharmacol.* 2007, V. 71, P. 588–601.
33. Lester-Coll №., Rivera E.J., Soscia S.J., Doiron K., Wands J.R., de la Monte S.M. Intracerebral streptozotocin model of type 3 diabetes: relevance to sporadic Alzheimer's disease. *J. Alzheimers Dis.* 2006, V. 9, P. 13–33.
34. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci Methods.* 1984, V. 11, P. 47–60.
35. Ostrovskaya R.U., Gudasheva T.A., Trofimov S.S., Kravchenko E.V., Firova F.A., Molodavkin G.M., Voronina T.A., Seredenin S.B. GVS-111 an acyl-prolyl-containing dipeptide with nootropic properties. In: *Biological Basis of Individual Sensitivity to Psychotropic drugs.* Graffham Press Ltd. Ednburgh, UK. Eds S.B.Seredenin, V.Longo, G. Gaviraghi. 1994, P. 79–91.
36. Ostrovskaya R.U., Romanova G.A., Trofimov S.S., Gudasheva T.A., Voronina T.A., Halikas J.A., Seredenin S.B. The novel substituted acylproline-containing dipeptide, GVS-111, promotes the restoration of learning and memory impaired by bilateral frontal lobectomy in rats. *Behav. Pharmacol.* 1997, V. 8, P. 261–268.
37. Platel A., Jalfre M., Pawelec C., Roux C., Porsolt R.D. Habituation of extrapolatory activity in mice: effects of combinations of piracetam and choline on memory processes. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1984; V. 21, P. 209–212.
38. Solnzeva E I., Bukanova J.V., Ostrovskaya R.U., Gudasheva T.A., Voronina T.A. and V.G. Skrebitsky V.G. The effects of Piracetam and its novel peptide analogue GVS-111 on neuronal voltage-gated calcium and potassium channels. *Gen. Pharmac.* 1997, V. 29, № 1, P. 85–89.
39. Takeda T, Hosokawa M, Higuchi K. Senescence-accelerated mouse (SAM): A novel murine model of accelerated senescence. *J Am Geriatr Soc.* 1991, V. 39, P. 911–919.
40. Tamura A., Graham D. J., Mc Culloch J., Teasdale G.M. Focal cerebral ischemia in the rat. 1. Description of technique and early neuropathological consequences following middle cerebral artery occlusion. *J. Cerebr. Blood Flow Metab.* 1981, V. 1, P. 53–60.
41. Van Dam D., De Deyn P.P. Drug discovery in dementia: the role of rodent models. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006, V. 5, P. 956–970.
42. Vogel H.G. *Drug discovery and evaluation: pharmacological assays.* Springer-Verlag, Berlin Heidelberg New York, 2008.
43. Voronina T.A., Kutepova O.A. Experimentally established geropsychotropic properties of 3-hydroxypyridine antioxidant. *Drug Dev. Res.* 1988, V. 14, P. 353–358.
44. Voronina T.A., Seredenin S.B. Analysis of the mechanism of psychotropic action of 3-hydroxypyridine derivative. *Ann. Ist. Super. Sanita.* 1988, V. 24, P. 461–466.
45. Voronina T.A. Present-day problems in experimental psychopharmacology of nootropic drugs. *Sov. Med. Rev. Section G., Neuropharmacology* Harwood Academic Publishers GmbH, United Kingdom. 1992, V. 2, P. 51–108.
46. Voronina T. A. Nootropic drugs in Alzheimer disease treatment. *New Pharmacological Strategies. Alzheimer disease: therapeutic strategies.* Eds Giacobini E., Becker R. — Birkhauser. — Boston. 1994, P. 265–269.

ГЛАВА 18

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ АДДИКТИВНОГО ПОТЕНЦИАЛА ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. Э.Э. Звартау; д. м. н. А.Ю. Беспалов;
к. б. н. О.А. Драволина; к. м. н. Н.А. Паткина*

Введение

Под аддиктивным потенциалом фармакологических средств понимают их способность вызывать патологическое пристрастие. Анализ возможного аддиктивного потенциала является одним из неотъемлемых элементов оценки безопасности новых фармакотерапевтических средств.

Вопросам экспериментального доклинического изучения аддиктивного потенциала фармакологических средств традиционно уделяют много внимания из-за масштабности и тяжести медико-социальных проблем, порождаемых наркотоксиманиями. Однако в последние годы значение своевременного изучения аддиктивного потенциала возросло в связи с бурным развитием нейробиофармакологии и формированием новых подходов к терапии патологии ЦНС, основанных на фармакогенном влиянии на различные нейротрансмиттерные и нейромодуляторные системы. Новизна фармакотерапевтических подходов определяет непредсказуемость влияния новых препаратов на системы мозга, ответственные за формирование патологического пристрастия, и требует адекватного исследования аддиктивного потенциала.

1. Общие положения

1.1. Понятия и термины

Теоретической основой доклинической оценки аддиктивного потенциала фармакологических средств является физиологическая концепция патогенеза наркотоксикоманий, согласно которой нейробиологическая природа аддиктивного эффекта фармакологических средств связана с их влиянием на мозговые системы «награды» и «наказания» [1]. Физиологической основой аддиктивного потенциала фармакологического агента является наличие у него подкрепляющих свойств. Под подкреплением понимают процесс, при котором вероятность той или иной поведенческой реакции (например, поведение поиска наркотика) увеличивается благодаря следующим за ней событиям. Стимул (в том числе фармакологическое вещество), который увеличивает вероятность поведения, после которого он следует, называется подкрепляющим стимулом. Предъявление положительно-подкрепляющих стимулов увеличивает вероятность поведения, за которым они следуют. Вероятность конкретной поведенческой реакции также увеличивается, если она ведет к устранению или предупреждению отрицательно-подкрепляющих стимулов. Фармакологические вещества могут обладать как положительно, так и отрицательно подкрепляющими свойствами. В последнем случае речь идет о веществах, способных вызывать зависимость, прекращение введения которых выражается в синдроме отмены. Аверсивные свойства синдрома отмены лучше всего купируются введением самого вещества. Тем не менее, хотя развитие как физической зависимости, так и толерантности присутствует в

диагностических критериях лекарственной зависимости, выраженность аддиктивного потенциала определяется прежде всего положительно-подкрепляющими свойствами, выявлению которых и посвящены настоящие методические рекомендации.

1.2. Рекомендуемые тесты

На основе экспериментальных исследований выявляют фармакологические свойства веществ, рассматриваемые как специфические предикторы способности психоактивных соединений вызывать пристрастие:

1. Наличие у вещества первично-подкрепляющих свойств. Эти свойства выявляются в исследованиях по выработке и поддержанию поведенческой реакции внутривенного самовведения (РВС), при которой безусловным подкрепляющим раздражителем является исследуемое вещество [2, 10].

2. Наличие у вещества дифференцировочных интероцептивных стимульных свойств, сходных с таковыми известных веществ с высоким аддиктивным потенциалом. Эти свойства выявляются в исследованиях по лекарственной дифференцировке [2, 8].

3. Наличие у вещества способности вызывать активацию системы положительного подкрепления (системы «награды») [6]. Данное свойство выявляют по изменению показателей реакции электрической самостимуляции (РСС) мозга [4, 7, 9,].

1.3. Цели и задачи исследования. Основные этапы исследования

Целью исследования является прогнозирование потенциала пристрастия (аддиктивный потенциал) данного соединения. Задачами исследования являются: а) выявление вышеуказанных специфических предикторов; б) сопоставление активности и эффективности главного (терапевтического) эффекта исследуемого вещества с его активностью и эффективностью в тестах оценки аддиктивного потенциала; в) заключение о наркологической безопасности фармакологического средства.

Заключение об аддиктивном потенциале и степени наркологической безопасности фармакологического средства может быть дано на основе комплексного исследования с использованием ряда предлагаемых экспериментальных тестов и с учетом всей имеющейся дополнительной информации, определяющей аддиктивный потенциал фармакологического вещества.

1.4. Условия проведения исследования

Исследования должны проводиться в стандартных, контролируемых лабораторных условиях с соблюдением всех требований нормативных документов, регламентирующих такой тип работ, включая правила содержания и использования лабораторных животных.

1.5. Характеристика фармакологического вещества

Адекватное планирование исследований требует наличия, как минимум, следующей информации: а) рецепторные системы, с которыми взаимодействует данное вещество; б) фармакокинетические свойства (период полувыведения, проникновение через гематоэнцефалический барьер, биодоступность при основных путях введения); в) предполагаемое терапевтическое применение. Планированию экспериментов также способствует знание эффектов вещества, которые были зафиксированы в предыдущих исследованиях (например, информация о влиянии на различные нейрохимические системы, наличие психотропной активности).

1.6. Растворители и разбавители

Инструментальное поведение, лежащее в основе методов оценки аддиктивного потенциала, требует использования максимально инертных растворителей, не обладающих местным раздражающим или системным угнетающим действием. При исследовании

водонерастворимых веществ с помощью метода лекарственной дифференцировки или реакции самостимуляции допустимо использование липидных взвесей и суспензий (например, на основе 1% водного раствора Твин 80), что, однако, требует забора образцов крови для проведения анализа достигнутой концентрации вещества в крови и сравнения ее с уровнем, необходимым для проявления терапевтических эффектов. Нерастворимость вещества ограничивает возможность использования метода внутривенного самовведения, который в таком случае может быть заменен на исследование действия вещества на реакцию самостимуляции.

1.7. Дозы, пути и режимы введения

Каждое вещество должно быть исследовано в диапазоне доз, достаточном для обоснованного заключения о наличии или отсутствии у него аддиктивного потенциала. Нижняя граница диапазона исследуемых доз определяется двумя факторами: а) соотношением сродства вещества к рецептору-мишени и достигаемой концентрацией свободного (не связанного с белками) вещества во внеклеточном пространстве; б) типом взаимодействия вещества и рецептора-мишени. Для веществ-агонистов исследуемый диапазон доз обычно значительно шире, чем для антагонистов. Верхняя граница диапазона доз определяется по достижению уровня, при котором вещество начинает вызывать неспецифические изменения в поведении (например, снижение частоты оперантной реакции при лекарственной дифференцировке). Для реакции самовведения диапазон исследуемых доз определяется периодом полувыведения вещества и размером разовой дозы (т.е. дозой, соответствующей единичной инъекции).

Для методов лекарственной дифференцировки или реакции самостимуляции допустимы практически любые пути и режимы введения. Для реакции самовведения наиболее предпочтительным является внутривенный путь введения.

1.8. Продолжительность исследования

Исследования с использованием методов лекарственной дифференцировки или реакции самостимуляции подразумевают однократные введения исследуемых веществ. Однако ввиду того, что различные дозы веществ исследуют с помощью одних и тех же животных, а также необходимости ограничивать частоту повторных тестирований, длительность таких экспериментов достигает 4–6 недель. Для реакции внутривенного самовведения у мышей длительность эксперимента не превышает 1 неделю, в то время как исследование реакции самовведения у крыс требует не менее 3 месяцев.

1.9. Экспериментальные животные

Рекомендуемые исследования могут быть выполнены как на мышах, так и на крысах. Наличие дополнительной информации об исследуемом веществе может помочь в выборе вида, линии и пола животных (например, отсутствие рецептора-мишени у мышей или наличие дополнительных изоформ рецепторов-мишеней у крыс).

1.10. Рекомендации по выбору препарата сравнения

Выбор препаратов сравнения является важным этапом построения исследовательской программы для прогнозирования аддиктивного потенциала нового ЛС. Традиционно выделяют несколько основных типов аддиктивных средств (психостимуляторы, опиаты, седативные и снотворные, галлюциногены и т.д.). Наиболее информативной является близость исследуемого вещества к одному или более классам известных аддиктивных средств (химическая структура, общие рецепторы-посредники, активация одних и тех же нейроанатомических структур и проекций, одинаковые нейрохимические изменения, схожие фармакологические эффекты на системном уровне). В отсутствие данной информации за основу может быть взята область предполагаемого терапевтического применения вещества (например, для новых анальгетиков препаратами сравнения могут быть опиаты).

2. Инициация внутривенного самовведения у мышей

2.1. Цели и задачи эксперимента

Цель эксперимента — получение в режиме экспресс-тестирования данных о первично-подкрепляющих свойствах исследуемого вещества. Задачами эксперимента являются доказательство инициации РВС исследуемого вещества, выявление зависимости «разовая доза–эффект», определение параметров активности и эффективности подкрепляющего эффекта в сравнении с эталонным аддиктивным веществом.

Главное достоинство метода — быстрота получения результатов, что обусловлено использованием естественной ориентировочно-исследовательской реакции мышей (выглядывание в отверстие при помещении в затененную камеру), способствующей выработке оперантной реакции. При сочетании с инфузией раствора аддиктивного соединения исследовательская реакция не угашается, а, напротив, оживляется, так как исследуемый препарат обладает «аттрактивными» мотивационными свойствами.

2.2. Оборудование, инструменты и реактивы

Экспериментальные животные: мыши-самцы массой 18–24 г. Экспериментальная установка должна обеспечивать возможность размещения двух мышей в смежных камерах, размеры которых (например, 8 × 8 × 8 см) позволяют животным сохранять относительную свободу движений, в частности, совершать выглядывания в отверстие передней стенки камеры, не смотря на фиксацию хвоста. Отверстие диаметром 1,4 см расположено на высоте 1,4 см от пола и снабжено инфракрасным датчиком для регистрации реакции выглядывания. Фотодатчик через интерфейс связан с компьютером, который управляет работой двухшприцевого микроинъектора с шаговыми двигателями, осуществляя кратковременную инъекцию заданного объема раствора исследуемого препарата (1,6 мкл/инъекцию) в ответ на каждое выглядывание. Задняя стенка каждого бокса прорезана вертикальной щелью шириной 0,5 см. Размещение животного в боксе производят с учетом следующих требований: 1) мышь должна свободно выглядывать в отверстие на передней стенке; 2) обеспечен доступ для пункции к латеральным хвостовым венам (хвост выводят через щель на задней стенке за пределы бокса и фиксируют к горизонтальной поверхности липкой лентой); 3) исключена возможность выдергивания иглы и повреждения катетера животным во время эксперимента. По данным литературы и собственному опыту мыши сравнительно легко переносят данную форму частичной иммобилизации.

2.3. Описание метода

Протокол исследования включает исходное тестирование ориентировочно-исследовательской активности и последующую сессию инициации (выработки) РВС. Задачей исходного 10-минутного тестирования являются оценка индивидуальной ориентировочно-исследовательской реакции мышей и последующий подбор по уровню активности пар животных (уровень активности в паре должен быть по возможности близким) для сессии инициации РВС.

Как показывает опыт, выработка РВС эталонных аддиктивных веществ (морфин, кокаин, амфетамин) происходит в течение 10–20 мин, поэтому общая продолжительность сессии инициации РВС исследуемых веществ составляет 30 мин. Предварительно отобранные пары мышей помещают в экспериментальные боксы и после кратковременной адаптации в латеральные хвостовые вены обеих мышей вводят иглы, подсоединенные к инъектору через полиэтиленовые катетеры. Во время сессии выработки РВС «активная» мышь (АМ) получает инъекции исследуемого раствора после каждого выглядывания. «Контрольная» мышь (КМ) получает инъекции в ритме выглядываний АМ, вне связи с собственными выглядываниями. Таким образом, обе мыши получают одинаковое число инъекций с одинаковым распределением во времени и, соответственно, одинаковую дозу препарата, что позволяет при оценке эффекта и сравнении данных у АМ и КМ «урав-

нять» действие препаратов на двигательную и исследовательскую активность. По окончании сессии иглы извлекают и животных возвращают в общую клетку.

Заключение о положительно-подкрепляющем эффекте исследуемого соединения основывают на расхождении количества выгладываний (КВ) АМ и КМ. Если за период сессии выработки РВС КВ АМ превышает КВ КМ, то делают заключение о мотивационно-позитивном (положительно-подкрепляющем) эффекте соединения. Если КВ АМ меньше КВ ПМ, то эффект соединения расценивают как «аверсивный» («наказующий»).

2.3.1. Возможности и ограничения метода, его прогностическое значение

Метод отличается высокой чувствительностью и позволяет выявить положительно-подкрепляющие свойства не только опиатов, кокаина, амфетамина, но и таких веществ, как этанол, никотин, кофеин и даже растворители (толуол). При этом метод достаточно специфичен, так как вещества, лишённые аддиктивного потенциала (негативный контроль), не способствуют инициации РВС на этой модели. При наличии многоканальной установки метод позволяет провести полноценное исследование зависимости «доза–эффект» в течение нескольких рабочих дней. Ограничения метода связаны с невыполнимостью исследования поддержания РВС из-за невозможности проведения более 2–3 вторных венопункций.

2.3.2 Продолжительность эксперимента

Метод может быть отнесен к категории экспресс-методов. Учитывая то, что инициация РВС выявляется в течение 30-минутной экспериментальной сессии, при соответствующем техническом обеспечении (многоканальная установка) в пределах 1–2 дней может быть оценен эффект 6–8 разовых доз исследуемого вещества.

2.3.3. Рекомендации по объёму экспериментальных исследований и обработке экспериментальных данных.

Формы представления экспериментальных данных

Группы животных для оценки эффекта каждой разовой дозы (концентрации) исследуемого вещества должны содержать не менее 6–8 пар мышей. Эффект исследуемой разовой дозы вычисляют по разности КВ АМ и КМ за экспериментальную сессию. Данные представляют в форме кривых «разовая доза–эффект». Кривая зависимости «разовая доза–эффект» при инициации РВС имеет характерную для данной модели куполообразную форму с максимальным значением показателя при определенной разовой дозе(ах), характеризующей(их) наиболее активный мотивационный эффект соединений.

3. Лекарственная дифференцировка

3.1. Цели и задачи эксперимента

Целью является оценка дифференцировочных стимульных свойств исследуемого вещества. Для этого животным, предварительно обученным различать interoцептивные эффекты различных аддиктивных веществ, вводят исследуемое вещество и оценивают вероятность поведенческой реакции, характерной для введения «тренировочного» аддиктивного вещества. Основной задачей эксперимента является выявление общих дифференцировочных стимульных свойств исследуемого аддиктивного вещества и аддиктивного вещества сравнения.

3.2. Оборудование, инструменты и реактивы

Выработку и анализ лекарственной дифференцировки проводят в оперантных камерах Скиннера, оборудованных двумя педалями (или двумя отверстиями для регистрации выгладываний) и устройством автоматической подачи пищевых пеллет (или питьевой жидкости — воды или молока).

3.3. Описание метода

Изначально крыс (возможно также использование мышей), у которых было ограничено потребление пищи (или воды), обучают нажимать на каждую из двух имеющихся в оперантной камере педалей (или выглядывать в отверстия) для получения пищевых пеллет в соответствии с режимом подкрепления «фиксированное соотношение 10» (ФС 10). После выработки оперантного навыка начинают выработку дифференцировки. Перед началом ежедневной сессии животные получают инъекцию аддиктивного вещества (например, 3,2 мг/кг морфина, 10 мг/кг кокаина⁵ и т.д.) или его растворителя. Тренировочные сессии с введениями аддиктивного вещества или растворителя чередуют в случайном порядке. Во время тренировочных сессий только одна из двух педалей «активна», т.е. нажатия на нее приводят к получению подкрепления. Для каждой крысы нажатия на одну из педалей подкрепляют после инъекции растворителя, а нажатия на другую педаль — после инъекции «тренировочного» вещества. Экспериментальные сессии отличаются от тренировочных только тем, что во время этих сессий обе педали «активные», т.е. животным предоставляют возможность выбора педали для получения подкрепления. Исследуемое вещество вводят не чаще чем 2 раза в неделю перед началом экспериментальных сессий. Минимальный интервал между последовательными экспериментальными сессиями должен составлять не менее 72 ч (определяется на основании данных о фармакокинетике исследуемого вещества). Тестирование фармакологических агентов проводят только при условии соблюдения следующих критериев во время последних двух тренировочных сессий каждого типа: 1) выбор педали соответствовал инъекции; 2) процент нажатий на «правильную» педаль превышал 90% от общего количества нажатий на обе педали за сессию; 3) общая частота оперантной реакции превышает заранее оговоренный пороговый уровень (например, 0,4 нажатия в секунду).

3.3.1. Возможности и ограничения метода, его прогностическое значение

Метод лекарственной дифференцировки имеет ряд характерных особенностей. Поведение дифференцировки легко вырабатывается и остается стабильным в течение очень длительного периода времени (не менее одного года). Метод позволяет оценивать зависимость эффекта от дозы, которая практически всегда носит очень четкий характер. Стимульные свойства веществ, оцениваемые с помощью этого метода, отличаются высокой степенью специфичности, что сводит до минимума вероятность ложноположительных результатов. Основным недостатком метода является ограниченный набор «тренировочных» веществ, т.е. веществ сравнения. Иными словами, метод может быть мало пригоден для анализа интерцептивных свойств новых веществ, не похожих на уже известные. Однако на данный момент экспериментальных обоснований ограниченного прогностического значения этого метода довольно мало, что определяет его актуальность и востребованность.

3.3.2. Продолжительность эксперимента

Исследования с использованием метода лекарственной дифференцировки подразумевают однократные введения исследуемых веществ. Однако ввиду того, что различные дозы веществ исследуют на одних и тех же животных, а также необходимости ограничивать частоту повторных тестирований, длительность таких экспериментов достигает 4–6 недель (без учета времени, требуемого для выработки дифференцировки и проведения контрольных тестирований).

3.3.3. Рекомендации по объему экспериментальных исследований и обработке экспериментальных данных.

Формы представления экспериментальных данных

На основании данных, полученных во время экспериментальных сессий, рассчитывают количество нажатий на педаль, ассоциированную с введениями тренировочного

⁵ В соответствии с ФЗ от 08.01.1998 г. № 3-ФЗ (ред. от 03.12.2011) «О наркотических средствах и психотропных веществах».

аддиктивного вещества (в процентах), и частоту оперантной реакции (нажатия/сек). Частота реакции является ключевым параметром, подтверждающим корректность выбора диапазона исследуемых доз в том случае, если исследуемое вещество не обладает стимульными свойствами, близкими к таковым у тренировочного вещества. В этих случаях исследуемое вещество следует тестировать до тех пор, пока не будут достигнуты дозы, введение которых значительно снижает частоту оперантной реакции. Хотя требуемый объем исследования устанавливается индивидуально для каждого тестируемого вещества, как правило, должно быть протестировано не менее 3 доз вещества, с наивысшей дозой, превышающей минимальную не менее чем в 10 раз, с использованием как минимум шести животных.

Если после введения исследуемого вещества, животные выбирают поведенческую реакцию (нажатия на определенную педаль), соответствующую введению тренировочного вещества, как минимум в 80% случаев, делают заключение о близости interoцептивных свойств исследуемого и тренировочного веществ. В таких случаях обязателен расчет доз ЭД₅₀ для исследуемого вещества (по методу Литчфильда-Вилкоксона или с помощью пробит-анализа). Анализ зависимостей «доза–эффект» и «время–эффект» проводят с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа для повторных измерений. Полное описание полученных результатов может быть представлено как в виде таблиц, так и графиков, отражающих процент нажатий на педаль, ассоциированную с введением тренировочного аддиктивного вещества, и частоту оперантной реакции после введения каждой дозы исследуемого вещества.

4. Внутривенное самовведение у крыс (поддержание)

4.1. Цели и задачи эксперимента

Традиционно считается, что первым шагом в анализе любой формы лекарственной и нелекарственной зависимости служит изучение первично-подкрепляющих свойств стимулов, наиболее вероятно связанных с формированием и поддержанием зависимости. Для большинства аддиктивных веществ, таких как героин, кокаин, алкоголь, наличие положительных первично-подкрепляющих свойств является необходимым и достаточным условием для формирования устойчивого аддиктивного поведения, о чем свидетельствует большое количество данных, как клинических, так и экспериментальных, полученных на различных видах лабораторных животных (обезьяны, крысы, мыши и др.).

Одной из наиболее используемых процедур, позволяющих обнаружить наличие положительных первично-подкрепляющих свойств, является процедура, при которой оценивается способность исследуемого вещества замещать эталонные аддиктивные соединения (кокаина, морфина, этанола и др.), поддерживая уже прежде выработанную реакцию самовведения.

4.2. Оборудование, инструменты и реактивы

Установка для проведения эксперимента представляет собой стандартные оперантные камеры Скиннера, снабженные двумя педалями или отверстиями для выглядывания. Одна педаль (или отверстие) является «активной», т.е. нажатие (или выглядывание) ведет к инфузии раствора вещества. Вторая педаль (или отверстие) необходима для контроля неспецифической активности животного.

Для инфузий растворов веществ используют микродозаторы с регулируемой скоростью подачи растворов (от долей секунды до 10–20 с) и объемом разовых инфузий (10–400 мкл/кг). Оптимальные параметры (объем инфузии и доза вещества/инфузию) подбираются индивидуально для каждого препарата. Обычно внутривенные инфузии сочетают с предъявлением световых стимулов, сигнализирующих о фармакологическом подкреплении оперантной реакции. В течение периода срабатывания инъектора оперантные реакции фиксируются, но не приводят к активации инъектора. Для обеспечения

свободы перемещения животного в оперантной камере применяют шарнирное соединительное устройство, предупреждающее перекручивание соединительных трубок от катетера к инъектору.

4.3. Описание метода

Одним из важных условий выработки внутривенного самовведения веществ служит предварительное обучение животных определенной оперантной реакции (например, нажатиям на педаль или выглядываниям в отверстие) для получения пищевого или водного подкрепления с последующим его замещением на внутривенное введение вещества. Следует отметить, что оперантный ответ типа выглядывания является более естественным для крыс, чем нажатие на педаль, и вырабатывается быстрее. Дополнительным условием самовведения некоторых веществ считается пищевая депривация (точнее ограничение свободного доступа животных к пище вне эксперимента). Например, было показано, что у крыс, получающих пищу *ad libitum*, не вырабатывается реакция самовведения никотина, тогда как животные в условиях пищевой депривации самовводили никотин.

В рамках данной процедуры крысам (220–270 г), прежде обученным оперантной реакции за получение пищевого (или водного) подкрепления, имплантируют в яремную вену силиконовые катетеры, фиксируя их на спине животных. С целью профилактики послеоперационных осложнений животным назначают антибиотик (в течение 5 дней после операции). Во время ежедневного осмотра имплантированные катетеры промывают 0.05 мл раствора гепарина (20 ЕД/мл). Через 7 дней после операции животных помещают в оперантные камеры и приступают к выработке реакции внутривенного самовведения. Регистрируют количество полученных инфузий, а также количество нажатий на «активную» и «неактивную» педали (или выглядываний в отверстия).

Протокол исследования предусматривает ежедневные экспериментальные сессии, ограниченные во времени (1–3 ч). Обычно период выработки реакции самовведения эталонных аддиктивных соединений занимает 5–8 дней, за которые большинство животных (60–80%) обучаются. В дальнейших исследованиях по поддержанию самовведения при замещении эталонного вещества исследуемым используют только животных со стабильным уровнем потребления эталонного аддиктивного соединения (колебания регистрируемых параметров не более 15% от среднего уровня на протяжении трех последовательных экспериментальных сессий). Тесты замещения исследуемым веществом эталонного аддиктивного вещества обычно проводят в течение 4–5 последовательных дней или так долго, сколько потребуются для угашения прежде выработанной реакции у контрольной группы животных, получающих растворитель вместо исследуемого вещества.

4.3.1. Возможности и ограничения метода, его прогностическое значение

Согласно классическому определению феномена подкрепления, положительные первично-подкрепляющие стимулы характеризуются в первую очередь способностью увеличивать вероятность повторения поведенческой реакции, которая предшествовала их предъявлению. На этом принципе основаны практически все экспериментальные модели самовведения наркотиков, в которых получение наркотика (путем парентеральной инфузии, предъявлением жидкой или твердой формы для орального приема или газообразной формы для ингаляционного введения) следует практически сразу же за выполнением определенной поведенческой реакции (например, нажатия на педаль в экспериментах на крысах или обезьянах). Очевидно, что подобное описание приблизительно соответствует поведению потребления наркотиков человеком в «естественных» условиях. Благодаря этому считается, что модели самовведения обладают максимальной валидностью («внешнее соответствие»), а принцип положительного подкрепления применим к анализу различных форм аддиктивного поведения. Действительно, лабораторные животные, а также люди в условиях эксперимента легко обучаются выполнению заранее заданной поведенческой реакции и поддерживают ее в соответствии с законами поло-

жительного подкрепления. Практически все фармакологические агенты, для которых установлен аддитивный потенциал и которые вызывают лекарственную зависимость у человека (опиаты, психостимуляторы, седативные и снотворные, некоторые галлюциногены, алкоголь и т.д.), самовводятся в условиях эксперимента.

Следует особо отметить, что наличие положительных первично-подкрепляющих свойств неэквивалентно способности вещества вызывать эйфорию или другие эмоции положительной модальности. Единственным более или менее обобщающим свойством всех положительно-подкрепляющих стимулов (включая аддитивные вещества) является активация мезокортиколимбической системы «награды» мозга, что проявляется, например, повышением высвобождения дофамина в вентральных отделах полосатого тела и снижением порогов электрической самостимуляции мозга.

Временная структура самовведения аддитивного вещества определяется в первую очередь его фармакокинетическими свойствами. Например, период полувыведения никотина у лабораторных крыс составляет около 40 мин, в то время как для кокаина около 10 мин. Поэтому для поддержания определенной концентрации кокаина в плазме крови и мозге требуются более частые инъекции, чем для поддержания стабильной концентрации никотина. Более того, введение никотина запускает процессы десенситизации никотиновых рецепторов, что также увеличивает «рефрактерный» период, отделяющий последовательные реакции самовведения никотина, и определяет такую отличительную черту самовведения никотина, как низкая частота оперантной реакции и, соответственно, получения инъекций никотина. Такое объяснение низкой частоты самовведения никотина полностью согласуется с классическими представлениями о применимости методов самовведения для исследования аддитивного потенциала веществ только с относительно коротким периодом полувыведения. Например, ранее были неоднократно отмечены трудности выработки самовведения бензодиазепиновых седативных средств с длительным периодом полувыведения. Все это определяет также одно из главных ограничений метода, такое как невозможность сравнительной оценки степени выраженности аддитивного потенциала различных веществ, так как уровень поддерживаемой аддитивными веществами реакции в большей степени отражает фармакокинетические особенности их действия.

4.3.2. Продолжительность эксперимента

Общая продолжительность эксперимента для каждого животного составляет около 30 дней.

4.3.3. Рекомендации по объему экспериментальных исследований и обработке экспериментальных данных.

Формы представления экспериментальных данных

Самовведение обычно поддерживается при использовании определенного диапазона «разовых» доз аддитивных веществ, кривая зависимости «доза–эффект» имеет куполообразную форму. Восходящая часть этой кривой отражает прогрессивное нарастание и достижение максимальной пороговой дозы вещества, требуемой для активации зон «награды» мозга, в результате чего оперантная реакция подкрепляется. Появление нисходящей части кривой «доза–эффект» имеет несколько объяснений. Считается, что дозы, превышающие пороговую дозу, поддерживающую самовведение, обладают либо неспецифическим действием, препятствующим совершению оперантной реакции, либо вызывают состояние интоксикации, что не позволяет животным выполнять действия с той же частотой, с которой они это делали в «трезвом» состоянии. Если уровень оперантной реакции у животных, самовводящих вещество в исследуемом диапазоне доз, не превышает таковой у контрольной группы, животные которой самовводят растворитель, максимальной исследуемой дозой будет та, при которой уровень оперантного ответа ниже такового у контрольной группы. В таком случае делается вывод о том, что данная

доза исследуемого вещества уже достаточно высока для того, чтобы вызвать поведенческий ответ. Иногда уровень оперантной реакции у животных, получающих инфузии растворителя, слишком низок для проведения подобного рода сравнений, тогда при выборе максимальной дозы для исследования ориентируются на появление изменений в поведении, таких как, например, увеличение двигательной активности, или способность вещества оказывать в данной дозе анестезирующее действие.

При обработке данных результаты первой сессии замещения не учитываются, так как уровень оперантной реакции животного еще очень зависит от прежнего уровня реакции, поддерживаемой эталонным аддиктивным веществом. Если количество нажатий на «активную» педаль (выглядываний в «активное» отверстие) и полученных за сессию инфузий раствора исследуемого вещества превышает таковые показатели при замещении эталонного вещества на растворитель исследуемого вещества, то делается вывод о том, что данное исследуемое вещество может обладать первично-подкрепляющим действием и, соответственно, аддиктивным потенциалом. С другой стороны, если были проведены тесты замещения на исследуемое вещество в значительном диапазоне доз, ни одна из которых не поддерживала большее количество оперантных реакций, чем растворитель, делается вывод о том, что данное вещество не может служить подкрепляющим агентом и маловероятно, что оно обладает аддиктивным потенциалом.

5. Реакция электрической самостимуляции (РСС) системы «награды» мозга

5.1. Цели и задачи эксперимента

Активация реакции самостимуляции (РСС) при введении аддиктивного вещества является неотъемлемым звеном доказательств единой мишени для электрической (РСС) и фармакологической (исследуемое вещество) стимуляции и рассматривается как экспериментальное доказательство того, что фармакологическое вещество способно активировать эндогенные системы «награды». Существует большое количество модификаций метода электрического самораздражения мозга, основанных как на особенностях оперантного (инструментального) поведения, так и на требованиях, диктуемых необходимостью исследования конкретного фармакологического агента. Несмотря на многообразие экспериментальных подходов, для обычных скрининговых целей при исследовании аддиктивного потенциала фармакологических агентов с помощью РСС наиболее информативным и корректным признано использование методик, позволяющих оценивать возбудимость нервного субстрата системы «награды» по минимальной (пороговой) интенсивности «награждающей» стимуляции, достаточной для поддержания условной инструментальной реакции.

5.2. Оборудование, инструменты и реактивы

Исследования проводят на самцах крыс массой 150–300 г в зависимости от используемого атласа мозга крыс. РСС исследуют в оперантной камере Скиннера, оборудованной как минимум одной педалью (количество педалей зависит от используемой методики). Для РСС необходим источник электрических импульсов (например, стимулятор ЭС-51), который позволяет осуществлять стимуляцию по постоянному току в широком амплитудном и/или частотном диапазоне. Электроды имплантируют по стереотаксическим координатам в медиальный переднемозговой пучок или вентральную тегментальную область (вентральная покрывка) среднего мозга. Имплантация электродов в вентральную тегментальную область рекомендуется в связи с низкой вероятностью возникновения авersive реакций при электрическом раздражении этой структуры. Могут использоваться моно- или биполярные электроды. Последние предпочтительны из-за более высокой селективности стимуляции. При использовании монополярных электродов устанавливают дополнительный индифферентный электрод в несквозном отверстии в лобной кости.

5.3. Описание метода

Через 5–7 дней после операции приступают к выработке и стабилизации РСС при следующих параметрах раздражения: прямоугольные биполярные импульсы частотой 100 Гц, длительность импульса 0,1 мсек, продолжительность серии импульсов 500 мсек, амплитуда импульсов в примерном диапазоне 70–300 мкА для монополярной стимуляции или 10–100 мкА для биполярной стимуляции. Выработка реакции РСС осуществляется с помощью методов «последовательного приближения» к необходимой поведенческой реакции (например, нажатие на педаль). Например, после помещения животного в оперантную камеру последовательно подкрепляют «награждающей» стимуляцией сначала нахождение в части камеры, наиболее близкой к «подкрепляющей» педали затем каждое движение по направлению к педали, исследование педали, касание педали, и т.д. После выработки навыка нажатия на педаль (1–2 сессии), на протяжении 3–4 ежедневных сессий определяют амплитуду стимуляции, которая поддерживает частоту оперантной реакции 40–60 нажатий в мин. Как правило, при удачной имплантации электродов на выработку и стабилизацию РСС требуется 4–6 экспериментальных сессий длительностью 30–40 мин.

Для анализа подкрепляющих свойств РСС используют процедуру определения пороговой интенсивности электрической стимуляции (по амплитуде или частоте импульсов) с помощью методик аутотитрования или психофизического определения порогов.

5.3.1. Возможности и ограничения метода, его прогностическое значение

К настоящему времени практически для всех известных веществ с аддитивным потенциалом доказана способность активировать РСС. Список изученных аддитивных средств включает опиаты (морфин, героин), психостимулянты (кокаин, амфетамины), галлюциногены (фенциклидин), барбитураты, бензодиазепины, этанол, никотин и др. Под влиянием фармакологических агентов принципиально возможно несколько вариантов изменения параметров реакции электрической самостимуляции. После введения различных аддитивных средств наблюдается снижение пороговой интенсивности реакции РСС, что отражает повышение возбудимости нейронального субстрата. В то же время другие параметры реакции РСС, такие как частота самораздражений за экспериментальную сессию, могут как повышаться (психостимулянты, низкие дозы опиатов), так и снижаться (этанол, барбитураты).

Результаты экспериментов по РСС позволяют провести анализ зависимостей «доза–эффект» и «время–эффект» для исследуемых веществ, а также сравнить эффективность веществ в особенности по отношению к эталонным препаратам.

Ввиду того что вживление электродов для исследования РСС производится в строго контролируемых условиях (стереотаксическая методика, гистологическая верификация положения электрода после эксперимента), данная методика позволяет интерпретировать эффекты исследуемого вещества как способность активировать нейроанатомический субстрат, общий для всех известных наркотиков.

5.3.2. Продолжительность эксперимента

Исследования с использованием метода РСС подразумевают однократные введения исследуемых веществ. Однако ввиду того, что различные дозы веществ исследуют с помощью одних и тех же животных, а также необходимости ограничивать частоту повторных тестирований, длительность таких экспериментов достигает 4–6 недель (без учета времени, требуемого для выработки РСС и проведения контрольных тестирований).

5.3.3. Рекомендации по объему экспериментальных исследований и обработке экспериментальных данных.

Формы представления экспериментальных данных

Изменение пороговой интенсивности стимуляции под действием фармакологического средства или его растворителя выражают в процентах к значению пороговой интен-

сивности, определенной во время первого блока экспериментальной сессии. При расчете среднеэффективных доз фармакологических средств используется такой параметр, как количество животных в группе (в процентах), у которых снижение пороговой интенсивности стимуляции выходит за пределы нижней границы доверительного интервала колебаний пороговой интенсивности в контроле, т.е. после введения индифферентного растворителя. ЭД₅₀ определяют по методу Литчфильда-Вилкоксона или с помощью пробит-анализа. Анализ зависимостей «доза–эффект» и «время–эффект» проводят с помощью одно- и двухфакторного дисперсионного анализа для повторных измерений. Для получения достаточного объема данных для анализа зависимостей «доза–эффект» и «время–эффект» достаточны группы из 5–6 животных (при введении различных доз препаратов по схеме «латинский квадрат»).

6. Интерпретация результатов

Анализ аддиктивного потенциала нового фармакологического вещества целесообразно разделить на три фазы.

Во *первую фазу* главной задачей является определение вероятности аддиктивного потенциала на основании уже имеющихся данных об исследуемом веществе (рецепторные системы, с которым взаимодействует данное вещество; доступность и простота химического синтеза; влияние на различные нейробиохимические системы, наличие психотропной активности; предполагаемая область терапевтического применения). Если на данном этапе факторы риска выявлены не были, то дальнейшая исследовательская программа может быть сведена до минимума и включать только экспресс-методы второй фазы. Напротив, наличие факторов риска может потребовать перехода к третьей фазе исследований, минуя вторую фазу.

Во *второй фазе* целесообразно использовать тесты первичного скрининга, т.е. позволяющие получить максимально быстрый ответ и наиболее простые по выполнению. Этим требованиям удовлетворяет экспресс-метод инициации РВС у мышей. Задачей исследования является получение кривых зависимости «доза–эффект» для 5–6 доз вещества в сравнении с эффектом растворителя и (или) препарата сравнения. Нерастворимость вещества ограничивает возможность использования метода внутривенного самовведения, что может потребовать использования альтернативных методов.

Третья фаза исследований позволяет провести углубленный анализ подкрепляющих (внутриvenное самовведение у крыс) и дискриминативных стимульных свойств исследуемого соединения. Оценка влияния вещества на РСС мозга дает также возможность исследовать зависимость «время–эффект» по влиянию вещества на возбудимость нервного субстрата системы «награды».

Следует подчеркнуть, что выявление предикторов потенциала пристрастия во всех тестах позволяет сделать вывод только о подкрепляющем эффекте соединения и его влиянии на мозговой субстрат системы «награды», но не о его непосредственной способности вызывать наркоманию, токсикоманию или психологическую зависимость. Данные нозологические единицы и синдромы являются сложным клиническим феноменом, который формируется в течение достаточно продолжительного времени и при участии не только биологических, но и других, в том числе социальных факторов. Вместе с тем, как показывает клинический опыт, подкрепляющее действие является «общим знаменателем» аддиктивных соединений, и его выявление в эксперименте на животных действительно является *предиктором*, т.е. позволяет предсказать, что на основе этого подкрепляющего эффекта может сформироваться патологическое влечение к данному веществу.

Заключение

Методические рекомендации предлагают эффективную и технологически простую программу доклинических экспериментальных исследований для оценки аддиктивного потенциала (потенциала пристрастия) фармакологических средств. Программа вклю-

часть экспериментальные процедуры, которые в наибольшей степени подтвердили свою прогностическую ценность в исследованиях многочисленных фармакологических лабораторий в нашей стране и за рубежом.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Звартау Э.Э. Методология изучения наркотоксикоманий // Итоги науки и техники ВИНТИ. Сер. «Наркология». — 1988. — Т. 1. — С. 1–168.
2. Beardsley P.M. Assessing dependency and abuse potential // Nonclinical Drug Safety Assessment: Practical Considerations for Successful Registration / Eds. Sietsema W.K., Schwen R. — Falls Church, VA: FDAnews, 2007. — P. 441–463.
3. Koob G.F. Drugs of abuse: anatomy, pharmacology and function of reward pathways // Trends Pharmacol. Sci. — 1992. — Vol. 13. — P. 177–184.
4. Kornetsky C., Esposito R.U. Euphorigenic drugs: effects on the reward pathways of the brain // Fed Proc. — 1979. — Vol. 38. — P. 2473–2476.
5. Le Moal M., Koob G.F. Drug addiction: Pathways to the disease and pathophysiological perspectives // Eur. Neuropsychopharmacol. — 2007. — Vol. 17. — P. 377–393.
6. Lüscher C., Ungless M.A. The Mechanistic Classification of Addictive Drugs // PLoS Med. — 2006. — Vol. 3. — P. 437.
7. Schaefer G.J., Michael R.P. Schedule-controlled brain self-stimulation: Has it utility for behavioral pharmacology? // Neurosci. Biobehav. Rev. — 1992. — Vol. 16. — P. 569–583.
8. Schuster C.R., Johanson C.E. Relationship between the discriminative stimulus properties and subjective effects of drugs // Psychopharmacol. Ser. — 1988. — Vol. 4. — P. 161–175.
9. Wise R.A. Addictive drugs and brain stimulation reward // Annu. Rev. Neurosci. — 1996. — Vol. 19. — P. 319–340.
10. Young A.M., Herling S. Drugs as reinforcers: studies in laboratory animals // Behavioral analysis of drug dependence / Eds. Goldberg S.R., Stolerman I.P. — Orlando: Academic Press, 1986. — P. 9–67.

ГЛАВА 19

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ АЛКОГОЛИЗМА

Составители: академик РАМН И.П. Анохина; к. б. н. Л.Г. Колик

Введение

Алкоголизм — заболевание, характеризующееся комплексом взаимосвязанных проявлений, обусловленных хроническим действием этанола, которому присуща стадийность нарастания разнородных по своим механизмам патофизиологических процессов.

По современным научным представлениям, воздействие этанола у млекопитающих приводит к однотипным реакциям как в ЦНС на уровне нейрохимических, гормональных и ферментативных процессов, так и в других органах и системах.

Общие биологические закономерности влияния этанола на человека и животных обосновывают экспериментальное моделирование состояний алкоголизма. Соответственно, эти модели могут рассматриваться в качестве адекватных для поиска потенциальных средств лечения алкоголизма и экстраполяции полученных данных на человека.

В настоящее время лечебные мероприятия при состояниях, связанных с острой алкогольной интоксикацией и абстиненцией, направлены на нормализацию водно-солевого равновесия, на проведение дезинтоксикационных процедур, применяются дегидратационные средства, спазмолитики, стандартные психостимуляторы и analeптики, гепатопротекторы, стимуляторы внутриклеточного катаболизма этанола — ноотропы и ряд других психотропных средств. Данная терапия в полном объеме проводится преимущественно в клинических условиях и не всегда является достаточно продуктивной.

Для ослабления алкогольной мотивации используют дисульфирам (ингибитор АЛДГ), предотвращающий появление «алкогольных срывов», налтрексон (конкурентный антагонист опиоидных рецепторов), снижающий потребление алкоголя у больных алкоголизмом, акампросат (частичный агонист NMDA-рецепторов и антагонист mGluR5), способствующий длительной ремиссии [1]. Существующие препараты во многих случаях оказываются недостаточно эффективными и/или вызывают множество нежелательных побочных эффектов. Поиск новых эффективных средств, влияющих на основное патогенетическое звено алкоголизма — влечение к этанолу — остается актуальной задачей фармакологии.

1. Общие положения

1.1. Цели и задачи исследования

Основной целью исследования является выявление и оценка спектра специфической активности новых веществ, перспективных для лечения алкоголизма.

Продуктивность поиска новых фармакологических средств для воздействия на патологические процессы при остром и хроническом действии алкоголя определяется степенью изученности молекулярных механизмов действия алкоголя с учетом возможных фенотипических различий, выбором химических соединений для фармакологических исследований и оптимизацией схемы исследований, позволяющей проводить широкий

скрининг потенциальных «противоалкогольных» средств при минимальных временных и экономических затратах.

На современном уровне знаний в качестве мишеней для фармакологического воздействия могут рассматриваться следующие проявления эффектов алкоголя: 1) острая интоксикация; 2) формирование алкогольной мотивации; 3) формирование зависимости; 4) состояние абстиненции; 5) восстановление алкогольной мотивации (рецидив после ремиссии). С учетом этого алгоритма и построены данные Методические рекомендации.

Основа методологических подходов к поиску средств лечения алкоголизма состоит в использовании батареи тестов, позволяющих оценить физиологические и биохимические изменения при остром и хроническом введении этанола, и на этом фоне анализировать эффекты веществ, отобранных для скрининга в качестве «противоалкогольных» средств.

1.2. Общие принципы проведения экспериментальных исследований

Эксперименты по изучению влияния фармакологических веществ на состояния, вызванные этанолом должны соответствовать следующим требованиям:

- использование только стандартного брикетированного сухого корма для лабораторных животных, так как различия в пищевом рационе, содержании жидкости в пище и ее калорийности существенно сказываются на питьевом режиме животных [2];

- поддержание постоянной температуры окружающей среды, так как резкие колебания температуры значительно влияют на потребление алкоголя животными;

- контроль условий освещенности; при 12-часовом световом режиме (день/ночь) основное потребление этанола приходится на темное время суток [3];

- предоставление животным раствора этанола 10% или 15% концентрации в условиях их содержания в индивидуальных ячейках (клетках) или в группе при создании модели хронического алкоголизма в условиях свободного выбора между алкоголем и водой позволяет добиться добровольного потребления максимально больших доз алкоголя, оказывающих токсическое действие на организм [4,12,13]; в ряде случаев возможно использование растворов этанола в концентрациях от 5 до 20% [18];

- отсутствие вкусовых добавок к растворам для питья; использование вкусовых добавок к раствору этанола значительно отражается на его потреблении животными и на процессах формирования алкогольной мотивации, что при необходимости может быть использовано для ускорения процессов формирования алкогольной зависимости [4];

- применение пассивного содержания животных в парах этанола для оценки влияния веществ на сформированную физическую зависимость от алкоголя, на состояние абстиненции, а также для выявления способности ослаблять устойчивую алкогольную мотивацию в период лишения этанола;

- определение количества естественной потери жидкости из поилок в отсутствие животных для вычисления поправочного коэффициента;

- оценка отношения животных к алкоголю осуществляется путем ежедневного учета его потребления на единицу их массы;

- условия содержания животных; так как изоляционный стресс влияет на потребление этанола [5; 6], животных желательно содержать в группах, однако, при этом количественная регистрация индивидуального потребления алкоголя каждым животным осложняется. В случае оценки уровня алкогольной мотивации, индивидуальное содержание животных не является препятствием, так как фактор изоляционного стресса в определенной мере моделирует обстоятельства, способствующие развитию алкоголизма у людей.

1.2.1. Количество животных

Количество животных в каждой группе должно быть достаточным для оценки характера специфической фармакологической активности и выполнения статистической обработки полученных результатов.

1.2.2. Отбор животных

Проведение скрининга требует большого количества животных, поэтому в этих целях используют мелких лабораторных животных — в основном мышей и крыс. В связи с тем, что в условиях свободного выбора между алкоголем и водой только около 25% особей из популяции беспородных животных (крысы) отдают предпочтение алкоголю [7], для оптимизации поиска новых «противоалкогольных» средств, влияющих на формирование алкогольной мотивации, применяют дифференцированный подход к отбору животных. Оценка изначальных характеристик в популяции беспородных животных для выявления наличия или отсутствия склонности к потреблению этанола может проводиться:

1) в присутствии алкоголя:

— по результатам первоначального 10-дневного потребления этанола и воды в условиях свободного выбора;

— по продолжительности этанолового наркоза; длительность бокового положения у животных, предпочитающих алкоголь, в два раза ниже по сравнению с животными, предпочитающими воду [8];

2) в отсутствии алкоголя:

— разделение беспородных крыс на высокоактивных и низкоактивных особей на основании поведенческих показателей в тесте «неизбегаемое плавание», так как показано, что низкоактивные крысы отличаются склонностью к развитию депрессивноподобных состояний и формированию стойкой алкогольной мотивации по сравнению с высокоактивными животными [7].

Использование селективно выведенных линий и/или популяций грызунов, например, отобранных по признакам добровольного потребления раствора этанола и воды (P/NP, AA/ANA, HAD1/HAD2, sP/sNP крысы) или различающихся по чувствительности к действию этанола (мыши LS / SS; Fast / Slow; Hot / Cold) целесообразно при изучении определенных аспектов патогенеза алкоголизма.

Для оценки генетической предрасположенности к различным проявлениям действия алкоголя могут применяться инбредные животные, отличающиеся по уровню потребления этанола при свободном выборе и по вызываемым эффектам. В таких случаях каждый эксперимент должен тщательно планироваться с учетом известных для выбранной линии данных, включая реакции, возникающие при длительном применении этанола.

1.3. Стратегия скрининга лекарственных средств для лечения алкоголизма

Основой поиска ЛС лечения алкоголизма являются данные о вызываемых алкоголем изменениях в нейрохимических процессах, нарушениях клеточного гомеостаза, иными словами, нарушениях в функциональных системах разного уровня. В качестве мишеней воздействия могут рассматриваться рецепторные образования, системы вторичных посредников, генетические, эпигенетические и другие механизмы. Главным при выборе мишени должно являться доказательство связи возникающих изменений с действием алкоголя.

1.3.1. Выбор препаратов сравнения

В качестве препаратов сравнения должны выбираться средства, наиболее эффективные для лечения конкретных проявлений воздействия этанола.

1.3.2. Статистическая обработка результатов исследования

Обработку полученных данных производят с помощью стандартных пакетов статистических программ с использованием параметрических и непараметрических критериев. Статистически значимыми признают различия при уровне вероятности $p < 0,05$. Результаты представляют в виде таблиц или рисунков.

2. Поведенческие методы

2.1. Влияние фармакологических веществ на проявления алкогольной интоксикации при свободном поведении животных

Одним из поведенческих признаков интоксикации этанолом является нарушение координации движения или атаксия. Тесты для оценки локомоторной активности широко используются при анализе чувствительности к токсическому действию алкоголя [9]. Учитывая сложную природу данного феномена, целесообразно использовать комплексный подход для анализа влияния фармакологических веществ на различные проявления атаксии, в частности, потерю равновесия, «неровную походку» или потерю мышечной силы.

2.1.1. Визуальная оценка атаксии

Исследования проводят на мышах. Животное помещают на гладкую ровную неблестящую поверхность из ПВХ (50 см²), окруженную бортами высотой 5 см. До и после инъекций время наблюдения за одним животным составляет 45 с. Фиксируют наличие или отсутствие проявлений атаксии (см. Табл.1). После регистрации фонового уровня животным вводят внутривентриально (в/в) этанол (20% раствор в дозах 2,75–3,25 г/кг) и помещают в индивидуальные ячейки. Через 10–15 мин после инъекции этанола животных повторно тестируют на наличие двигательных расстройств (см. табл.1). Изучаемое вещество вводят до инъекции этанола. Количество животных в контрольной и получающих ЛС группах составляет не менее 10 особей.

Интерпретация результатов.

Таблица 1

Способность изучаемых веществ восстанавливать нормальную походку рассматривается как проявление ими позитивного влияния на нарушаемую этанолом координацию движений

Баллы	Характеристика
Неспособность удерживать задние лапы под туловищем	
0	«Раскидывание» лап не наблюдается
1	Кратковременное эпизодическое «раскидывание» лап во время движения
2	Повторяющиеся «раскидывания» лап, способность двигаться по прямой линии
3	Постоянное «раскидывание» лап, ограниченная координация (часто движение по кругу)
4	Постоянное «раскидывание» лап, безуспешные попытки к движению
5	Постоянное «раскидывание» лап, отсутствие попыток к движению
Неустойчивая походка	
0	Отсутствие покачивания
1	Покачивание при движении и на месте
2	Покачивания и падения
3	Падение из стороны в сторону, отсутствие движения
4	Падение, неспособность подняться
Неспособность поднять голову от пола во время движения	
Да/нет	
Неспособность подняться на лапы при перемещении	
Да/нет	

По Metten P. et al., 2004 [9], адаптировано.

2.1.2. Тест «вращающийся стержень»

Исследования проводят на мышах. Установка представляет собой приподнятый на высоту 60 см стержень диаметром 6 см с фиксированной скоростью вращения (3,0, 6,5 и/или 10,0 об/мин). При изучении влияния фармакологических веществ на алкогольную интоксикацию мышей предварительно тестируют не менее трех раз (время каждой экспозиции составляет 3 мин) для достижения стабильных показателей. Этанол вводят (20% раствор в дозах 1,25–1,75 г/кг, в/б) за 30 мин до тестирования. Доза этанола выбирается с учетом экспериментальных данных, согласно которым низкие дозы этанола улучшают поведенческие характеристики мышей в данном тесте, а доза 2,0 г/кг и более является слишком высокой для тестирования через заданный интервал времени. Основным регистрируемым показателем — время удержания на стержне [10].

Интерпретация результатов. Способность животных сохранять равновесие и увеличивать время нахождения на вращающемся стержне под действием изучаемого вещества, вводимого на фоне этанола, рассматривают как способность уменьшать токсическое действие этанола и восстанавливать координацию движения.

2.1.3. Тест «перекладина»

Исследования проводят на мышах. Установка представляет собой деревянную перекладину шириной 2 см, толщиной 4 см и длиной 122 см, приподнятую на высоту 48 см от уровня стола. До начала эксперимента животным предоставляют возможность дважды пройти по перекладине в обоих направлениях. По окончании процесса обучения вводят этанол (20% раствор, дозы 1,0–1,4 г/кг, в/б) и помещают мышей в индивидуальные ячейки. Через 10 мин повторно тестируют и регистрируют количество «соскальзываний» задних лап, «оступлений» при перемещении животного с одного конца перекладины до другого. Если животные останавливаются более чем на 1 сек, то, как и во время обучения, их следует слегка подтолкнуть за задние лапы для инициации движения. В случае падения животное сразу же поднимают за хвост и сажают на то место, откуда оно упало. При разворачивании животного назад, экспериментатор поднимает животное за хвост и ориентирует на заданное направление [11]. Изучаемое вещество (исследуемая группа) или растворитель (контроль) вводят животным до введения этанола, исходя из фармакокинетических особенностей вещества. Количество животных в каждой группе не менее 10.

Интерпретация полученных результатов. Уменьшение количества «соскальзываний» задних лап на перекладине в получающей ЛС группе по сравнению с контрольной рассматривают как способность изучаемого вещества уменьшать токсическое действие этанола и восстанавливать координацию движения.

Данный тест является более чувствительным к низким дозам этанола по сравнению с тестом «вращающийся стержень», так как этанол в дозах свыше 1,5 г/кг делает большинство мышей неспособными выполнить поставленную задачу.

Дополнительным критерием для объективной оценки состояния животных является определение содержания этанола в крови сразу после окончания тестирования на «перекладине» (см. пункт 8).

2.1.4. Тест «крестообразный лабиринт»

Исследования проводят на мышах и крысах. «Крестообразный лабиринт» (КЛ) [12] состоит из 4-х камер, пронумерованных 1, 2, 3, 4, которые соединяются между собой через такую же пятую центральную камеру. Тупиковые и центральная камеры КЛ для мышей представляют собой куб с ребром длиной 15 см и отверстием для входа сечением 7×7 см. В КЛ для крыс центральная камера представляет собой куб с ребром длиной 20 см, а тупики имеют размеры 30×20×20 см и соединяются с центральной камерой отверстием для входа сечением 12×12 см.

Животное помещают в центральную камеру, сверху КЛ закрывают прозрачной крышкой и позволяют ему исследовать новое пространство до тех пор, пока животное не

произведет 13 посещений его тупиковых камер. Заход в тупик считают состоявшимся, если животное переносит все 4 лапы в это отделение КЛ. Оценивают следующие виды поведения.

1. Общее время в КЛ, затраченное на 13 заходов в его тупики, свидетельствует об уровне исследовательской активности.

2. Латентный период начала исследования КЛ, то есть время между помещением животного в центральную камеру и его первым заходом в тупик. Этот показатель позволяет дифференцировать анксиолитические свойства изучаемых веществ и коррелирует с избеганием посещения открытых рукавов «приподнятого крестообразного лабиринта», стандартного теста для оценки тревожности.

3. Время полного обхода лабиринта, то есть посещение всех отсеков, отражает способность к пространственной ориентации и рассматривается как одна из форм элементарной рассудочной деятельности у животных. Уменьшение числа визитов, потребовавшихся для совершения первого полного обхода, и увеличение общего числа полных обходов указывают на совершенствование пространственной организации.

4. Количество возвратов в тупик, посещенный при предыдущем визите, рассматривается как показатель ошибок краткосрочной памяти.

5. Поочередное посещение двух из четырех тупиков, которое интерпретируется как поведенческая стереотипия.

6. Количество правых и левых поворотов при переходе из тупика в тупик через центральный отсек лабиринта отражает степень асимметрии локомоции.

По результатам тестирования сравнивают поведенческие проявления в КЛ у животных контрольной группы, у животных на фоне действия этанола *per se* с группой животных, которым до применения этанола вводили изучаемое вещество.

Интерпретация полученных результатов. Данный метод позволяет количественно оценить вызываемые алкоголем изменения поведенческих характеристик у животных, включая исследовательскую активность, эмоциональный статус, пространственную ориентацию, элементы «рассудочной» деятельности, краткосрочной памяти, стереотипного поведения, и может быть использован для выявления характера эффективности изучаемых веществ на фоне алкогольной интоксикации разного уровня, в условиях хронического потребления этанола, а также при алкогольной абстиненции (см. пункт 4.). Ослабление вызываемых алкоголем изменений поведения животных в КЛ под влиянием изучаемых веществ может указывать на их позитивный «противоалкогольный» эффект по отношению к поведенческим характеристикам, которые регистрируют в данном тесте.

2.1.5. Продолжительность этанолового наркоза

2.1.5.1. Тест-доза этанола для алкогольного наркоза

Исследования проводят на мышах или крысах. Животным вводят 25% раствор этанола в тест-дозе (4–5 г/кг, в/б), вызывающей развитие алкогольного наркоза, который сохраняется в течение 1–2 ч, что позволяет выявить как ослабление, так и усиление действия этанола. Животных размещают на ровной горизонтальной поверхности и регистрируют время наступления и окончания алкогольного наркоза по принятию «бокового положения» и, соответственно, самостоятельному устойчивому выходу из него. В зависимости от схемы эксперимента изучаемое вещество вводится до тест-дозы этанола или на фоне этанолового наркоза. Контрольной группе животных вводят раствор этанола в тест-дозе и изомерное количество растворителя, используемого для изучаемого вещества, в соответствии с выбранными временными интервалами для конкретного эксперимента. В состав каждой группы входят не менее 10–12 особей. Данный тест является чувствительным к температуре окружающей среды и физиологическому состоянию животных. Продолжительность алкогольного наркоза может варьировать

при сезонных колебаниях, а также при использовании различных популяций животных. Следует иметь в виду, что характер продолжительности алкогольного наркоза в известной степени обратно пропорционально коррелирует с характером объемов потребления алкоголя в условиях свободного доступа животных к раствору этанола и воде [4, 13].

Объем вводимого 25% раствора этанола (V) в соответствии с его необходимой дозой (D) с учетом массы животного (M) рассчитывают по формуле:

$$V(\text{мл}) = \frac{D(\text{г/кг}) \times M(\text{г})}{250}.$$

2.1.5.2. «Субнаркотическая» доза этанола

При введении этанола в «субнаркотической» дозе используется не менее 3-х групп из 6-ти животных в соответствии со ступенчатым возрастанием дозы этанола в пределах от 3,0 до 4,7 г/кг, в/б, отдельно для каждой группы по отношению к первой группе животных. Животным контрольной группы вводят раствор этанола в тест-дозе и измеренное количество растворителя, используемого для изучаемого вещества, в соответствии с выбранными временными интервалами для конкретного эксперимента. Рассчитывают величину ED_{50} (также ED_{10} , ED_{100} и др.) этанола по количеству животных, принявших или не принявших «боковое положение» под влиянием 25% раствора этанола для контрольной и получающих ЛС групп животных [13].

Интерпретация полученных результатов. Основные проявления этанолового наркоза характеризуются резким угнетением функции ЦНС, когда в первую очередь возникает миорелаксация и значительно ослабляются двигательные и вегетативные реакции в ответ на внешние стимулы. Указанное состояние развивается при условии превышения в крови «пороговой» концентрации этанола. При последующем уменьшении концентрации этанола ниже «пороговой» («субнаркотической») концентрации этанола в процессе его метаболизма происходит восстановление угнетенной этанолом функции ЦНС и, соответственно, выход из состояния наркоза («бокового положения»).

Продолжительность алкогольного наркоза может считаться производным от времени нахождения в крови этанола в концентрации, превышающей «пороговую», и косвенно отражает функциональную активность этанол-окисляющих систем. Следует иметь в виду, что на длительность алкогольного наркоза также могут влиять вещества с общим депримирующим эффектом. С учетом возможных вариантов полученных результатов, могут быть сделаны следующие выводы (таблица 2):

Таблица 2

Оценка эффектов изучаемого вещества на острое действие алкоголя

Варианты эксперимента	Длительность алкогольного наркоза	ED_{50} для «бокового положения» от этанола	Интерпретация полученных данных для изучаемого вещества
Этанол (контроль)	1	1	Стандартный эффект этанола при изучаемых тестах, принятый за единицу
Этанол + вещество А	1	1	Отсутствие эффекта на действие этанола
Этанол + вещество Б	↑	1	Угнетение активности этанол-окисляющих систем
Этанол + вещество В	↓	1 или ↑	Стимуляция активности этанол-окисляющих систем

Варианты эксперимента	Длительность алкогольного наркоза	ЕД ₅₀ для «бокового положения» от этанола	Интерпретация полученных данных для изучаемого вещества
Этанол + вещество Г	↑	↓	Наличие неспецифического общего депримирующего эффекта на ЦНС в сочетании с угнетением общего метаболизма

Условные обозначения: за единицу принимаются эффекты этанола в соответствии с его тест-дозой для изучения продолжительности алкогольного наркоза или ЕД₅₀ по «боковому положению».

2.1.6. Выживаемость животных при острой алкогольной интоксикации

Исследования проводят на мышах или крысах. Животным интрагастрально вводят этанол в виде 50% раствора в дозе, соответствующей ЛД₅₀ (для мышей 10,0 г/кг) и дозе, приближающейся к ЛД₁₀₀ (для мышей 12,0 г/кг). Изучаемое вещество вводят однократно или многократно после интоксикации этанолом. Через 24 и 48 ч регистрируется число погибших животных и вычисляется % выживаемости для контрольной и получающих ЛС групп соответственно. Дополнительно проводят визуальное наблюдение за состоянием животных через 24 и 48 ч после начала алкогольной интоксикации. Число животных в каждой группе составляет не менее 20 особей.

Интерпретация полученных результатов. Способность веществ увеличивать выживаемость животных в условиях использования этанола в дозах, близких к летальным, свидетельствует о наличии антиалкогольных эффектов, препятствующих проявлению токсического действия этанола.

Поиск новых фармакологических средств для выведения из алкогольной комы может оказаться перспективным среди веществ, ускоряющих элиминацию этанола и его метаболита ацетальдегида, среди возможных (специфических или неспецифических) антидотов, а также веществ, активирующих функцию ЦНС, ССС, дыхательной и других систем. Увеличение скорости элиминации этанола в этих условиях под действием фармакологических веществ может указывать на активацию ферментных систем, участвующих в метаболизме этанола, а ее уменьшение — свидетельствовать о подавлении этих функций.

2.1.7. Влияние фармакологических веществ на состояние животных после умеренной, средней и тяжелой алкогольной интоксикации

Для экспериментов используют животных, перенесших алкогольную нагрузку трех уровней: I — относительно невысокая (животные, перенесшие действие этанола в «субнаркотической» дозе; см. пункт 1.5.2.), II — средней тяжести (животные, перенесшие алкогольный наркоз; пункт 1.5.1.), III — тяжелая (животные, выжившие после применения этанола в дозе ЛД₅₀; пункт 1.6.).

Животных тестируют через 24 и 48 ч после введения этанола согласно экспериментам, обозначенным в перечисленных выше пунктах. При этом можно использовать животных, перенесших аналогичную острую алкогольную интоксикацию в предыдущих исследованиях (см. 1.5.1.; 1.5.2. и 1.6.), но только тех животных, которые соответствовали контрольным группам без применения фармакологических веществ. Изучаемые вещества вводят перед тестированием животных.

Оценку состояния животных после умеренной, средней и тяжелой алкогольной интоксикаций осуществляют аналогично тестам по изучению уровня алкогольного опьянения в условиях свободного поведения животных (пункты 1.1–1.4.; 4.1–4.3.), однако, в этом случае эксперименты должны исключать применение алкоголя. Могут быть также использованы стандартные методы инструментальной оценки артериального давления, ЭКГ, частоты дыхательных движений у животных и др.

Интерпретация полученных результатов. Ослабление под влиянием изучаемых веществ последствий, обусловленных умеренной, средней и тяжелой алкогольной интоксикацией, будет свидетельствовать о позитивном действии этих веществ в части нормализации негативных процессов, возникающих при действии этанола.

2.2. Формирование алкогольной мотивации

2.2.1. Потребление алкоголя в условиях ограниченного доступа к раствору этанола в «темное» время суток («Drinking in the dark»)

Методика представляет модель добровольного «избыточного» потребления этанола у мышей, приводящего к достижению физиологически значимых концентраций этанола в крови (50–200 мг% и выше). Эксперименты могут быть проведены в двух вариантах:

Вариант А. Исследования проводят на мышках линии С57В1/6J с генетически обусловленной предрасположенностью к высокому потреблению алкоголя (до 80 мг % этанола в крови). В условиях содержания животных в индивидуальных клетках поилку с водой заменяют на поилку, содержащую раствор этанола, через 3 ч после начала «темной» фазы суточного цикла день/ночь (12 ч/12 ч) и предоставляют свободный доступ к 20% этанолу в течение 2-х ч. Указанную процедуру повторяют ежедневно в течение 4-х дней до достижения стабильных результатов по потреблению этанола. На 5-й день по той же схеме изучаемое вещество для отдельных групп лабораторных животных, получающих ЛС, или растворитель (контроль), вводят за 30 мин до предоставления им раствора этанола. Регистрируют количество выпитого раствора этанола в г/кг массы тела в заданный временной интервал, взвешивая поилку с этанолом до и после помещения в клетку (или с помощью учета изменений объемов потребления жидкостей, если применяли градуированные мерные поилки). Сравнивают объемы потребления жидкостей у контрольной и получающей ЛС групп животных. В процессе эксперимента после регистрации уровней потребления этанола измеряют концентрацию этанола в крови животных (см. пункт 8.) [14, 15].

Вариант Б. Исследования полностью соответствуют описанной выше процедуре, за исключением того, что животным в «темный» период помимо раствора этанола предоставляется поилка с водой [16].

Отличие представленных вариантов: в первом случае (вариант А) имеет место насильственное предоставление только этанола А, во втором животным предоставляется добровольный выбор между потреблением раствора этанола и водой, то есть, более естественные («мягкие») условия.

Интерпретация полученных результатов. Уменьшение потребления алкоголя на фоне применения изучаемого вещества будет свидетельствовать о наличии у него способности ослаблять алкогольную мотивацию. Данная модель может быть использована для скрининга потенциальных фармакологических веществ, влияющих на избыточное потребление алкоголя, а также для выявления новых генетических и нейробиологических механизмов, способствующих развитию алкоголизма [17].

2.2.2. Добровольное потребление алкоголя в условиях круглосуточного свободного выбора между раствором этанола и водой в первые недели контакта с этанолом

Исследования проводят на крысах или мышках. Для данного эксперимента и для последующих возможен дифференцированный отбор животных по результатам предварительного тестирования по реакции животных на острое введение этанола (тест 1.5.1) или при отсутствии этанола (по особенностям их поведенческих различий). Животных помещают в индивидуальные клетки с круглосуточным свободным доступом к двум мерным поилкам, содержащим 10% или 15% этанола и воду, а также к стандартному брикетированному сухому корму. До начала исследований по результатам предварительного

48-часового (фоновое) содержания животных в этих условиях для участия в продолжении эксперимента отбирают особей, предпочитавших 10% или 15% раствор этанола (в объемах не менее 10–15 мл/кг/сут), которых группируют (не менее, чем по 10–15 особей) по равновеликим количествам потребляемого алкоголя за этот период. Затем у животных ежесуточно в течение 14 дней регистрируют потребление алкоголя в пересчете на чистый этанол в г/кг массы тела. Изучаемые вещества и растворитель (контроль) вводят в одно и то же время суток в соответствии с выбранным способом введения и частотой их применения в зависимости от известных или предполагаемых свойств взятых веществ. Подсчитывают среднесуточное потребление алкоголя отдельными животными за указанное время исследования. Сравнивают динамику изменений объемов добровольно потребленного алкоголя на фоне применения веществ (14 дней) и после их отмены (в следующие 7 дней).

Интерпретация полученных результатов. В случае уменьшения добровольного потребления этанола на фоне применения изучаемых веществ можно сделать заключение о способности этих веществ ослаблять формирование алкогольной мотивации. Уменьшение потребления алкоголя за 7-дневный период после отмены указанных веществ будет свидетельствовать об устойчивости проведенной «позитивной терапии» для последующего добровольного потребления этанола.

2.3. Формирование зависимости от алкоголя

2.3.1. Добровольное потребление алкоголя

в условиях хронического круглосуточного свободного доступа к этанолу и воде

Вариант А. Эксперименты проводят на крысах, потребляющих относительно большие количества 10% или 15% этанола (50–60 мл/кг в сутки). Оценивают влияние изучаемого вещества на добровольное потребление алкоголя животными хронически (не менее 3–4 месяцев) потреблявшими его стабильные объемы (из расчета на 1 кг веса в сутки) в условиях свободного выбора между 10% или 15% этанолом и водой. Сравняется потребление алкоголя до применения изучаемого вещества (1 неделя), на фоне применения вещества (2 недели) и после его отмены (1 неделя). Подсчитывают среднесуточное потребление алкоголя отдельными животными за каждую из указанных недель. Далее, вычисляя среднее потребление алкоголя по соответствующей группе животных за каждую неделю и сопоставляя данные о потреблении за 1 неделю (до инъекций) с данными по потреблению раствора этанола животными для каждой из последующих недель; потребление алкоголя за 1-ю неделю принимается за 100% и рассчитывается (в %) динамика потребления за все последующие недели.

Вариант Б. Метод 4-х бутылочной пробы, согласно которому животным в течение нескольких месяцев предоставляют для свободного выбора этанол в следующих концентрациях 0%, 5%, 10% и 20% [18]. Данный подход позволяет идентифицировать особей, у которых наблюдается постепенный переход от контролируемого к неконтролируемому (обязательному) потреблению этанола. У животных выделяют следующие поведенческие изменения, характерные для сформировавшейся алкогольной зависимости: 1) значительное увеличение потребления алкоголя преимущественно за счет растворов с высокой концентрацией (т.е., 20%) и 2) изменение временного паттерна алкогольного поведения (т.е., отсутствие отличий в потреблении алкоголя в темное и светлое время суток). Оценка влияния изучаемого вещества на хроническое добровольное потребление алкоголя животными (не менее 3–4 месяцев) осуществляется в полном соответствии с описанной в пункте «А» с учетом объемов потребления растворов этанола указанных концентраций.

Интерпретация полученных результатов. Уменьшение потребления алкоголя на фоне применения изучаемого вещества будет свидетельствовать о наличии у него способности ослаблять влечение к алкоголю в условиях сформированной алкогольной мо-

тивации. Уменьшение потребления алкоголя после отмены изучаемого вещества будет указывать на его стойкий терапевтический эффект.

Оценка и интерпретация эффекта изучаемых веществ по характеру вызываемых ими изменений в проявлениях состояния абстиненции после отмены добровольного хронического потребления этанола у животных осуществляются в полном соответствии с описанными в пунктах 1.2. и 1.3. за исключением позиций, рассмотренных для принудительной алкоголизации в парах этанола.

2.3.2. Ускоренное формирование алкогольной зависимости

Для осуществления процедуры ускоренного формирования алкогольной зависимости целесообразно использовать отобранных животных, предпочитающих раствор этанола по результатам предварительной 2-недельной регистрации объемов потребления алкоголя в условиях свободного доступа к этанолу и воде (см. пункт 3.1.) или животных с короткой продолжительностью алкогольного наркоза (пункт 1.5.1.).

2.3.2.1. Содержание животных в условиях, при которых раствор этанола используют в качестве единственного источника питья

Предоставление крысам, потребляющим стабильно большие количества алкоголя (50–60 мл/кг в сутки), раствора 10% или 15% этанола в качестве единственного источника жидкости при свободном доступе к корму [19] в течение 8 недель. У мышей в аналогичных условиях используют раствор этанола 20% концентрации [20].

При использовании раствора этанола в качестве единственного источника питья у животных оценка характера абстинентных проявлений как критерия уровня развития физической зависимости (см. пункт 4) осуществляется по динамике их нарастания после дробной отмены в процессе процедуры хронического потребления этанола. Показатели этих проявлений у животных контрольной группы (без применения изучаемых веществ) могут быть сопоставлены с результатами, полученными у животных, которым по выбранной схеме вводили изучаемые вещества ежедневно в процессе алкоголизации.

Интерпретация полученных результатов: ослабление скорости нарастания проявлений алкогольной абстиненции в данном тесте свидетельствует о том, что изучаемое вещество препятствует формированию физической зависимости от этанола.

2.3.2.2. Ускоренное формирование алкогольной зависимости в условиях пассивного содержания животных в парах этанола

Относительно быстро проявления физической зависимости (тремор, ригидность хвоста, характер вздрагивания на шум, судороги) от алкоголя при его отмене у животных, по сравнению с последствиями их содержания при свободном доступе к воде и этанолу в обычных условиях, достигаются посредством хронического содержания животных в атмосфере паров этанола. Для крыс указанное состояние достигается после их нахождения в атмосфере, содержащей пары этанола в концентрации 15–22 мг/л в течение 30 суток.

Эти проявления могут быть достигнуты в существенно короткие сроки при более жестких условиях круглосуточного вдыхания животными атмосферы с максимально высокими концентрациями этанола, но не приводящими за выбранный период хронической экспозиции к гибели животных (концентрации этанола подбираются экспериментально, с учетом постоянной температуры окружающей среды 18–22 °С и достаточной концентрации кислорода для нормального дыхания животных при постоянном протоке воздуха через экспериментальные камеры).

Указанный вариант исследования, также как и в условиях использования раствора этанола в качестве единственного источника питья, позволит значительно уменьшить экономические и временные затраты на проведение скрининга. Эксперименты осу-

ществляют с использованием длительного круглосуточного нахождения животных в замкнутом пространстве камер, содержащих в окружающем воздухе пары этанола в выбранной концентрации (определяется схемой эксперимента) от нескольких суток до 8 недель. В течение всего эксперимента внутри камер животные имеют постоянный свободный доступ к сухому брикетированному корму и поилкам с водой. Санацию камер с заменой воды и корма осуществляют 1 раз в сутки в течение 45-ти мин; за указанное время, если это соответствует выбранной схеме эксперимента, животным могут быть введены изучаемые вещества или растворитель в изомерных объемах или взяты пробы для определения уровней концентрации этанола в крови.

Камеры представляют из себя герметичные контейнеры, выполненные из любых нетоксичных материалов, не вступающих в химическое взаимодействие с этанолом с размерами 30×50×70 см, объем которых позволяет в условиях данного эксперимента одновременно содержать в каждой из них не более 10 крыс или не более 20 мышей). Камеры должны быть оборудованы внутренними вентиляторами для равномерного перемешивания газовой смеси и постоянной приточно-вытяжной вентиляцией из атмосферного воздуха с учетом физиологических особенностей функции дыхания животных (частота дыхания в норме 110–180 дых/мин (крысы); 130–200 дых/мин (мыши) [13] при достаточном содержании в камерах кислорода (скорость постоянного воздухообмена в камерах составляет 2 л/мин). Насыщение камер парами алкоголя выбранной концентрации осуществляется из резервуара, содержащего этанол, с помощью регулируемой капельницы, через которую этанол поступает в испаритель (90 °С), а затем в камеры. Постоянный уровень концентрации этанола в камерах рассчитывается с учетом дозированной скорости поступления в них этанола и скорости в них воздухообмена (2л/мин) по формуле:

$$Y = \frac{C}{V \times X},$$

где Y — необходимое количество поступления этанола (мл/мин) для поддержания постоянной (требуемой) концентрации этанола в камере; X — заданная скорость (л/мин) прохождения атмосферного воздуха через камеру (с помощью приточно-вытяжной вентиляции); V — объем камеры (л); C — требуемая постоянная концентрация паров этанола в камере (мл/л).

В процессе эксперимента инструментальный контроль уровня концентрации паров этанола в атмосфере, окружающей с животных, может быть осуществлен с помощью дробного отбора из камеры проб воздушной смеси необходимого объема для оценки данного показателя с помощью газового хроматографа. Общая схема эксперимента в зависимости от поставленной задачи может варьировать.

В качестве варианта данной методики используют непостоянную алкоголизацию животных, при которой периоды содержания в парах этанола («интоксикация») чередуются с периодами («детоксикации») алкогольной абстиненции (12–17ч/7–12 ч) в течение длительного времени, что способствует ускоренному развитию поведенческих изменений, характерных для алкогольной зависимости. Например, в популяции беспородных крыс увеличение «самовведения» алкоголя наблюдается уже через 2 недели хронического прерывистого содержания в парах этанолах [21], в то время как в условиях постоянной ингаляции аналогичное увеличение потребления алкоголя достигается спустя 4–6 недель [22]. Несомненным преимуществом хронической прерывистой алкоголизации животных в парах этанола являются облегчение тестирования острой абстиненции и возможность проведения индивидуального мониторинга динамики развития алкогольной зависимости, так как животные могут быть протестированы во время ежедневных периодов лишения этанола (по достижению концентрации алкоголя в крови равной нулю) и затем возвращены в камеры с парами этанола для последующей алкоголизации.

Показатели содержания алкоголя в крови и соответствующие изменения поведения у крыс при содержании животных в парах этанола, которые могут быть визуальными зарегистрированы

«Инттоксикация»		«Детоксикация»	
Поведение			
Концентрация алкоголя в крови (мг%)		Концентрация алкоголя в крови (мг%)	
0–200	Подвижность нормальная, походка нетвердая	150–0	Гипервозбудимость, тремор, ригидность, судороги
200–300	Седация	300–150	Седация
300–400	Атаксия	400–300	Атаксия
400–500	Утрата рефлекса правильного положения тела (боковое положение)	500–400	Утрата рефлекса правильного положения тела (боковое положение)
>500	Кома или смерть	>500	Кома или смерть

Примечание: большинство поведенческих характеристик идентично для восходящего («интоксикация») и нисходящего («детоксикация») участков кривой концентрации алкоголя в крови, за исключением поведения, связанного с низким содержанием алкоголя. Как только уровень алкоголя снижается («детоксикация») до нуля, появляются симптомы синдрома отмены.

По Gilpin №.W. et al., 2008 [23].

В этих условиях (см. пункты 3.2.1., 3.2.2.) оценка эффекта изучаемых веществ осуществляется по динамике нарастания проявлений состояния абстиненции (как критерия уровня развития физической зависимости, пункт 4) после отмены процедуры хронического вдыхания паров этанола у животных контрольной группы, которые могут быть сопоставлены с результатами указанных показателей у животных, которым по выбранной схеме вводили изучаемые вещества ежедневно в процессе алкоголизации.

При данной схеме эксперимента изучаемые вещества вводят за выбранный экспериментатором интервал времени непосредственно перед регистрацией показателей уровня абстинентных проявлений последовательно в период через 24, 48 и 72 ч после отмены хронического вдыхания ими паров этанола.

Интерпретация полученных результатов. Ослабление уровня алкогольной абстиненции указывает на то, что изучаемое вещество в условиях сформированной физической зависимости от этанола способно ослаблять патологические процессы, обусловленные хроническим действием алкоголя. Срок экспозиции животных в парах этанола должен быть определен экспериментально по достижению у них выраженных проявлений абстиненции (пункты 4.1–4.3.). Иными словами, ослабление скорости нарастания проявлений алкогольной абстиненции в данном тесте свидетельствует о том, что изучаемое вещество препятствует формированию физической зависимости от этанола.

Спектр влияния изучаемых веществ на патологические проявления алкогольной абстиненции на тех же животных (пункты 4.1–4.3.) может быть существенно расширен за счет привлечения «батареи» тестов для оценки состояния функции разных систем при отмене этанола (на уровне ЦНС, вегетативной нервной системы, ССС и т.д.), острых эффектов этанола (пункты 1.1–1.7.), уровня толерантности к эффектам этанола (пункт 6.). Проведение такого рода исследований позволит уточнить возможный

спектр влияния искомых веществ на процесс формирования физической зависимости от этанола и ее проявлений в условиях абстиненции, что позволит сформулировать перспективу возможных показаний к их дальнейшему применению.

2.4. Проявления алкогольной абстиненции

Показатели уровня абстинентных проявлений у животных регистрируются после отмены хронического вдыхания ими паров этанола (или иного способа алкоголизации) используя следующие тесты:

2.4.1. Судороги, вызванные «хендлингом»

Исследования проводят на беспородных мышах. Через 2, 4, 6, 8 ч после отмены продолжительного потребления этанола (добровольное потребление в условиях свободного выбора или потребление в условиях ограниченного доступа или содержания в парах этанола) оценивают поведение мышей на наличие судорожных реакций. Каждую мышь поднимают за хвост вертикально и в этом положении вращают на 180 °С. Регистрируют степень выраженности судорог согласно балльной шкале (таблица 4). Изучаемое вещество (исследуемая группа животных), или растворитель в изомерном объеме (контрольная группа) вводят за 2 ч до отмены этанола. Количество животных в каждой группе должно быть не менее 10–12 особей.

Интерпретация полученных результатов:

Уменьшение выраженности судорожных реакций при отмене этанола под действием изучаемого вещества свидетельствует о его способности ослаблять проявления алкогольного абстинентного синдрома.

Таблица 4

Шкала оценки судорожных реакций, вызванных «хендлингом»

Баллы	Характеристика поведения
0	Отсутствие судорог
1	Отсутствие судорог при подъеме за хвост
2	Отсутствие судорог при подъеме за хвост; тонические судороги после вращения на 180°
3	Судороги при подъеме за хвост и после вращения на 180°
4	Тонические судороги при подъеме за хвост
5	Тонико-клонические судороги при подъеме за хвост; запаздывание на 1–2 с
6	Сильные тонико-клонические судороги при подъеме за хвост с быстрым наступлением и длительной продолжительностью
7	Сильные тонико-клонические судороги до поднятия за хвост с быстрым наступлением и большой длительности

По Besheer J. et al., 2009 [24] адаптировано.

При выборе животных для конкретного эксперимента следует учитывать, что, например, мыши линии C57BL/6 относительно устойчивы к индуцированным отменой этанола судорогам, в то время как мыши линии DBA/2J, наоборот, демонстрируют к ним повышенную чувствительность.

2.4.2. Аудиогенные судороги, индуцированные отменой этанола

Эксперименты проводят на крысах. Животным, помещенным в звукоизоляционные камеры, предъявляют звуковой сигнал (интенсивность 50 дБ, частота 10 кГц, продолжительность 90 с) и регистрируют следующие показатели: латентный период возник-

новения и длительность двигательного возбуждения, а также интенсивность судорожных реакций, которую оценивают в баллах: 0 – отсутствие реакции; 1 балл – сильное двигательное возбуждение, безудержный бег, прыжки; 2 балла – клонические судороги в позе «на брюшке», развивающиеся вслед за двигательным возбуждением; 3 балла – двигательное возбуждение, сопровождающееся клоническими судорогами в боковом положении; 4 балла – предыдущие фазы заканчиваются тоническими судорогами [25]. Изучаемые вещества вводят до предъявления звукового раздражителя. Сопоставляют результаты влияния изучаемых веществ на судорожные проявления, полученные у контрольных (не имевших контакта с этанолом) животных, с аналогичными реакциями у животных в период отмены этанола.

Интерпретация полученных результатов. Ослабление судорожных реакций под влиянием изучаемых веществ у животных после отмены этанола указывает на их положительный противосудорожный компонент в отношении токсических эффектов алкоголя.

Таблица 5

Сравнительная эффективность различных противосудорожных средств на моделях судорожных реакций, вызванных отменой этанола

Вещества	ЭД ₅₀ (мг/кг)		Ссылки
	Аудиогенные судороги (крысы)	Судороги, вызванные хенд-лингом (мыши)	
Модуляторы ГАМК-А рецепторов			
Диазепам	–	20	Little et al., 1986 Crabbe et al., 1992
Лоразепам	Нет данных	1	Becker and Veach, 2002
Хлорметиазол	Нет данных	100	Green et al., 1990
Модуляторы Na-каналов			
Фенитоин	50	–	Chu, 1981 Gessner, 1974
Карбамазепин	150	–	Chu, 1979 Grant et al., 1992
Другие противосудорожные средства			
Габапентин	50 (мыши)	Нет данных	Watson et al., 1997
Вальпроевая кислота	Нет данных	300	Goldstein, 1979
Антагонисты NMDA-рецепторов			
Дизоциллин (МК-801)	0,33	0,1	Morrisett et al., 1990 Grant et al., 1992

По Rogawski M., 2005 [26], адаптировано.

2.4.3. Оценка реакции «вздрагивания» при предъявлении звукового сигнала

Указанная процедура позволяет сопоставить влияние изучаемых веществ на характер поведенческой реактивности животных к внешней звуковой стимуляции на фоне хронического потребления этанола, с уровнем их реактивности в период алкогольной абстиненции.

Эксперименты проводят на крысах и/или мышах, используя инструментальную оценку реакции вздрагивания. Установка состоит из платформы, оснащенной датчиками давления, расположенной в звукоизоляционной камере со слабым освещением (10 лк). После 5-минутной адаптации к экспериментальным условиям животные подвергаются

звуковой экспозиции (120 дБ, 240 Гц, продолжительность 50 мсек, количество исследований не менее 10 с произвольным интервалом в 10–20 с). Регистрируют латентный период реакции и величину ответа при предъявлении звукового сигнала. Реакция вздрагивания может оцениваться через 4–72 ч после отмены хронического потребления этанола [27, 28].

В упрощенном виде проводят визуальную оценку поведения мышей в условиях алкогольной абстиненции, которым последовательно предъявляют 5 громких звуковых сигналов с интервалом 16–20 с в момент, когда животное всеми лапами стоит на полу. Параметры звукового воздействия: частота 100 Гц, интенсивность 110 дБ, длительность звукового импульса 0,2 с, время нарастания импульса 0,05 с. Реакцию животных оценивают в баллах: 0 – видимое отсутствие реакции; 1 – замирание; 2 – вздрагивание; 3 – прыжок [12].

Изучаемые вещества вводят в соответствии с позициями, освещенными в пункте 3.2.

Интерпретация полученных результатов. Ослабление под влиянием изучаемых веществ последствий отмены этанола в поведении животных, оцениваемых по реакции «вздрагивания», может рассматриваться в качестве позитивной коррекции состояния повышенной возбудимости как одного из проявлений алкогольной абстиненции.

2.5. Восстановление алкогольной мотивации после лишения доступа к этанолу

Методические подходы, позволяющие изучать процесс восстановления (reinstatement) алкогольной мотивации, направлены на экспериментальное моделирование «срыва» ремиссии у больных алкоголизмом, то есть на восстановление потребления этанола после его депривации.

Для экспериментов используют животных (чаще всего крыс), предварительно подвергшихся хронической алкоголизации и в последующем перенесших различный по времени абстинентный период. В настоящее время для изучения рецидивов алкогольного поведения чаще всего используют алкоголь-депривационную модель и модели восстановления потребления алкоголя (reinstatement models).

2.5.1. Добровольное потребление алкоголя в условиях алкоголь-депривационного эффекта

Алкоголь-депривационный эффект (АДЭ) – реакция животных на повторное предоставление свободного доступа к алкоголю в период абстиненции в виде временного увеличения его потребления по сравнению с предшествующим алкогольной депривации периодом.

Модель позволяет количественно оценить уровень добровольного потребления алкоголя после разных сроков лишения животных контакта с этанолом: на этапе формирования алкогольной мотивации (см. пункт 2.1–2.2.), на этапе развития физической зависимости от этанола в условиях свободного выбора между этанолом и водой (пункт 3.1.) или после ускоренного формирования алкогольной зависимости при пассивном содержании животных в парах этанола (пункт 3.2.). С учетом сказанного время предварительной алкоголизации может варьировать от нескольких дней до 8 месяцев и более; период депривации: от 24 ч до 28 дней.

В период депривации продолжительностью около 3-х суток животных, находящихся в индивидуальных ячейках, снабженных мерными поилками с раствором этанола и водой, лишают доступа к раствору этанола. Через заданный временной интервал в соответствии с выбранной схемой (через 24, 48 или 72 ч после отмены этанола) животным вновь предоставляют раствор этанола. После чего оценку индивидуального потребления жидкостей осуществляют в тех же условиях, что и оценку добровольного потребления алкоголя в условиях свободного выбора между раствором этанола и водой. Количество жидкостей в поилках после предоставления этанола измеряют: через 1,5 ч после начала

индивидуального теста; через 24 ч после начала индивидуального теста; при тесте продолжительностью более суток — каждые последующие 24 ч. Подсчитывают потребление спирта и воды, выражающееся в г/кг в час. Оценивают амплитуду АДЭ в виде разницы между темпом потребления алкоголя в первые 1,5 ч после депривации и таковыми до депривации, а также скорость восстановления потребления алкоголя до уровня, имевшегося перед лишением алкоголя [12].

Изучаемые вещества вводят животным до их тестирования, исходя из предварительно выбранных экспериментатором сроков и способов их использования, в зависимости от известных или предполагаемых свойств взятых на исследование веществ.

В качестве препаратов сравнения для снижения потребления алкоголя в условиях алкоголь-индуцированного восстановления потребления у крыс могут быть использованы налоксон (0,1–10,0 мг/кг)[29] и акампросат (200,0–400,0 мг/кг) [30].

Интерпретация полученных результатов. Предполагается, что АДЭ может рассматриваться как модель рецидива алкоголизма, главным образом потому, что увеличение алкогольной мотивации при абстиненции согласуется с данными КИ о провоцирующем эффекте к повторной алкоголизации даже небольших количеств алкоголя у людей. В этом отношении алкоголь-депривационная модель имеет достаточную прогностическую значимость [31]. Уровень возможного позитивного «противоалкогольного» эффекта у изучаемых веществ оценивают по характеру уменьшения количества добровольно потребляемого раствора этанола в рассматриваемых условиях у получающих ЛС группы животных по сравнению с контрольными животными.

2.5.2. Восстановление потребления этанола в условиях оперантного поведения

Данная методика позиционируется как экспериментальное моделирование у контактирующих с алкоголем животных ситуаций, провоцирующих людей на возобновление потребления алкоголя в условиях ремиссии (запах этанола, его однократная небольшая доза, влияние средовых факторов, стрессовая ситуация) [32].

Методика включает три последовательных этапа:

а) предварительное обучение с использованием пищевой (и/или питьевой) мотивации оперантному поведению — стабильному получению этанола при надавливании животным на педаль;

б) подавление (угасание) условно-рефлекторной реакции на этанол с помощью замещения этанол-содержащих растворов на растворитель или прекращением подачи алкоголя;

в) тестирование уровня алкогольной мотивации в условиях фазы угасания с использованием условно-рефлекторных сигналов, провоцирующих возобновление добровольное потребление алкоголя.

Крыс в начале эксперимента размещают индивидуально в контролируемом по температуре и влажности помещении в условиях 12ч/12 ч суточного цикла (день/ночь). Обучение навыкам оперантного поведения проводят 6 дней в неделю в период с 10:00–14:00. Животные имеют свободный доступ к воде и стандартному корму в домашних клетках за исключением периода обучения нажатия на педаль.

Эксперименты проводят в стандартных камерах для изучения оперантного поведения размером 30,5×24,2×29,2 см. Каждая камера оснащена педалью и контейнером, заполненным гранулированным кормом или раствором этанола.

Обучение крыс нажатия на педаль начинают после пищевой депривации (24 ч). Крысы начинают нажимать на педаль, получая каждый раз по 45 мг гранулированного корма во время 10–20 мин сеанса, направленного на формирование навыка. Обучение проводят дважды в день в течение 4-х дней. После того как животные приобретут навык оперантного поведения, гранулированный корм заменяют на 20% раствор сахарозы (1 сеанс продолжительностью 20 мин) для перехода животных к иному положительному стимулу.

На следующий день крысы получают 5% этанол, смешанный с 0,1% раствором сахарина. За 30 сек до начала сеанса крыс помещают в оперантную камеру без освещения, в которой нажатие на педаль не приводит к каким-либо последствиям. С началом сеанса включают свет, и крысы имеют возможность получать положительное подкрепление в течение 20 мин. При нажатии на педаль животные получают возможность получать однократно по 0,1 мл жидкости. При предоставлении этанола сеанс сопровождается характерным звуковым сигналом (щелчок) и световой вспышкой над контейнером с жидкостью в течение 4 с. Непосредственно перед помещением животных в камеру 6 капель экстракта эфирно-масличного растения (например, мяты или апельсина) распыляют внутри камеры в качестве дифференцирующего стимула, указывающего на присутствие этанола. На протяжении последующих 2-х недель концентрацию этанола постепенно увеличивают так, что в последнем 20-минутном сеансе крысы получают 10% этанол с 0,1% раствором сахарина. Для последующих экспериментов берут животных, потребляющих как минимум 0,5 г/кг алкоголя в пересчете на чистый этанол.

Стимулы, способствующие ускоренному восстановлению самовведения алкоголя.

Использование этанола в качестве условного стимула.

Через 4–8 дней (фаза затухания) этанол в дозе 0,48 г/кг (в/б и интрагастрально) восстанавливает потребление алкоголя у крыс. Эффект провоцирующей дозы этанола умеренный и во многом определяется сопутствующими стимулами, ассоциирующимися с алкоголем [33].

Использование факторов окружающей среды в качестве условных стимулов.

Обучение животных нажатию на педаль для получения алкоголя или воды сопровождается подачей характерного звукового (например, 70 дБ), визуального (например, световая вспышка в течение 5,0 с) или/и обонятельного (например, запах 5–6 капель 10% этанола или экстракта апельсина) сигнала. Во время фазы затухания условно-рефлекторной реакции нажатие на педаль не сопровождается определенными стимулами и предоставлением этанола или воды. Восстановлению алкогольной мотивации способствует предъявление преимущественно обонятельных стимулов [34].

Использование стресса в качестве условного стимула.

В качестве стрессорирующего фактора используют переменные удары током (5 или 15 мин). В отличие от провоцирующей дозы этанола, данная стрессовая ситуация значительно восстанавливает самовведение алкоголя у крыс, не влияя на параметры потребления сахарозы в аналогичных условиях [35].

В зависимости от конкретной задачи исследования изучаемые вещества вводят до или после применения указанных стимулов перед тестированием характера ускоренного восстановления самовведения этанола.

2.5.3. Изучение влияния фармакологических веществ на «угасание» этанол-индуцированного подкрепления

Крысы (n=12) получают раствор этанола, как описано выше, в течение 4-х недель. Эти условия обуславливают комплекс стимулов (обонятельных, зрительных и звуковых), специфически сопряженных с потреблением этанола. Животных делят на 2 группы (n=6) в соответствие с потреблением этанола за последние 7 дней. Через 4 недели после формирования условной реакции животных лишают каких-либо стимулов и подкрепления при нажатии на педаль («фаза угасания») в течение 5 дней, во время которых за 10 мин до помещения в камеру одна группа животных получает инъекцию растворителя (контроль), а другая — изучаемого вещества. После окончания сеансов «угасания» в течение последующих 4-х дней изучают влияние условных стимулов на восстановление потребления этанола в отсутствии изучаемого вещества (или растворителя). Все сеансы восстановления потребления начинаются с предоставления соответствующего обонятельного стимула, помещенного в камеру за 10 мин до тестирования. Во время тестирования в камере сохраняется стандартное освещение, и каждое нажатие на педаль сопровождается звуковым и зрительным стимулом.

В качестве препарата сравнения, препятствующего восстановлению потребления этанола, используют налтрексон [36, 37].

Интерпретация полученных результатов. Замедление скорости восстановления объемов добровольного потребления животными этанола в условиях оперантного поведения можно рассматривать как проявление возможной «противоалкогольной» активности у изучаемых веществ. В случае получения позитивных результатов при введении этих веществ до предъявления условной стимуляции можно предполагать наличие протективных свойств у данных препаратов. При введении изучаемых веществ после окончания воздействия указанных стимулов последующее ослабление самовведения этанола следует расценивать как купирование этими веществами последствий стимулов, ускоряющих восстановление его «потребления». Следует отметить, что такие выводы можно сделать при условии, если рассматриваемые вещества *per se* в аналогичных условиях у контрольных животных, но без применения соответствующих стимулов, не оказывают влияния на реакцию добровольного восстановления самовведения этанола.

3. Дополнительные методы

3.1. Развитие толерантности к действию этанола

Оценка влияния фармакологических веществ на уровень толерантности к алкоголю осуществляется через 24, 48 и 72 ч после отмены этанола по окончании процессов формирования алкогольной мотивации, а также по окончании формирования физической зависимости от этанола. Указанная оценка в зависимости от поставленной задачи может быть проведена с использованием тестов для изучения острых эффектов этанола по характеру продолжительности алкогольного наркоза, показателям его фармакокинетики, с помощью поведенческих тестов по изучению уровня алкогольной интоксикации, а также с применением стандартных методов инструментальной оценки артериального давления, ЭКГ, частоты дыхательных движений у животных.

3.2. Электрофизиологическая регистрация структуры сна в условиях длительной алкоголизации и в период алкогольной абстиненции

Электрофизиологическая оценка структуры сна на различных этапах алкоголизации животных, а также динамика изменений циклов сна отражают начальные и последующие стадии экспериментального алкоголизма вплоть до развития физической зависимости [38].

В исследовании используют крыс с устойчиво сформировавшейся алкогольной мотивацией вследствие добровольной (не менее 6 месяцев потребления 15% раствора этанола) или принудительной (содержание в парах этанола) алкоголизации. Животных оперируют под нембуталовым наркозом, вживляя им хронические электроды в гиппокамп с координатами (Р 4,9; L 3,5; Н 3,0) [39] и в дорсальную группу шейной мускулатуры для последующей непрерывной 4-х часовой электрофизиологической регистрации структуры сна. Через неделю после операции и 3-х дневной адаптации к экспериментальным условиям регистрируют картину сна с учетом основных параметров: 1) общее время сна (ОВС), мин; 2) время фазы медленного сна (ФМС), мин; 3) время фазы быстрого сна (ФБС), мин; 4) число эпизодов ФБС; 5) среднюю длительность эпизодов ФБС, мин; 6) латентный период ФБС, мин; 7) среднее время сна без пробуждений за ОВС, мин (глубина сна); 8) общее время бодрствования, мин; 9) число пробуждений; 10) среднюю продолжительность пробуждений, мин; 11) латентный период первого цикла «ФМС-ФБС», мин (процесс засыпания).

Анализ структуры сна проводят на фоне потребления, а также во время лишения доступа к этанолу. Изучаемые соединения вводят до начала регистрации перечисленных показателей структуры сна.

В этих условиях этанол *per se* в дозе 2,25 г/кг нарушает структуру сна как при однократном, так и при многократном его введении, вызывая следующие изменения:

- сокращение ОВС;
- уменьшение отдельных эпизодов ФБС;
- удлинение латентного периода ФБС;
- увеличение времени бодрствования.

При абстиненции после добровольной алкоголизации на протяжении 8 месяцев и более возникают резкие расстройства сна, которые проявляются в наибольшей степени в 1-й и 7-й дни после отмены этанола. Сокращаются ОВС, ФМС, ФБС, число эпизодов ФБС.

Рассматриваемый метод может быть применен для оценки влияния изучаемых веществ на электрофизиологическую структуру сна в условиях изучения острых эффектов этанола (см. пункты 1.5–1.7.), на этапе формирования алкогольной мотивации (пункты 2.1.; 2.2.), в условиях сформированной физической зависимости от этанола (см. пункты 3.1.; 3.2;) и при алкогольной абстиненции.

Интерпретация полученных результатов. Ослабление перечисленных выше параметров нарушенного этанолом сна в указанных условиях в виде увеличения представленности ФМС и ФБС, сокращения длительности пробуждений и сокращения времени бодрствования под действием изучаемых соединений может свидетельствовать об эффективности этих веществ в плане нормализации структуры сна, нарушаемой в процессе острой или хронической, насильственной или добровольной алкоголизации животных.

4. Биохимические методы

4.1. Влияние фармакологических веществ на фармакокинетику этанола

Показатели фармакокинетики этанола косвенно отражают процессы, связанные с его всасыванием с места поступления, распределением в тканях, скоростью его деградации, выведением его составляющих в виде неизмененного продукта и его метаболитов из организма. При изучении влияния фармакологических веществ на фармакокинетику этанола следует иметь в виду, что их эффект можно рассматривать как воздействие на общие механизмы деградации алкоголя с участием перечисленных процессов.

4.1.1. Метод газовой хроматографии

Кровь, взятая из хвостовой вены крыс или мышей (6 μ л) и стандарты (6 μ л; от 0 до 300 мг/100 мл) смешивают с 375 μ л дистиллированной воды и 0,5 г NaCl в 12 \times 75 мм пробирках из боросиликатного стекла. Закрытые пробирки нагревают при температуре 55 °С в течение 10 мин на водяной бане, затем из них пластиковым шприцом извлекают 1,5 мл газовой фазы и сразу вводят в газовый хроматограф с пламенно-ионизационным детектором, оснащенный внешним адаптером и 1,0 мл внешней загрузочной петлей. Скорость потока водорода, газа-носителя и внутреннего генератора воздушного потока составляет 13,3, 25 и 250 мл/мин соответственно. Максимальное время удерживания 2 мин. Площадь под кривой рассчитывают при помощи стандартных программ (например, SRI Peak Simple software для Windows) [40].

4.1.2. Спектрофотометрический метод

Образцы крови (40 микролитров), взятой из хвостовой вены, смешивают с 3% перхлорной кислотой (конечный объем 200 микролитров) и хранят при 4 °С до определения содержания алкоголя с помощью ферментативного анализа. Образцы (20 микролитров) инкубируют в 1 мл 0,5 М Tris HCl буфере (pH 8,8), содержащем 5,5 микрограммов/мл алкогольдегидрогеназы и 1,5 мМ β -NAD в течение 40 мин при комнатной температуре. Содержание алкоголя в образце определяют по количеству β -NAD, измеряемому спектрофотометрически при длине волны 340 нм. Концентрацию алкоголя в крови определяют с помощью стандартной калибровочной кривой (0–500 мг %).

4.2. Влияние изучаемых веществ на вызываемые этанолом изменения активности этанол-окисляющих ферментов при алкогольной интоксикации

Предметом изучения становится уровень активности конкретных ключевых ферментов, определяющих метаболизм этанола, а именно АДГ и АЛДГ.

4.2.1. Влияние изучаемых веществ на активность этанол-метаболизирующего фермента цитохрома P450 2E1, выделенного из печени животных (ex vivo)

Хроническое потребление этанола приводит к увеличению содержания CYP2E1 апо-протеина и мРНК.

4.2.1.1. Приготовление фракций печени S10

Животных подвергают эвтаназии путем смещения шейных позвонков. Извлекают печень и гомогенизируют в 50 м МTris-HCl буфере (рН 7,5), содержащем 0,25 М сахарозы, 25 м М KCl и 3 м М MgCl₂. Гомогенаты центрифугируют при 2000 × g в течение 10 мин при 4 °С. Осадок, содержащий клеточные ядра, отбрасывают и супернатант центрифугируют при 10 000 × g в течение 10 мин при 4 °С. Осадок, содержащий митохондрии, отбрасывают и собирают супернатант (S10 фракция). Концентрацию белка во фракции S10 определяют по методу Бредфорда [41]. Известное количество белка немедленно обрабатывается для определения активности фермента CYP2E1.

4.2.1.2. Ферментный анализ цитохрома P450 2E1

Анализ ферментативной активности цитохрома P450 2E1 проводят на фракциях печени S10 (n=6–11 для каждой группы) согласно описанию Chang et al. (1998) [42]. Известное количество белка из контрольной и подвергнутой алкоголизации печеночной фракции S10 инкубируют с 100 μМ р-нитрофенола в присутствии NADPH-образующей системы при 37 °С на водяной бане. В конце инкубации ферментативную реакцию останавливают путем добавления трихлоруксусной кислоты и образцы центрифугируют при 10 000 × g в течение 5 мин. К известному объему супернатанта добавляют 2 М NaCl и регистрируют активность спектрофотометрически при длине волны 535 нм. Гидроксилирование р-нитрофенола (субстрат) до р-нитрокатехола (продукт) в определяемых образцах рассчитывают в соответствии с калибровочной кривой для р-нитрофенола (0,1–20 нмоль), которую анализируют одновременно с неизвестными образцами. Активность фермента CYP 2E1 выражается в виде нмоль продукта/мин/г S10 белка.

4.3. Определение активности алкогольдегидрогеназы (АДГ) и альдегид дегидрогеназы (АЛДГ) в печени (ex vivo)

Гомогенаты печени готовят в фосфатно-сахарозном буфере, содержащем 1% Тритон X-100 и 1 нМ меркаптоэтанол, и центрифугируют при 10 000 × g в течение 30 мин. Для определения активности АДГ и АЛДГ супернатанты анализируют по образованию NADH спектрофотометрически при длине волны 340 нм. АДГ активность измеряется при рН 8,5 в пирофосфатно-глициновом буфере с 50 мМ этанола и 1 мМ 4-метилпиразолом в референтной кювете. АЛДГ определяют при рН 8,8 в присутствии 0,5 мМ 4-метилпиразола и 1 мМ меркаптоэтанол, используя 0,5 мМ ацетальдегид в качестве субстрата [43, 44].

Интерпретация результатов изучения фармакокинетики этанола и активности этанол-метаболизирующих ферментов. Использование метода газовой хроматографии (пункт 8.1.) позволяет регистрировать влияние изучаемых веществ на обусловленные этанолом процессы с помощью фармакокинетических показателей, которые отражают характер их влияния на всасывание, распределение, катаболизм и выделение метаболитов этанола; в случае использования энзиматического подхода косвенно (пункт 8.2.) исследуют характер влияния изучаемых веществ на активность

специфического фермента, АДГ или АДДГ. Дополняя друг друга, результаты этих исследований дают возможность оценить эффективность изучаемых веществ в отношении процессов, связанных с действием этанола.

Учитывая определяющую роль АДГ и АДДГ в регуляции уровней содержания алкоголя в организме, интерпретация полученных данных может рассматриваться с позиций подавления или активации функций указанных ферментов. В случае активации АДГ можно рассчитывать на ускорение метаболизма этанола (например, уменьшение продолжительности алкогольного наркоза или ослабление действия этанола в условиях алкогольной комы). При активации под влиянием изучаемых веществ функции АДДГ можно предположить ускоренную деградацию ацетальдегида и, тем самым, ослабление проявлений токсических эффектов метаболита этанола, с которым связывают основные проявления алкогольной абстиненции. В качестве препаратов сравнения могут быть использованы пиразол (ингибитор АДГ) и дисульфирам (ингибитор АДДГ).

Заключение

Алгоритм скрининга фармакологических веществ по выявлению у них возможных «противоалкогольных» свойств

До проведения исследований по выявлению возможных средств для лечения экспериментального алкоголизма и его патологических проявлений следует иметь в виду, что в эксперимент могут быть взяты только вещества, у которых их эффективные дозы не должны превышать 1/20 от ЛД₅₀. Перед началом экспериментов желательно иметь сведения об известных фармакологических свойствах веществ, взятых для исследования, что поможет спланировать последовательность проведения скрининга по тестам, представленным в Методических рекомендациях, или усомниться в целесообразности осуществления указанных исследований.

Первичный скрининг

Первичный скрининг представляет собой необходимые и достаточные исследования, которых позволяют выявить элементы возможной «противоалкогольной» активности у изучаемых веществ и оценить перспективы проведения дальнейшего более подробного их изучения.

А. Выявление свойств, ослабляющих тяжелую алкогольную интоксикацию

Влияние фармакологических веществ на различные уровни алкогольной интоксикации у животных в условиях свободного поведения.

Влияние фармакологических веществ на различные уровни алкогольной интоксикации у животных в условиях алкогольного наркоза, при алкогольной коме и на выживаемость при субтоксических дозах этанола.

Б. Выявление средств для купирования негативных последствий у животных, перенесших острую алкогольную интоксикацию.

В. Выявление фармакологических веществ, влияющих на процесс формирования алкогольной мотивации при «субхроническом» использовании этанола.

Г. Выявление фармакологических веществ, влияющих на активность этанол-метаболизирующих систем (пункты 9.1–9.2.).

Расширенные исследования

Направлены на проведение подробного изучения «противоалкогольных» свойств веществ, выявленных на этапе первичного скрининга, с помощью методов, позволяющих оценить указанные свойства на экспериментальных моделях алкогольной зависимости, абстиненции, восстановления алкогольной мотивации после лишения доступа к этанолу, толерантности, нарушений структуры сна в этих условиях.

Каждая из перечисленных моделей может составить предмет отдельного исследования, если экспериментатор намерен ограничиться рассмотрением конкретной связанной с алкоголизмом позиции, обозначенной в представленных Методических рекомендациях.

Таким образом, в случае выявления позитивных «противоалкогольных» эффектов у исследуемых веществ, полученные данные позволят на доклиническом уровне очертить возможные показания к их использованию и оценить потенциальную перспективу клинического применения этих веществ в качестве средств для лечения алкоголизма у людей.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Garbutt J.C., West S.L., Carey T.S., Lohr K. N., Crews F.T. Pharmacological Treatment of Alcohol Dependence. A Review of the Evidence. *JAMA*. 1999; 281: 1318–1325.
2. Приказ по МЗ СССР № 63 от 10 марта 1966 г. «О нормах кормления лабораторных животных и продуцентов».
3. Goodwin F.L., Amir S., Amit Z. Environmental lighting has a selective influence on ethanol intake in rats. *Physiol Behav*, 1999 ; 66(2): 323–8.
4. Буров Ю.А., Ведерникова Н.Н. Экспериментальное моделирование алкоголизма. В кн.: Нейрохимия и фармакология алкоголизма. М.: Медицина, 1985. — С. 5–42.
5. Sprague J.E., Maickel R.P. Effects of stress and ebitatide (Hoe-427) on free-choice ethanol consumption: comparison of Lewis and Sprague-Dawley rats. *Life Sci*, 1994; 55(11): 873–8.
6. Parker L.F., Radow B.L. Isolation stress and volitional ethanol consumption in the rat. *Physiol Behav*, 1974 Jan; 12(1): 1–3.
7. Кампов-Полевой А.Б. Изучение особенностей формирования алкогольной мотивации у крыс. — В кн.: Фармакология экспериментального алкоголизма/Под ред. Ю.В. Букова. М., 1982, С. 130–135.
8. Mardones J., Segovia-Riquelme N. Thirty-two years of selection of rats by ethanol preference: UChA and UChB strains. *Neurobehav Toxicol Teratol*, 1983 Mar-Apr; 5(2): 171–8.
9. Metten P., Best K.L., Cameron A.J. et al. Observer-rated ataxia: rating scales for assessment of genetic differences in ethanol-induced intoxication in mice. *J Appl Physiol* 2004; 97: 360–368.
10. Rustay N.R., Wahlsten D., Crabbe J.C. Assessment of genetic susceptibility to ethanol intoxication in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100(5): 2917–22.
11. Moore E.M., Serio K.M., Goldfarb K.J. et al. GABAergic modulation of binge-like ethanol intake in C57BL/6J mice. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007; 88(1): 105–113.
12. Майский А.И., Салимов Р.М. Методические указания по изучению препаратов для лечения алкоголизма. В кн. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ (под ред. Р.У. Хабриева). — М., 2005. — С. 342–356.
13. Буров Ю.В., Жуков В.Н., Кампов-Полевой А.Б. Методические рекомендации по экспериментальному (фармакологическому) изучению препаратов, предлагаемых для клинической апробации в качестве средств для лечения и профилактики алкоголизма. — М., 1980. — С. 1–21.
14. Rhodes J.S., Best K., Belknap J.K., Finn D.A., Crabbe J.C. Evaluation of a simple model of ethanol drinking to intoxication in C57BL/6J mice. *Physiol Behav*. 2005; 84(1): 53–63.
15. Hendrickson L.M., Zhao-Shea R., Tapper A.R. Modulation of ethanol drinking-in-the-dark by mecamylamine and nicotinic acetylcholine receptor agonists in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2009; 204(4): 563–72.
16. Blednov Y.A. and Harris R.A. Metabotropic glutamate receptor 5 (mGluR5) regulation of ethanol sedation, dependence and consumption: relationship to acamprosate actions. *Int J Neuropsychopharmacol*. 2008; 11(6): 775–793.
17. Kamdar N.K., Miller S.A., Syed Y.M., Bhayana R., Gupta T., Rhodes J.S. Acute effects of naltrexone and GBR 12909 on ethanol drinking-in-the-dark in C57BL/6J mice. *Psychopharmacology (Berl)*. 2007; 192(2): 207–17.
18. Spanagel R. & Holter S.M. Pharmacological validation of a new animal model of alcoholism. *J Neural Transm*. 2000; 107, 669–680.
19. Cicero T.J., Snider S.R., Perez V.J., Swanson L.W. Physical dependence on and tolerance to alcohol in the rat. *Physiol Behav*. 1971 Feb; 6(2): 191–8.

20. Crabbe J.C., Metten P., Rhodes J.S., Yu C.H., Brown L.L., Phillips T.J., Finn D.A. A line of mice selected for high blood ethanol concentrations shows drinking in the dark to intoxication. *Biol Psychiatry*. 2009 Apr 15; 65(8): 662–70.
21. O'Dell L.E., Roberts A.J., Smith R.T., Koob G.F. Enhanced alcohol self-administration after intermittent versus continuous alcohol vapor exposure. *Alcohol Clin Exp Res* 2004; 28: 1676–168.
22. Roberts A.J., Heyser C.J., Koob G.F. Operant self-administration of sweetened versus unsweetened ethanol: Effects on blood alcohol levels. *Alcohol Clin Exp Res* 1999; 23: 1151–1157.
23. Gilpin N.W., Richardson P.N., Cole M., and Koob G.F. Vapor Inhalation of Alcohol in Rats. *Curr Protoc Neurosci*. 2008 July ; Chapter 9: Unit9. 29.
24. Besheer J., Lepoutre V., and Hodge C.W. Preclinical Evaluation of Riluzole: Assessments of Ethanol Self-Administration and Ethanol Withdrawal Symptoms. *Alcohol Clin Exp Res*. 2009; 33(8): 1460–1468.
25. Крушинский Л.В. Формирование поведения животных в норме и патологии. — М.: Изд-во МГУ, 1960. — С. 264.
26. Rogawski M.A. Update on the Neurobiology of Alcohol Withdrawal Seizures. *EpilepsyCurrents*. 2005; 5(6): 225–230.
27. Rassnick S., Koob G.F., Geyer M.A. Responding to acoustic startle during chronic ethanol intoxication and withdrawal. *Psychopharmacology (Berl)*. 1992; 106(3): 351–8.
28. Chester J.A., Blose A.M., Froehlich J.C. Effects of chronic alcohol treatment on acoustic startle reactivity during withdrawal and subsequent alcohol intake in high and low alcohol drinking rats. *Alcohol Alcohol*. 2005; 40(5): 379–87.
29. Holter S. M., Spanagel R. Effects of opiate antagonist treatment on the alcohol deprivation effect in long-term ethanol-experienced rats. *Psychopharmacology*. 1999; 145: 360–369.
30. Heyser C.J., Schulteis G., Durbin P., Koob G.F. Chronic acamprosate eliminates the alcohol deprivation effect while having limited effects on baseline responding for ethanol in rats. *Neuropsychopharmacology*. 1998; 18: 125–133.
31. Le A.D., Shaham Y. Neurobiology of relapse to alcohol in rats. *Pharmacology & Therapeutics*. 2002; 94: 137–156.
32. Stewart J. Pathways to relapse: the neurobiology of drug- and stress induced relapse to drug-taking. *J Psychiatry Neurosci*. 2000; 25, 125–136.
33. Le A.D., Poulos C.X., Harding S., Watchus W., Juzytsch W., Shaham Y. Effects of naltrexone and fluoxetine on alcohol self administration and reinstatement of alcohol seeking induced by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Neuropsychopharmacology*. 1999; 21, 435–444.
34. Katner, S. N., & Weiss, F. Ethanol-associated olfactory stimuli reinstate ethanol-seeking behavior after extinction and modify extracellular dopamine levels in the nucleus accumbens. *Alcohol Clin Exp Res*. 1999; 23: 1751–1760.
35. Le A.D., Quan B., Juzytsch W., Fletcher P.J., Joharchi N., Shaham Y. Reinstatement of alcohol-seeking by priming injections of alcohol and exposure to stress in rats. *Psychopharmacology*. 1998; 135, 169–174.
36. Bienkowski P., Kostowski W., Koros E. Ethanol-reinforced behaviour in the rat: effects of naltrexone. *Eur J Pharmacol*. 1999; 374: 321–327.
37. Burattini C., Gill T.M., Aicardi G., Janak P.H. The ethanol self-administration context as a reinstatement cue: acute effects of naltrexone. *Neuroscience*. 2006; 139(3): 877–87.
38. Viglinskaya I.V. Experimental approaches to the evaluation of alcohol abuse and dependence development. *Drug Alcohol Depend*. 1992; 30(2): 111–5.
39. De Groot J. *The Rat Forebrain in Stereotaxic Coordinates*. N.V. Noord-Hollandsche Uitgevers. Maatschappij-Amsterdam, 1959.
40. Dennis R. Sparta, Angela M. Sparrow, Emily G. Lowery, Jon R. Fee, Darin J. Knapp, and Todd E. Thiele. Blockade of the Corticotropin Releasing Factor Type Receptor Attenuates Elevated Ethanol Drinking Associated With Drinking in the Dark Procedures. *Alcohol Clin. Exp Res*. 2008; 32(2): 259–265.
41. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem*. 1976; 72, 248–54.
42. Chang T.K., Crespi C.L., Wa[man] D.J. Spectrophotometric analysis of human CYP2E1-catalyzed p-nitrophenol hydroxylation. *Methods Mol. Biol*. 1998; 107, 147–52.
43. Lumeng L., Bosron W.F., Li T.K. Rate-determining factors for ethanol metabolism *in vivo* during fasting. *Adv. Exp. Med. Biol*, 1980; 132: 489–496.
44. Lindros K.O., Badger T., Ronis M., Ingelman-Sundberg M., Koivusalo M. Phenethylisothiocyanate, a new dietary liver aldehyde dehydrogenase inhibitor. *J Pharmacol. Exp Ther*. 1995; 275(1): 79–83.

ГЛАВА 20

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ МЕСТНОАНЕСТЕЗИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: академик РАМН Ю.Д. Игнатов; к. м. н. В.А. Волчков;
член-корр. РАМН П.А. Галенко-Ярошевский; к. м. н. А.Н. Кубынин;
к. м. н. К.Н. Мельников; д. м. н., проф. Ю.Р. Шейх-Заде*

Введение

Исходя из потребностей клиники, в последнее время все большее значение приобретает изыскание новых местноанестезирующих средств (МС) и их лекарственных форм пролонгированного действия. Актуальность и перспективность создания пролонгированных МС определяется их использованием для лечения хронических болевых синдромов, в послеоперационном периоде, при транспортировке больных и т.д.

Многие из МС проявляют активность практически при всех видах местной анестезии. Однако данные экспериментальных исследований и практика местной анестезии у людей показывают, что у ряда веществ местноанестезирующая активность (МА) может быть неодинаковой при разных видах анестезии. Так, некоторые МС, высокоактивные при инфильтрационной и проводниковой анестезии, оказываются малоактивными при терминальной, поскольку плохо проникают через кожу и слизистые оболочки. В связи с этим одним из требований, предъявляемых к МС, является достаточная активность, обеспечивающая в условиях определенного вида анестезии (терминальной, инфильтрационной, проводниковой) возможное проведение безболезненного хирургического вмешательства и различных врачебных манипуляций.

Практический опыт местной анестезии свидетельствует, что МС обладают токсичностью, которая, как правило, возрастает параллельно с ростом МА и складывается из проявлений их резорбтивного действия (наиболее опасные — воздействие на ЦНС и кардиодепрессорные эффекты) и местнораздражающих эффектов вплоть до некробиотического действия.

1. Критерии оценки местноанестезирующего эффекта

Одной из главных характеристик, подлежащих оценке в процессе скрининга новых соединений, является характеристика их МА, отражающая величины основных специфических проявлений фармакологического эффекта: глубины (силы) анестезии, скорости наступления анестезии и ее продолжительности. Эти показатели рассматриваются в качестве главных критериев оценки вещества в эксперименте.

Глубина местноанестезирующего эффекта — вызываемое веществом ослабление ноцицептивной (болевой) реакции (вплоть до ее полного исчезновения) в сравнении с исходными значениями этой реакции в ответ на ноцицептивную стимуляцию участка ткани, на который локально воздействует вещество. Глубина эффекта оценивается по обусловленным веществом изменениям показателя величины внешних стимулов, вызывающих пороговое проявление болевой реакции, и чаще всего выражается в процентах от исходных (фоновых) значений этого показателя, или в иных единицах, характеризующих его изменения.

Скорость наступления анестезии — интервал времени между введением или нанесением на поверхность изучаемого вещества и началом проявления его МА. Латентный пе-

риод действия МС зависит от способа их введения и является наибольшим при аппликации вещества на кожные покровы или слизистые оболочки. У большинства препаратов эффект развивается в пределах нескольких минут.

Продолжительность анестезии — период времени от момента развития местной анестезии до ее исчезновения. При проведении скрининга новых соединений необходимо учитывать, что продолжительность действия не может быть беспредельной и во всех случаях необходимо добиваться полного восстановления чувствительности. Поэтому при исследовании новых веществ пролонгированного действия особого внимания требует выбор адекватных моделей, которые позволяют достоверно оценивать МА в течение длительного периода времени. При изучении МС длительного действия целесообразно увеличивать интервалы времени между повторными тестированиями эффекта, что позволит снизить трудоемкость исследования.

При экспериментальной оценке МС в зависимости от выбранного метода исследования используют определенные показатели, количественно отражающие их активность: $ЭК_{50}$ и $ЭК_{100}$ — средние эффективные концентрации вещества, вызывающие соответственно 50-процентный и 100-процентный эффекты; МЭК — минимальные эффективные концентрации, вызывающие местноанестезирующее действие; $ЭД_{50}$ и $ЭД_{100}$ — средние эффективные дозы, отражающие количество вещества (в мг) в 1 мл раствора или на 1 кг массы животного, вызывающее соответственно 50-процентный и 100-процентный местноанестезирующие эффекты.

Наряду с исследованием МА новых соединений необходимо оценивать выраженность их местнораздражающего и резорбтивного действия ($ЛД_{50}$ — средняя летальная доза, отражающая количество вещества, вызывающее гибель 50% животных). При этом следует учитывать, что новые соединения в концентрациях, предлагаемых для клинического применения, не должны обладать местнораздражающим эффектом. При рассмотрении токсикологических характеристик и активности нового вещества следует иметь в виду, что в практическом отношении интерес могут представлять только те соединения, терапевтическая широта которых существенно больше, чем у эталонных препаратов.

2. Значение некоторых физико-химических характеристик новых соединений при скрининге МА

Известно, что активность МС зависит от ряда их физико-химических свойств. Между такими физико-химическими свойствами МС, как растворимость в воде, величина рН раствора, липофильность, способность к распределению в ткани, поверхностная активность, способность к абсорбции, влияние на проницаемость ионных каналов мембраны и их анестезирующими свойствами существует симбатная зависимость.

Некоторые характеристики физико-химических свойств веществ, имеющие наиболее важное значение для начальных этапов исследования.

Растворимость. Для скрининга МС прежде всего необходимо выбирать водорастворимые соединения, поскольку именно растворы местных анестетиков наиболее широко применяются в клинике. Однако и малорастворимые в воде соединения могут представлять определенный интерес для создания средств для терминальной анестезии, но в соответствующей лекарственной форме.

рН раствора. Большинство МС являются хлористоводородными солями, растворы которых наиболее стабильны при рН 3,5–6,0. Так как все МС являются основаниями, то при сдвиге рН в сторону более высоких значений увеличивается концентрация свободного основания в соответствии с их значениями pK_a , в результате чего возрастает их проникающая способность. При низких значениях рН активность соединений, как правило, уменьшается, и при этом возможно появление или усиление их местнораздражающего действия. Поэтому большие отклонения рН опытных растворов от рН изотонического раствора натрия хлорида могут повлиять на результаты исследования, особенно при изучении МА на изолированных нервах и на моделях терминальной анестезии.

Концентрация растворов. Скрининг МС целесообразно проводить в растворах тех концентраций, в которых применяются эталонные препараты: для терминальной анестезии в интервале от 0,25% до 2–5%, для инфильтрационной и проводниковой — от 0,125 % до 1–2%. При этом начинать исследование следует с 1% растворов и в зависимости от полученных результатов, отражающих активность и местнораздражающее действие нового соединения, проводить последующее изучение свойств препаратов в более высоких или более низких концентрациях.

Наиболее ценным показателем при сравнении исследуемого вещества с эталонным препаратом является сопоставление их в эквивалентных концентрациях (процентных и молярных). Соотношение токсической и эффективной доз (LD_{50}/ED_{50} , терапевтический индекс) изучаемого вещества позволяет представить его терапевтическую широту и определить максимально возможный безопасный объем вводимого раствора в конкретной эффективной концентрации.

В исследованиях, в которых выявляется зависимость «доза–эффект» может быть определена минимальная эффективная концентрация, а также время достижения максимальной эффективной концентрации, отражающее фармакокинетические характеристики препарата.

3. Задачи и прогностическое значение методов первичного скрининга и углубленного изучения местных анестетиков

Исследования, проводимые в рамках скрининга МС, могут быть подразделены на три этапа: альтернативное выявление местноанестезирующего эффекта, первичный скрининг и углубленное изучение.

Альтернативное выявление местноанестезирующего эффекта новых соединений предполагает использование простейших методов, позволяющих осуществить ориентировочный отбор соединений, представляющих интерес для дальнейшего изучения. С этой целью могут использоваться методы, подробно изложенные в различных руководствах (20, 25, 33), включая практикумы для студентов медицинских ВУЗов. Большинство этих методов позволяет установить только сам факт МА у нового соединения. В случае положительного результата необходимо проведение более детального исследования на моделях первичного скрининга.

Первичный скрининг — позволяет изучить активность новых соединений при различных видах анестезии, определить скорость развития и продолжительность действия в сравнении с эталонными препаратами, выявить местнораздражающие и резорбтивные эффекты и рассчитать терапевтическую широту. Методы первичного скрининга должны отличаться простотой выполнения, экономичностью и большой «пропускной» способностью.

Углубленное изучение — проводят на последних этапах доклинического исследования новых соединений, у которых была выявлена достаточная МА. На этапе углубленного изучения используют методы, моделирующие потенциальное применение препарата в клинических условиях по предлагаемому целевому назначению.

4. Выбор эталонных препаратов при скрининге местных анестетиков

Большинство МС обладает активностью при всех видах местной анестезии. Однако на практике используется принцип относительно специализированного применения отдельных препаратов для каждого вида анестезии. В соответствии с этим при скрининге новых МС необходимо дифференцированно подходить к выбору «эталонных» препаратов — препаратов сравнения.

Для терминальной (поверхностной, аппликационной) анестезии в клинике преимущественно применяют бензокаин (анестезин), тетракаин (дикаин), бумекаин (пиромекаин) и лидокаин. В качестве «эталонного» препарата для данного вида анестезии при исследовании водорастворимых веществ следует использовать тетракаин (дикаин). Ди-

каин — высокоактивный препарат при анестезии слизистых оболочек, но он высокотоксичен. Следовательно, при создании новых средств для этого вида анестезии перспективным будет изыскание соединений, равных или превышающих по активности дикаин, обладающих длительным эффектом и значительно менее токсичных.

Из применяемых в настоящее время в Российской Федерации анестетиков в наибольшей степени удовлетворяют требованиям инфильтрационной анестезии тримекаин, лидокаин и артикаин (ультракаин). Однако их существенным недостатком является относительно небольшая продолжительность действия и сравнительно высокая токсичность, которая в два и более раза превышает таковую у прокаина (новокаина). Поэтому для этого вида анестезии также необходим поиск веществ, по активности и продолжительности действия превышающих тримекаин, лидокаин и артикаин, но более безопасных.

В качестве «эталонных» препаратов для проводниковой и спинномозговой анестезии следует использовать бупивакаин (маркаин), ропивакаин (наропин), или менее активные артикаин, лидокаин, тримекаин. Бупивакаин вызывает длительную (до 8 и более ч) анестезию, но при его применении могут наблюдаться проявления нежелательного резорбтивного действия. В связи с этим необходимо изыскание новых соединений, менее токсичных и не уступающих по силе и продолжительности эффекта бупивакаину.

5. Исследование местноанестезирующей активности соединений на различных моделях

Учитывая, что МС применяются при различных видах местной анестезии, для скрининга новых соединений необходимо использовать методы, моделирующие поверхностную, инфильтрационную, проводниковую, эпидуральную и спинномозговую анестезию.

5.1. Модели поверхностной (терминальной) анестезии

5.1.1. Комбинированное (одновременное) выявление поверхностной местноанестезирующей активности вещества на роговице глаза кролика по методу Regnier и его местнораздражающего действия по методу Setnicar

В исследовании используют наркотизированных кроликов-самцов массой 2,0–2,5 кг. Кролика помещают в специальный ящик с отверстием, фиксирующим голову. Определяют порог чувствительности роговицы глаза кролика к тактильному воздействию. С этой целью применяют различные приспособления. Ренье рекомендовал конский волос, другие исследователи предпочитают нейлоновую нить (леску), конец которой оплавливают в пламени горелки до сгибания, или стеклянную палочку с шарообразным окончанием диаметром 1,5 мм, или тонкую металлическую проволоку с окончанием в виде петли. При проведении исследований необходимо использовать одно стандартное приспособление, в наименьшей степени травмирующее роговицу.

Исходную чувствительность роговицы глаза кролика (контроль) определяют дважды с интервалом в 5 мин (ресницы перед исследованием отстригают). Раствор исследуемого вещества в объеме 0,4 мл инстиллируют в конъюнктивальный мешок глаза кролика за 2 раза с интервалом 30 с. Первое определение поверхностной анестезии проводят на 8-й минуте исследования и повторяют на 10, 12, 15, 20, 25, 30-й и т.д. мин исследования. Каждый раз отмечают минимальное число прикосновений одинаковой силы и ритма, вызывающее смыкание век.

Каждую концентрацию вещества проверяют 8 раз, используя роговицу разных глаз. За индекс Ренье, характеризующий степень анестезии, принимают среднюю величину, вычисленную из суммы величин, полученных при исследовании исследуемого вещества в течение 60 мин (13 временных точек). Отсутствие мигательного рефлекса в течение 1 мин (100 прикосновений) расценивают как показатель полной анестезии. Максимальный индекс Ренье для высокоактивных веществ равен 1300, минимальный — 13, для неактивных соединений.

Исходя из полученных данных, отражающих изменения чувствительности роговицы под воздействием МС, определяют начало (для активных веществ с 1-й мин после введения), длительность полной (100%) анестезии, общую длительность МА. При определении длительности анестезии, вызываемой высокоактивными соединениями, исследования можно продолжать до 120 мин и более.

Относительную активность исследуемых соединений высчитывают по уравнению Валетта (Valette) (20).

$$T = (x - n) + t(N - x) = Y(N - n),$$

где Y — концентрация эталонного препарата, при которой его индекс Ренье соответствует индексу Ренье (x) изучаемого соединения в изучаемой концентрации; T — концентрация раствора эталонного препарата, индекс Ренье которой превышает индекс Ренье (x) изучаемого соединения; t — концентрация раствора эталонного препарата, индекс Ренье которой меньше индекса Ренье (x) изучаемого соединения; N — индекс Ренье для T; n — индекс Ренье для t; x — индекс Ренье изучаемого соединения в изучаемой концентрации.

Пример расчета относительной активности исследуемого вещества по сравнению с тетракаином:

Индекс Ренье 1% раствора исследуемого вещества x = 336.

Индекс Ренье 0,05% раствора тетракаина T = 480.

Индекс Ренье 0,025% раствора тетракаина t = 320.

Эквивалентная концентрация тетракаина (Y), при которой индекс Ренье тетракаина равен индексу Ренье 1% раствора изучаемого соединения, будет составлять:

$$Y = \frac{0,05 \times (336 - 320) + 0,025 \times (480 - 336)}{480 - 320} = 0,0275\%.$$

При сравнении эквивалентной концентрации тетракаина (Y = 0,0275%) и исследуемого соединения видно (1%), что тетракаин при поверхностной анестезии более чем в 36 раз превосходит исследуемое соединение. Следовательно, относительная активность исследуемого соединения составляет только около 0,03 от активности тетракаина, принятой за единицу.

Чувствительность роговицы глаза кроликов может значительно отличаться друг от друга, поэтому рекомендуется предварительно подобрать животных, у которых определенная концентрация эталонного препарата всегда вызывает сходные результаты.

Одновременно с выявлением МА определяют местнораздражающее действие исследуемого вещества на ткани глаза кролика (33).

Для оценки этого действия используется следующая шкала:

- а) нет видимых изменений (-);
- б) гиперемия конъюнктивы и края век, мигательной перепонки в пределах 30 мин, смыкание век не более чем на 5–10 мин после введения вещества (+);
- в) гиперемия конъюнктивы век, мигательной перепонки, края век, склеры и инфильтрация (уплотнение) тканей век в течение 30–300 мин (++);
- г) гиперемия конъюнктивы век, мигательной перепонки, края век, склеры и инфильтрация, длящаяся более 300 мин (+++).

Обнаружение у изучаемого вещества местнораздражающего действия (++ и более в соответствие с представленными шкалами) свидетельствует о малой перспективности этого вещества.

5.1.2. Изучение местноанестезирующей активности при поверхностной анестезии слизистой оболочки глотки и трахеи кошек

Метод предназначен для изучения МА новых соединений в условиях, моделирующих их возможное применение в области глотки и трахеи, в частности, для проведения эндоскопических манипуляций. Данный метод является модификацией метода изуче-

ния активности МС на слизистой оболочке глотки кролика [20]. Выбор кошек в качестве объекта исследования обусловлен особенностями анатомического строения их ротовой полости и глотки, обеспечивающими по сравнению с кроликами и другими мелкими лабораторными животными более широкий доступ к глотке, гортани и трахее.

В эксперименте используют кошек-самцов массой 3,5–4 кг. Изучение активности МС осуществляют на животных, наркотизированных нембуталом (30 мг/кг, внутривенно). В условиях такого наркоза на протяжении 3–4 ч у кошек полностью сохранены резко выраженные кашлевые рефлексы в ответ на механическую стимуляцию слизистых оболочек: прикосновение кончиком катетера последовательно к дужкам, надгортаннику, голосовой щели, к стенкам трахеи. Положение животного — на спине. Голова кошки с максимально раскрытой пастью вместе с языком фиксируется на прочном пластмассовом кольце с соответствующими пазами для зубов. Это кольцо закрепляют между клыками нижней и верхней челюсти. Кольцо сбоку жестко фиксируют к штативу, получая наиболее удобный обзор и доступ к глотке, гортани и трахее. Затем приступают к фоновому тестированию кашлевых рефлексов кошки последовательно в ответ на механическую стимуляцию глотки, надгортанника, голосовой щели и трахеи. Стимуляцию осуществляют относительно жестким полиэтиленовым катетером с наружным диаметром 3 мм, длиной 14 см с запаянным закругленным концом. На протяжении 3 см от запаянного конца катетер имеет множественные мелкие отверстия по окружности с целью его последующего использования для орошения трахеи раствором изучаемого вещества. Получив исходные (фоновые) характеристики кашлевой реакции, с помощью стандартного пульверизатора с расстояния 5 см от надгортанника орошают слизистую оболочку глотки, надгортанника и входа в гортань, используя 0,5 мл раствора изучаемого МС. Через 5 мин после орошения в трахею вводят упомянутый катетер на глубину 5 см от уровня голосовой щели и через него под давлением с помощью шприца орошают 0,5 мл раствора МС слизистую оболочку трахеи.

Повторное тестирование кашлевого рефлекса выполняют через 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40 мин и т.д. после орошения в полном соответствии с механической стимуляцией, произведенной при фоновом тестировании. Об анестезирующей активности, о начале и длительности местной анестезии судят по способности вещества полностью подавлять кашлевой рефлекс у животного при механическом раздражении.

5.2. Модели инфильтрационной анестезии

5.2.1. Изучение местноанестезирующей активности

при инфильтрационной анестезии у морских свинок по методу Bulbring u Wajda

Исследования проводят на морских свинках-самцах массой 200–250 г. В область спины каждого животного, предварительно удалив с нее волосяной покров, в 4 точках — А, Б, В и Г (по углам квадрата со стороной 3 см) внутрикожно вводят свежеприготовленные изотонические растворы изучаемого соединения и эталонного препарата в объемах 0,25 мл. Растворы целесообразно вводить таким образом, чтобы исследуемое соединение в каждой концентрации инъецировалось в одну переднюю (А) и одну заднюю (Г) точки, а эталонный препарат в соответствующих концентрациях — в точки Б и В. Область введения препарата обводят чернилами. МА оценивают 6–8 раз для каждой из выбранных концентраций. Чувствительность в месте введения определяют прикосновением инъекционной иглой сериями по 6 прикосновений с промежутками 3–4 с, через каждые 5 мин, в течение 30 мин. Суммарное число прикосновений иглы, не вызывающих реакции животного (подергивание кожи) в течение 30 мин, расценивается как индекс инфильтрационной анестезии для раствора МС в данной концентрации. Кроме того, можно определить и среднюю эффективную концентрацию ($ЭК_{50}$) изучаемого МС, которая представляет собой такую концентрацию, при которой индекс инфильтрационной анестезии равен 18. Определение индексов для растворов каждой концентрации обычно проводят на 3–4 жи-

вотных. Исходя из зависимости «доза–эффект», определяют относительную активность исследуемого соединения. При этом на графике по оси ординат наносят индексы инфльтрационной анестезии, а по оси абсцисс — логарифмы исследованных концентраций МС. Результаты исследований сводят в таблицу. В качестве примера см. табл. 1.

Таблица 1

Местноанестезирующая активность прокаина (новокаина) и тримекаина при инфльтрационной анестезии у морских свинок

Анестетик	Концентрация раствора		Индекс инфльтрационной анестезии
	%%	ММ	
Прокаин	0,25 0,5	9,0 18,0	24,3 ± 3,5 31,0 ± 2,5
Тримекаин	0,25 0,5	8,8 17,6	33,5 ± 2,0 36,0 ± 0,0

Примечание. Представлены средние данные из 8 исследований, со стандартной ошибкой средней.

5.2.2. Изучение местноанестезирующей активности при инфльтрационной анестезии брюшной стенки у кроликов методом определения порога ноцицепции при электростимуляции

Исследования выполняют на наркотизированных кроликах-самцах массой 2,0–2,5 кг. Кролика фиксируют на станке за лапы в положении на спине. Кожу живота сбоку на уровне средней трети освобождают от волосяного покрова. На платиновые электроды, подключенные к электростимулятору, помещают небольшие ватные тампоны, смоченные в изотоническом растворе натрия хлорида. Электроды закрепляют на брюшной стенке кролика с помощью резинового пояса.

Раздражения наносят прямоугольными импульсами электрического тока длительностью 0,3 мс, частотой 50 Гц, амплитудой от 5 В и выше до появления ответной болевой реакции кролика. Длительность каждого стимула — 2 с. Интервал между стимуляциями равен 1 мин. Показателем болевой реакции является изменение ритма и амплитуды дыхания интактного животного. Регистрацию дыхания осуществляют на самописце с помощью механодатчика, связанного с капсулой Маррея, в которую поступает воздух через резиновую трубку, помещенную в один из носовых ходов кролика, или с помощью термодатчика, укрепленного у ноздри на пути выдыхаемого воздуха.

За пороговое раздражение принимают минимальное напряжение электрического тока в вольтах, при котором возникает болевая реакция кролика, сопровождаемая изменением ритма дыхания. Обычно эта величина составляет 10–25 В (фоновое значение). После определения порога болевой реакции животного электроды снимают и отмечают место их расположения на коже, очертив его чернилами. Исследуемое вещество в виде 1% раствора вводят внутривенно в объеме 0,5 мл и подкожно в объеме 2 мл под электрод с помощью шприца и иглы с наружным диаметром 0,3 мм. Тестирование ноцицептивной реакции в ответ на стимуляцию осуществляют сразу, через 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 мин и т.д. после введения вещества. О времени развития анестезии, ее глубине и длительности судят по изменению порога реакции на электрическое раздражение участка кожи, инфльтрарованного раствором исследуемого вещества. Глубину анестезии выражают в процентах. За 20% анестезию принимают действие вещества, устраняющее реакцию на пороговое раздражение. Повышение пороговой величины раздражения на 5 В принимают за 40% анестезию, на 10 В — за 60% и т.д. Повышение порога на 20 В условно принимают за 100% анестезию. С каждой концентрацией изучаемого вещества ставят 5 исследований. Высокоактивные вещества проверяют в 0,5%, 0,25% и меньших концентрациях, малоактивные — в 2% и 5% концентрациях. Объем вводимого раствора высокоактивного вещества может быть уменьшен до 1 мл. Результаты исследований заносят в таблицу. В качестве примера см. табл. 2.

Таблица 2

Местноанестезирующая активность тримекаина, бупивакаина и прокаина при инфльтрационной анестезии брюшной стенки у кроликов

Концентрация раствора соединения	Анестезия			
	Время наступления анестезии (мин)	Глубина анестезии в %	Длительность полной анестезии (мин)	Общая длительность анестезии (мин)
Тримекаин 1% (35,0 мМ)	5,0 ± 0,7	100	140,0 ± 6,5	210 ± 2,3
Бупивакаин 0,75% (24,9 мМ)	5,0 ± 0,6	100	260,0 ± 4,2	460,0 ± 8,5
Прокаин 1% (360 мМ)	15,4 ± 1,0	60	–	60,0 ± 1,5

Примечание. Представлены средние данные из 5 исследований со стандартной ошибкой средней.

5.3. Модели проводниковой анестезии

5.3.1. Изучение местноанестезирующей активности

при проводниковой анестезии седалищного нерва лягушки по методу Тюрка

В исследование берут лягушек *Rana temporaria*. Лягушку декапитуруют, сохраняя нижнюю челюсть, и разрушают спинной мозг до уровня II–III грудного позвонка. Отпрепаровывают седалищные нервы обеих задних лап и изолируют их от окружающих тканей с помощью тонких прокладок из индифферентного материала (целлулоида, тефлона). Обнаженные участки нервов покрывают ватными тампонами, смоченными изотоническим раствором натрия хлорида в объеме 0,1 мл. Лягушку подвешивают за нижнюю челюсть на штативе. Определяют время сгибательного рефлекса каждой лапки в ответ на погружение ее в 0,2 Н раствор соляной кислоты на глубину 1 см. С одного нерва снимают тампон с изотоническим раствором и заменяют его на тампон с раствором изучаемого вещества. Растворы изучаемого вещества используют в объеме 0,1 мл. Другая лапка остается контрольной — с изотоническим раствором натрия хлорида на нерве.

В эксперименте используют молярные концентрации изучаемых веществ при строго определенном рН раствора (7,35). Определяют действие вещества через 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 60 мин после подведения его к нерву. После каждого погружения лапки в кислоту ее отмывают изотоническим раствором. За минимальную эффективную концентрацию принимают наименьшую концентрацию вещества, которая вызывает полный блок проведения импульсов по нерву в отсутствие сгибательного рефлекса при соприкосновении лапы с кислотой в течение 1 мин. Определяют время наступления полного блока и длительность анестезии. Для исследования каждой концентрации используют не менее 5 лягушек. Результаты исследования сводят в таблицу. В качестве примера см. табл. 3.

Таблица 3

Местноанестезирующая активность прокаина (новокаина) и тримекаина при проводниковой анестезии седалищного нерва лягушек

Концентрация раствора исследуемого соединения	Анестезия	
	время наступления анестезии (мин)	длительность анестезии (мин)
Прокаин 1% (36,0 мМ)	14,0 ± 0,3	60,0 ± 7,3
Тримекаин 1% (35,0 мМ)	7,0 ± 0,2	181,0 ± 14,2

Примечание. Представлены средние данные из 5 исследований со стандартной ошибкой средней.

*5.3.2. Изучение местноанестезирующей активности
при проводниковой анестезии поясничного сплетения у лягушек
по методу Bulbring u Wajda*

Исследования проводят на лягушках *Rana temporaria*. Лягушку декапитуруют, сохраняя нижнюю челюсть, и разрушают спинной мозг до уровня III грудного позвонка. Брюшную полость вскрывают поперечным разрезом под грудиной и удаляют внутренние органы так, чтобы было обнажено поясничное сплетение. Лягушку подвешивают на штативе за нижнюю челюсть. Определяют исходное время сгибательного рефлекса лапок (не более 3 с) после погружения в 0,2 Н раствор соляной кислоты на глубину 1 см. Исследуемое вещество инстиллируют в свободное пространство нижней части брюшной полости. Анестезирующий эффект определяют по времени исчезновения рефлекторной реакции при погружении задних конечностей в раствор соляной кислоты. Действие веществ в возрастающих концентрациях определяют через короткие интервалы времени (5 мин). Лапку после каждого погружения в раствор соляной кислоты отмывают изотоническим раствором натрия хлорида. Определяют время наступления и продолжительность действия при проведении анестезии растворами изучаемых соединений в разных концентрациях и минимальную эффективную концентрацию, оказывающую местноанестезирующий эффект. Результаты исследований заносят в таблицу. В качестве примера см. табл. 4.

Таблица 4

*Местноанестезирующая активность тримекаина
при проводниковой анестезии поясничного сплетения у лягушек*

Концентрация раствора соединения	Анестезия	
	Время наступления анестезии (мин)	Длительность анестезии (мин)
Тримекаин 1% (35,0 мМ)	8,4 ± 0,4	> 50 мин
Тримекаин 5% (175,0 мМ)	3,5 ± 0,2	> 50 мин

*5.3.3. Изучение местноанестезирующей активности
при проводниковой анестезии хвоста у мышей по методу Bianch*

Исследования выполняют на беспородных белых мышах-самцах массой 18–22 г. Для эксперимента отбирают животных, отвечающих на механическое сдавление хвоста небольшой артериальной клипсой в течение 30 с. Наложение клипсы, бранши которой обтянуты тонкой резиновой трубкой, производят дистальнее места последующей инъекции под кожу хвоста 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида (для контрольной группы) или раствора изучаемого вещества (для получающей ЛС группы), которые вводят на расстоянии 1 см от корня хвоста. Повторное тестирование осуществляют через 15 мин после введения раствора. Поскольку реакция животных в ответ на механическое сдавление хвоста регистрируется в альтернативной форме, по результатам исследования можно говорить только о 100% глубине эффекта изучаемого вещества. Заключение о характере МА вещества можно сделать на основании вычисляемой ЭД₅₀ (мг/мл) изучаемого раствора. Для определения начала и длительности местноанестезирующего эффекта вещества можно тестировать животных многократно с 15–30-минутными интервалами. При этом обязательным является сопоставление результатов, полученных в получающей ЛС группе животных с результатами контрольной группы.

В табл. 5 в качестве примера представлены ЭД₅₀ прокаина (новокаина) и кокаина при тестировании ответной «болевого реакции» через 15 мин после введения вещества.

Таблица 5

Местноанестезирующая активность прокаина (новокаина) и кокаина при проводниковой анестезии хвоста у мышей

Вещество	Количество мышей	Анестезия	
		ЭД ₅₀ (мг/мл)	Относительная активность
Прокаин	120	4,25 (3,4–5, 31)	1
Кокаин	160	0,66 (0,53– 0,81)	6,4

Примечание. Представлены средние данные из 5 исследований.

5.3.4. Изучение местноанестезирующей активности при проводниковой анестезии седалищного нерва у крыс по методу Сатоугис и Такман

Исследования проводят на беспородных крысах-самцах массой 180–220 г. У животных предварительно тестируют двигательную реакцию в ответ на болевое механическое сдавление стопы. Регистрацию реакции осуществляют на анальгезиметре, представляющим из себя рычаг с автоматически перемещающимся по его градуированному плечу грузом массой 350 г. Нижнюю конечность животного удерживают между неподвижной площадкой и рычагом анальгезиметра. Учитывают значение шкалы прибора (в условных единицах), при котором крыса совершает попытку высвободить конечность из-под рычага.

Изучаемое вещество вводят в область седалищного нерва в объеме 0,2 мл в условиях пронации нижней конечности с ее внутренней стороны. Вкол иглы производят с дистальной стороны по ходу нерва между четырехглавой мышцей бедра и большой ягодичной мышцей. Точность подведения вещества к нерву требует хорошего навыка. Другую заднюю конечность используют в качестве контроля, подводя к седалищному нерву в том же объеме эталонное вещество.

Повторное тестирование реакции животного в ответ на болевое механическое сдавление осуществляют сразу, через 3, 5, 15, 30, 45, 60, 75 мин и т.д. после введения вещества. Определяют время наступления, глубину и продолжительность анестезии, вызываемой изучаемыми веществами. При проведении исследований новых соединений в различных концентрациях может быть определена ЭК₅₀. Результаты исследований сводят в таблицу. В качестве примера см. табл. 6.

Таблица 6

Местноанестезирующая активность тримекаина при проводниковой анестезии седалищного нерва у крыс

Объем и концентрация	Анестезия		
	время наступления анестезии (мин)	глубина анестезии (%)	длительность анестезии (мин)
Тримекаин 0,2 мл 2% (7,0 мМ)	2,0 ± 0,3	90	110,0 ± 9,4

Примечание. Представлены средние данные из 5 исследований со стандартной ошибкой средней.

5.3.5. Изучение местноанестезирующей активности у кроликов методом определения порога ноцицепции при электростимуляции

Исследования выполняют на кроликах-самцах массой 2,0–2,5 кг. Кролика фиксируют в положении на животе за лапы на станке. Область бедра освобождают от шерсти. Под легким ингаляционным эфирным наркозом обнажают седалищный нерв.

Под очищенный от соединительной ткани и жировой клетчатки нерв подводят полиэтиленовую ванночку (размерами 1×1 см с прорезями, соответствующими диаметру седалищного нерва) и на 1 см дистальнее — подключенные к электростимулятору платиновые электроды с межэлектродным расстоянием 2–3 мм. Участок нерва над ванночкой покрывают ваткой, смоченной изотоническим раствором натрия хлорида. После выхода кролика из наркоза наносят электрическое раздражение на нерв прямоугольными импульсами тока длительностью 0,3 с с частотой 50 Гц, амплитудой от 0,5 В и выше, до появления ответной реакции кролика, сопровождающейся изменением ритма и амплитуды дыхания. Интервал между подачей стимулов равен 1 мин. Длительность каждого стимула — 2 с. Регистрацию дыхания осуществляют на самописце с помощью механодатчика любой конструкции, связанного с капсулой Маррея, в которую поступает воздух через резиновую трубку, помещенную в один из носовых ходов кролика или с помощью термодатчика, укрепленного у ноздри на пути выдыхаемого воздуха.

За пороговое раздражение принимают минимальную величину напряжения электрического тока, при которой наступает заметная болевая реакция кролика, сопровождаемая изменением ритма и амплитуды дыхания. Обычно эта величина составляет 0,5–1,5 В — фоновое значение. После определения порога болевой чувствительности (попрога ноцицепции) участок нерва над ванночкой покрывают небольшим ватным тампоном и смачивают его 1 мл 1% раствора исследуемого вещества. Тестирование реакции в ответ на стимуляцию осуществляют через 3, 5, 10, 15, 20, 30, 60, 90, 120 мин и т.д. после подведения изучаемого вещества к нерву. Через 30 мин после начала исследования вещество удаляют из ванночки вместе с тампоном и заменяют его изотоническим раствором натрия хлорида на тампоне. О времени наступления анестезии, ее глубине и длительности судят по изменению порога электрического раздражения нерва кролика после воздействия на него раствора испытуемого вещества. Глубину анестезии выражают в процентах. За 20% анестезию принимают действие вещества, устраняющее реакцию на пороговое раздражение. Повышение величины порогового раздражения на 1 В принимают за 40% анестезию; на 2 В — за 60% анестезию и т.д. Повышение порога на 4 В принимают за полную (100%) анестезию. С каждой концентрацией изучаемого вещества ставят 5 исследований.

5.3.6. Изучение местноанестезирующей активности при проводниковой анестезии седалищного нерва у кроликов с помощью «бескровного» метода

Исследования выполняют на кроликах-самцах массой 2,0–2,5 кг. Проводниковую анестезию у животных проводят, используя инъекционный способ подведения изучаемого вещества к нервному волокну.

Инъекционную иглу, служащую одновременно электродом, на всем протяжении, за исключением острия, изолируют тонкой полиэтиленовой трубкой и подводят к седалищному нерву кролика в области верхней трети бедра (на 1 см ниже от середины линии, проведенной от седалищного бугра до вертела бедренной кости; точность подведения вещества к нерву требует хорошего навыка).

Для уточнения правильности подведения иглы через нее проводят электростимуляцию нерва. Подведение иглы считается точным, если имеется реакция нерва на раздражение его прямоугольными импульсами тока длительностью 0,3 с, частотой 50 Гц и амплитудой 0,36 В.

Далее через эту иглу вводят изучаемое вещество и иглу удаляют.

По изменению порога болевой чувствительности кролика в ответ на стимуляцию лапы, осуществленную при помощи подкожных электродов, судят о начале, глубине и длительности анестезии.

Оценку МА изучаемого вещества осуществляют в соответствии с критериями, описанными для метода определения порога ноцицепции (3.5.)

Результаты исследования заносят в таблицу. В качестве примера см. табл. 7.

Таблица 7

Местноанестезирующая активность тримекаина, бупивакаина (маркаина) и прокаина (новокаина) при проводниковой анестезии у кроликов

Концентрация раствора соединений	Анестезия			
	Время наступления анестезии (мин)	Глубина анестезии (%)	Длительность полной анестезии (мин)	Общая длительность анестезии (мин)
Тримекаин 1% (35 мМ)	10,0 ± 0,9	100	140,0 ± 6,0	171,0 ± 3,8
Бупивакаин 0,75% (24,9 мМ)	12,0 ± 0,5	100	310,0 ± 6,5	420,0 ± 10,2
Прокаин 1% (36 мМ)	20,8 ± 1,0	60	-	50,4 ± 2,2

Примечание. Представлены средние данные из 5 исследований со стандартной ошибкой средней.

5.3.7. Изучение местноанестезирующей активности при анестезии нижнего дентального нерва у кроликов

Исследования проводят на кроликах-самцах массой 2–2,5 кг. Вживление электродов в пульпу резца производят под нембуталовым наркозом. В верхнем резце животного на расстоянии 1,5–2 мм друг от друга высверливают два отверстия диаметром 1 мм и глубиной до уровня предентина. Пульпарный канал не вскрывают, что предотвращает нарушение жизнедеятельности пульпы в течение продолжительного времени. Для улучшения контакта электродов с твердыми тканями зуба дно препарированной полости заполняют серебряной амальгамой. В качестве электродов используют многожильные провода диаметром не более 1 мм в тефлоновой оболочке. Стимулирующие концы электродов зачищают и вставляют в подготовленные лунки, где фиксируют с помощью самотвердеющей пломбирочной пластмассы, которая обеспечивает надежную фиксацию и изоляцию кончиков электродов от окружающих тканей. Свободные концы электродов проводят под кожей лицевой поверхности черепа с помощью направляющей иглы и выводят на теменную область, где фиксируют к коже кисетным швом. Защищенные концы соединяют с коммутационными проводами от выходных клемм электростимулятора. Используют любой тип стимулятора с выходом по току, генерирующего импульсы прямоугольной формы. Параметры раздражения: частота 100 имп/с, длительность 0,5 мс, сила тока градуально возрастает в интервале 0,1–10 мА, продолжительность стимуляции 1 с. Исследование начинают через 3–4 дня после операции.

Во время исследований кролик находится в специальном ящике с отверстием для фиксации головы. Определяют исходные значения порогов рефлекса открывания пасти и жевательных движений и вокализации. Раствор анестетика в объеме 1 мл в исследуемом диапазоне концентраций инъецируют под угол нижней челюсти, при этом иглу вводят на глубину 0,5 см, направляя вдоль внутренней поверхности кости. Повышение порогов рефлекса открывания пасти и вокализации после введения местного анестетика выражают в процентах по отношению к их исходному уровню и результаты заносят в таблицу. За полную анестезию принимают сдвиг порогов на 100%. На одном животном можно проводить исследование одновременно двух различных веществ или одного вещества в разных концентрациях. В этом случае препарируют оба резца, и ис-

следуемое вещество вводят с двух сторон. Через 15–30-минутные интервалы проводят повторные раздражения пульпы до полного восстановления порогов рефлекса открывания пасти и вокализации. Результаты исследований сводят в таблицу. В качестве примера см. табл. 8.

Таблица 8

Местноанестезирующая активность тримекаина при проводниковой анестезии нижнего дентального нерва у кроликов

Концентрация раствора соединения	Компоненты болевой реакции	Глубина анестезии (%)							
		Время тестирования после введения соединения (мин)							
		10	30	45	60	75	90	105	120
Тримекаин 1% (35 мМ)	Рефлекс открывания пасти	200	200	200	151	132	100	–	–
	Вокализация	200	200	200	142	114	100	–	–
Тримекаин 2% (70 мМ)	Рефлекс открывания пасти	200	200	200	142	114	100	–	–
	Вокализация	200	200	200	200	200	154	126	100

5.3.8. Изучение местноанестезирующей активности при проводниковой анестезии большеберцового нерва у кроликов

Исследования выполняют на кроликах-самцах массой 2–2,5 кг. Под глубоким нембуталовым наркозом осуществляют хроническую имплантацию электродов на большеберцовый нерв. С этой целью нижнюю треть наружной поверхности голени тщательно освобождают от шерсти. В стерильных условиях проводят разрез кожи и подкожной клетчатки параллельно ахилловому сухожилию в области проекции нерва. Нерв выделяют из окружающих тканей с помощью стеклянных палочек на протяжении 1 см. На обнаженный нерв накладывают электрод специальной конструкции и фиксируют с помощью шелковых лигатур. Электрод представляет собой полиэтиленовую трубку диаметром 0,2–0,3 мм и длиной не более 0,5 мм. По внутренней поверхности трубки в поперечном направлении проходят два серебряных провода диаметром 0,1–0,2 мм. С наружной стороны трубки серебряные электроды спаивают с многожильными проводами в тефлоновой оболочке и тщательно изолируют. Свободные концы тефлоновых проводов проводят под кожей спины с помощью направляющей иглы, выводят на теменную часть черепа и фиксируют там с помощью кисетного шва. Операционную рану послойно зашивают. Исследования начинают после полного заживления операционной раны — через 4–5 дней после операции. Во время исследования животных помещают в специальную камеру с прозрачной стенкой, позволяющей наблюдать за их поведением. Свободные концы электрода соединяют с проводами от выходных клемм стимулятора. Раздражение кожного нерва осуществляют пачками прямоугольных импульсов с параметрами 100 имп/с, 0,5 мс, 1 с, 5–30 В. Сначала определяют пороговую интенсивность стимуляции, вызывающую флексорный рефлекс и вокализацию, затем через 15, 30 и т.д. мин после введения препарата проводят повторные тестирования. Раствор местного анестетика вводят в объеме 1 мл в область проекции нерва выше расположения электрода. Оценку МА изучаемых веществ осуществляют по изменению интенсивности стимуляции, необходимой для возникновения флексорного рефлекса и вокализации, выраженных в процентах по отношению к их исходному значению. За полную анестезию принимают сдвиг порогов на 100%. Результаты исследований заносит в таблицу. В качестве примера см. табл. 9.

*Местноанестезирующая активность тримекаина
при проводниковой анестезии кожного нерва у кроликов*

Концентрация раствора соединения	Компоненты болевой реакции	Глубина анестезии (%)						
		Время тестирования после введения соединения (мин)						
		10	30	45	60	75	90	105
Тримекаин 1% (35 мМ)	Флексорный рефлекс	200	200	200	200	148	100	–
	Вокализация	200	200	200	191	126	100	–
Тримекаин 2% (70 мМ)	Флексорный рефлекс	200	200	200	200	200	143	100
	Вокализация	200	200	200	200	200	138	100

*5.3.9. Изучение местноанестезирующей активности
при инфльтрационной, проводниковой и терминальной анестезии
у крыс методом лучевой анальгиземетрии*

Исследования проводят на беспородных белых крысах-самцах массой 200–250 г. Принцип метода заключается в регистрации латентного периода отведения хвоста (tail-flick) при термическом воздействии в области проксимальной трети хвоста. Термическое воздействие осуществляют с помощью установки любой конструкции, позволяющей получить сфокусированный луч света от лампы накаливания и зафиксировать время от включения света до момента отведения хвоста. Интенсивность термического ноцицептивного воздействия должна быть отрегулирована таким образом, чтобы исходные реакции отведения хвоста возникли с латентным периодом в интервале 3–6 с.

При инфльтрационной анестезии раствор препарата в различных концентрациях вводят под кожу хвоста в области нанесения термического воздействия в объеме 0,5 мл. При проводниковой анестезии равномерно с 4-х сторон обкалывают корень хвоста раствором препарата в объеме 1 мл. Для оценки МА изучаемых веществ при терминальной анестезии предварительно тщательно выбривают поверхность хвоста в области нанесения термического воздействия или скарифицируют эпидермис (моделирование раневой поверхности) на площади 0,5×0,5 см. Фильтровальную бумагу, соответствующую по размеру площади подготовленного участка хвоста, смачивают 0,5 мл раствора препарата в различных концентрациях и фиксируют на хвосте с помощью лейкопластыря. При исследовании местноанестезирующих свойств материалов (полимерные пленки, тампоны, перевязочные материалы, содержащие местноанестезирующее средство) их накладывают на подготовленную поверхность хвоста и фиксируют. Животным контрольной группы вводят тем же способом и в том же объеме изотонический раствор натрия хлорида. После введения изучаемого вещества повторное тестирование проводят с интервалом времени в 15, 30 или 60 мин.

Максимальное время однократного термического воздействия на фоне действия МС не должно превышать 20 с, что соответствует увеличению латентного периода рефлекса отведения хвоста не менее чем в 2 раза (на 100%) и расценивается как полная анестезия. Указанные значения латентных периодов (максимальные исходные и предельно допустимые) зависят от технических особенностей устройства, используемого для термического ноцицептивного воздействия, и должны специально определяться для каждого конкретного прибора.

Полученные данные обрабатывают статистически и сопоставляют со значениями латентных периодов в контрольной группе животных, используя критерий Стьюдента. Результаты исследований сводят в таблицу, рассчитывают коэффициент (К), представляющий собой отношение среднего значения латентных периодов отведения хвоста че-

рез определенное время после введения изучаемого вещества, к среднему значению исходных латентных периодов в контроле. В качестве примера см. табл. 10.

Таблица 10

Местноанестезирующая активность тримекаина и бупивакаина (маркаиана) при инфльтрационной, проводниковой и терминальной анестезии хвоста у крыс

Концентрация раствора соединения в % (мМ)	Вид местной анестезии	Глубина анестезии (К = ЛП* в исследовании/ ЛП в контроле)															
		Время тестирования от момента введения МС (мин)															
		10	30	60	90	120	150	180	210	240	270	300	330	360	390		
Тримекаин	Инфльтрационная																
0,05 (1,8)			1,4	1,2	0												
0,1 (3,5)			1,7	1,1	0												
0,25 (8,8)			2,0	1,9	1,7	0											
0,5 (17,6)			2,0	1,9	1,5	0											
1 (35,0)			2,0	2,0	2,0	2,0	1,2	0									
Бупивакаин																	
0,05 (1,7)			2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,5	1,2	0							
0,1 (3,3)			2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,2	0						
0,25 (8,3)			2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,9	1,6	0					
0,5 (16,6)			2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,6	1,3	0			
1 (70,0)			2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	2,0	1,8	1,4	1,3	0		
Тримекаин	Проводниковая																
0,5 (17,6)			2,0	2,0	1,8	1,6	0										
1 (35,0)			2,0	2,0	2,0	1,5	1,2	0									
2 (70,0)			2,0	2,0	2,0	1,8	1,3	1,2	0								
Бупивакаин																	
0,5 (16,6)			-	-	2,0	-	2,0	-	2,0	-	-	2,0	1,7	1,5	0		
1 (33,3)			-	-	2,0	-	2,0	-	2,0	-	-	2,0	1,9	1,6	1,2	0	
Тримекаин	Терминальная																
2 (70,0)			2,0	1,6	0												

* Примечание. ЛП — латентный период отведения хвоста.

5.3.10. Изучение местноанестезирующей активности при проводниковой анестезии блуждающего нерва у кошки

Исследование проводится на кошке, находящейся под хлоралозо-небуталовым наркозом (75+15 мг/кг внутривенно) при автоматическом поддержании температуры тела на уровне $37\pm 0,05$ °С (с помощью аквариумного рефлектора мощностью 100–150 Вт, управляемого через ректально вводимый контактный термометр). Для исключения гипоксии, сильно влияющей на деятельность организма, животное переводится на искусственную вентиляцию легких, для чего желательно использовать клапанное устройство Ю.Р. Шейх-заде, не обладающее мертво-пространственным эффектом (Физиологический журнал СССР, 1987, т. 73, № 4, с. 550). После этого выделают, лигируют и перерезают на уровне щитовидного хряща правый блуждающий нерв.

Периферический конец нерва накалывают на биполярные игольчатые электроды (изготавливаемые из инсулиновых инъекционных игл) с межполюсным расстоянием 2–3 мм и заливают расплавленной смесью медицинского воска и вазелинового масла, быстро отвердевающей при температуре тела. На расстоянии 1,0–1,5 см от электродов нерв помещают в цилиндрическую ванночку (диаметр и глубина 1 см) с двумя прорезями для прохождения через них блуждающего нерва. Участок нерва между электродами и ванночкой, а также наружная сторона последней в области прорезей тоже заливаются смесью воска и вазелинового масла.

После подготовки ванночки к работе ее заполняют физиологическим раствором Рингера или Кравкова ($\text{NaCl} - 0,9 \text{ г}$, $\text{KCl} - 0,02 \text{ г}$, $\text{CaCl}_2 - 0,02 \text{ г}$, $\text{NaHCO}_3 - 0,015 \text{ г}$, $\text{H}_2\text{O} - \text{до } 100 \text{ г}$) без глюкозы и накрывают кусочком полиэтиленовой пленки, смоченной в физиологическом растворе для лучшего прилегания ее к ванночке и предотвращения таким образом высыхания раствора.

После этого вкалывают под кожу животного 2 активных ЭКГ-электрода (один в области сердца, второй — на одной из задних конечностей) и один заземляющий электрод (на другой задней конечности). Выходной сигнал электрокардиографа подают на устройство, выделяющее зубец R на ЭКГ и запускающее от него электростимулятор, способный работать в периодическом и залповом режиме генерации импульсов.

Раздражая нерв электрическими импульсами в периодическом режиме (2 мс, 40 Гц, 5 с), определяют пороговую силу хронотропного эффекта (обычно 0,3–0,4 В), вызывающую удлинение интервала RR ЭКГ на 10%. После этого переходят на залповый режим раздражения, подавая на нерв одиночные серии из трех супрамаксимальных импульсов (2 мс, 40 Гц, 6 порогов, интервал между зубцом R и серией импульсов — 0 с, интервал между сериями импульсов — не менее 2-х мин). Наступающий при этом хронотропный эффект (ХЭ,%) оценивают по формуле: $\text{ХЭ} = 100(T_c - T_n)/T_n$, где T_n — длительность последнего интервала RR перед раздражением нерва, а T_c — длительность следующего интервала RR, совпадающего с раздражением нерва серией импульсов.

Затем удаляют из ванночки физиологический раствор и заполняют ее раствором изучаемого анестетика. Вслед за этим через каждые 2 мин наносят на нерв одиночные серии импульсов с определением в каждом случае текущего хронотропного эффекта. После достижения плато эффекта тщательно промывают ванночку и снова заполняют ее физиологическим раствором.

После указанной процедуры на 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128-й и 256-й мин опять раздражают нерв одиночными сериями импульсов, определяя динамику убывания местноанестезирующей активности. В заключение определяют глубину местной анестезии (ГМА,%) при всех пробах по формуле: $\text{ГМА} = 100(\text{ИХЭ} - \text{ТХЭ})/\text{ИХЭ}$, где ИХЭ — исходный, а ТХЭ — текущий хронотропный эффект блуждающего нерва.

Для каждой концентрации изучаемого вещества выполняют 5–7 экспериментов с обобщением результатов в виде таблицы. В качестве примера см. таблицу.

Таблица 11

Сравнительная оценка ($M \pm m$) местноанестезирующей активности новокаина ($n=8$), маркаина ($n=6$) и рихлокаина ($n=7$)

Изучаемое вещество, %	Макс. глубина анестезии (МГА), %	Время достижения МГА, мин	Длительность МГА после удаления вещества, мин	Длительность снижения анестезии от МГА до 0, мин
Новокаин, 0,5%	100±0	9,0±0,7	0,6±0,6	23,0±2,1
Маркаин, 0,5%	100±0	10±0,9	56,0±5,8*	211,2±14,7*
Рихлокаин, 0,5%	100±0	11,8±3,4	0,5±0,8	182,2±16,9*

* Примечание. Достоверность отличий от действия новокаина менее 0,05.

5.3.11. Изучение тонического и стимул-зависимого блокирования проводимости А-волокон седалищного нерва лягушки местноанестезирующими веществами

Первые масштабные электрофизиологические исследования по изучению проводимости нервных волокон целого нерва были выполнены Ерлангером и Гассером [29] и Лоренто де Но [35]. Эти методы были применены для изучения феноменологии проводниковой анестезии нерва, как метода региональной анестезии, предусматривающей подведение раствора местного анестетика непосредственно к нервному стволу. Существует два основных типа блокирования нерва местными анестетиками: стойкое тоническое блокирование — снижение амплитуды потенциала действия нервного волокна в ответ на одиночный стимул и стимул-зависимое блокирование — последовательное снижение амплитуды потенциалов в процессе ритмического раздражения нерва. К настоящему времени достигнут значительный прогресс в раскрытии механизмов блокирования проводимости нервных волокон местными анестетиками, который состоит в подавлении проводимости натриевых каналов возбудимых мембран [21, 24, 26, 31].

Исследования по изучению тонического и стимул-зависимого блокирования проводимости нерва местными анестетиками можно провести на изолированном седалищном нерве озерной лягушки *Rana ridibunda Pallas* при комнатной температуре 18–22 °С. После выделения нерва из организма животного для стабилизации его функционального состояния необходимо на 40–60 мин поместить в физиологический раствор Рингера следующего состава (мМ на 1 л): NaCl — 114; KCl — 2,5; CaCl₂ — 2,0; HEPES — 10. Кроме HEPES можно использовать и другие буферы, в том числе и карбонатный. В последнем случае в качестве буфера в физиологический раствор вместо HEPES добавляется 1,81 мМ NaHCO₃. Поскольку активность большинства анестетиков в значительной степени зависит от pH, активную реакцию раствора Рингера необходимо поддерживать на строго постоянном уровне — 7,3. При отклонении pH раствора Рингера с анестетиком от величины 7,3 нужно произвести ее коррекцию добавлением в раствор нескольких капель 0,1N HCl или 0,1N NaOH, соответственно. Эта коррекция pH должна проводиться под контролем pH-метра при непрерывном помешивании тестируемого раствора.

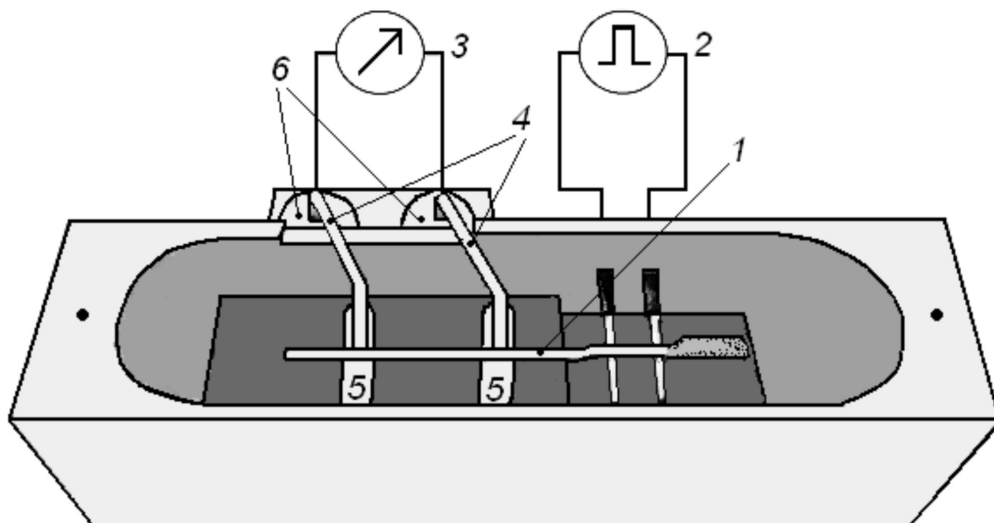


Рис. 1. Схема экспериментальной камеры для регистрации электрической активности седалищного нерва лягушки: 1 — седалищный нерв, 2 — стимулирующая цепь, 3 — регистрирующая цепь, 4 — стеклянные трубочки, наполненные агар-агаром, приготовленном на растворе Рингера, 5 — кюветки с раствором Рингера, 6 — неполяризующиеся каломельные электроды

Через 40–60 мин выдерживания в растворе Рингера нерв извлекают из раствора и укладывают во влажную камеру на две пары электродов: проксимальные — раздражающие и дистальные — отводящие (рис. 1). Для нанесения на нерв раздражения можно использовать любой тарированный по силе и частоте генерации импульсов стимулятор. На выходе стимулятора установить нулевую интенсивность раздражения длительностью 0,1 мс. Для получения сравнимых результатов длительность стимулов в последующих сериях исследований не менять.

Регистрацию потенциала действия (ПД) нерва следует проводить или катодным осциллографом с достаточным коэффициентом усиления, или на экране монитора компьютера, куда усиленный сигнал подается через аналого-цифровой преобразователь, и затем обрабатывается с помощью программы Mathcad 2000.

Последовательно нанося на нерв одиночные стимулы, определить порог раздражения, для этого плавно увеличивать силу раздражения от нуля до появления еле заметного ответа нерва. Производя дальнейшее увеличение силы раздражения, довести амплитуду ПД нерва до максимальной величины, при которой дальнейшее усиление раздражения более не приводит к росту ПД. При этом в ответную реакцию вовлекаются только самые толстые А-волокна. Зарегистрировать ПД. Затем записать ответ нерва на 1-секундную ритмическую стимуляцию частотой 10, 50, 100, 300 имп/с (рис. 2, А).

После регистрации исходных данных нерв помещается в раствор Рингера с добавлением анестезирующего средства — в приведенном случае 2 мМ соединения РУ-353. Через определенные интервалы времени нерв вынимают из раствора с анестезирующим веществом и измеряют амплитуду максимального одиночного ПД. Когда его амплитуда снизится до 50% от исходной величины, снова производится регистрация ПД нерва, возникающих на одиночные и ритмические максимальные стимулы (рис 2).

После этого нерв помещают в раствор Рингера для определения времени, в течение которого произойдет отмывание из него анестезирующего вещества, о чем судят

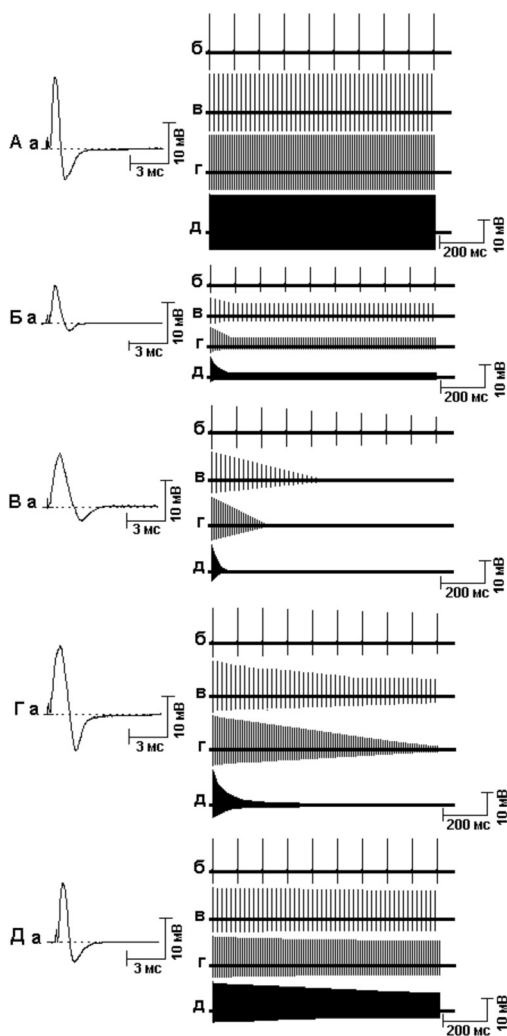


Рис. 2. Тоническое и стимул-зависимое блокирование проводимости нервных волокон седалищного нерва при введении в омывающий раствор с рН 7,3 анестезирующего вещества РУ-353 (2 мМ/л):

А — ПД нерва, выдержанного в течение 40 мин в растворе Рингера, возникающие в ответ на максимальное одиночное (а) и ритмические (б, в, г и д) раздражения частотой 10, 50, 100, 300 имп./с;

Б — то же после 7-минутного выдерживания нерва в растворе Рингера с 1 ммоль/л РУ-353;

В, Г и Д — то же после 4, 9 и 69 ч отмывания РУ-353 нерва выдерживанием его в растворе Рингера

по устранению тонического, а затем и стимул-зависимого блокирования проводимости нервных волокон. Для этого нерв периодически вынимают из раствора Рингера, укладывают на электроды экспериментальной камеры и регистрируют амплитуду одиночного максимального ПД нерва. Эту процедуру продолжают вплоть до полного восстановления исходной амплитуды ПД на максимальное раздражение. Промежуток времени от начала отмывания нерва до полного восстановления его исходной амплитуды получило название время (продолжительности) устранения тонического блокирования. Аналогично, по прекращению снижения амплитуды ПД в процессе 1-секундной ритмической стимуляции определяется время устранения стимул-зависимого блокирования проводимости нерва, которое обычно продолжительнее времени устранения тонического блокирования.

Дополнительно результаты исследований могут быть оформлены в виде графика изменения амплитуды ПД в процессе действия анестезирующего вещества и его последующего отмывания.

5.4. Комбинированные модели анестезии

5.4.1. Комбинированное (одновременное) выявление местноанестезирующей активности при инфльтрационной и проводниковой анестезии у мышей методом лучевой анальгезиметрии

Исследования выполняют на мышьях-самцах массой 18–20 г, у которых оценивают латентный период отведения хвоста при термическом воздействии фокусированного луча света. Методика проведения исследования аналогична описанной для крыс за исключением того, что при отборе животных наведение луча света осуществляют дважды в последовательности дистальный — проксимальный участки хвоста с интервалом 10 с и получают таким образом фоновые значения латентных периодов в пределах от 3 до 5 с иглы диаметром 0,3 мм под кожу в ростральном направлении в дорсальную поверхность проксимального участка хвоста на расстоянии 1 см от его корня. Для точного дозирования объема вещества используют шприц с микровинтом, соединенный с иглой с помощью полиэтиленового катетера.

В процессе повторного тестирования термическое воздействие наносят дважды в той же последовательности, что и при контрольном тестировании: сначала на дистальный участок (1 см от кончика хвоста), затем — на проксимальный его участок (в область инфльтрации раствором изучаемого вещества — 1 см от корня хвоста). В первом случае оценивают значения латентных периодов реакций для проводниковой анестезии (П), во втором — для инфльтрационной анестезии (И). Оценку МА новых соединений осуществляют в соответствии с критериями, описанными для метода на крысах (6.3.9.).

Используя метод двойного наведения луча на хвост мышья, можно получить дополнительную информацию о глубине и длительности МА в условиях, когда тепловое воздействие наносится в течение более длительного времени, ограниченного повреждением тканей хвоста. В этом случае схема эксперимента должна быть изменена. Отобранных по результатам фонового тестирования животных группируют (по 6 мышья) для каждого заданного интервала времени между моментом введения МС и моментом последующего тестирования, которое осуществляют у каждой группы один раз (независимые выборки). Тестирование контрольной группы животных производят в соответствии со временем тестирования получавших ЛС групп: через 5, 15, 30, 60, 90 мин и т.д. Полученные данные обрабатывают статистически, учитывая значения латентных периодов реакции отведения хвоста по каждой группе животных отдельно по результатам стимуляции дистального ($M \pm m$) и ($M_1 \pm m$) и, соответственно, проксимального ($M_2 \pm m$) участков хвоста. Затем сопоставляют указанные значения с соответствующими значениями латентных периодов в контрольной группе животных, используя t-критерий Стьюдента. Полученные результаты сводят в таблицу, рассчитывают коэффициенты (К), характе-

ризирующие глубину местноанестезирующего действия соединения в каждый из изучаемых временных интервалов между введением вещества и моментом тестирования его эффекта. Коэффициент К представляет собой отношение среднего значения латентных периодов отведения хвоста после введения изучаемого вещества к среднему значению латентных периодов отведения хвоста в контрольной группе животных. В качестве примера см. табл. 12.

При проведении исследований по методикам 6.3.9 и 6.4.1 необходимо соблюдать оптимальный температурный режим в экспериментальной комнате (не менее 20 °С), так как при охлаждении животного ухудшается гемодинамика в области хвоста и увеличивается вероятность появления ошибочных данных.

Таблица 12

Местноанестезирующая активность тримекаина и бупивакаина (маркаина) при инфльтрационной и проводниковой анестезии у мышей

Объем и концентрация раствора соединения	Вид местной анестезии	Глубина анестезии (К)						
		Время тестирования от момента введения соединения (мин)						
		5	15	30	60	90	120	180
Тримекаин 0,05 мл 1% (1,8 мМ)	И	2,9	2,3	1,9	1,6			
	П	1,3	1,4	1,2	1,0			
Бупивакаин 0,05 мл 1% (1,7 мМ)	И	3,5	2,94	2,9	2,5	2,0	1,3	1,2
	П	1,2	1,5	2,8	2,0	1,4	1,0	

Примечание. Представлены данные из 6 исследований для каждой временной характеристики.

5.5. Модели эпидуральной анестезии

5.5.1. Изучение местноанестезирующей активности у кроликов при эпидуральной анестезии через дужку позвонка

Исследования проводят на кроликах-самцах массой 2,8–3,6 кг. Под местной анестезией (прокаин — 0,5% раствор) осуществляют доступ к дужке поясничного позвонка на уровне гребней подвздошных костей. С помощью зубного бора диаметром около 1,5 мм в дужке позвонка осторожно высверливают отверстие, достигая твердой мозговой оболочки. Через это отверстие на глубину 1,5 см аккуратно, не перфорируя твердую мозговую оболочку, в роstralном направлении вводят полиэтиленовый катетер диаметром около 1,4 мм, который используют для введения изучаемого вещества в перидуральное пространство. Перед введением вещества оценивают исходный порог болевой реакции в ответ на электростимуляцию задней конечности кролика через внутрикожные игольчатые электроды. Используют прямоугольные импульсы тока частотой 100 Гц, длительностью 1 мс, напряжением от 1 В и выше, продолжительность каждого стимула 2–3 с. Болевые пороги определяют по дыхательной (см. раздел 6.2.2) и двигательной реакциям, а также по вокализации животных. Раствор изучаемого вещества в нужной концентрации вводят через катетер в объеме 1 мл и по изменениям болевых порогов определяют начало, глубину и продолжительность местной анестезии. Сопоставляют результаты, полученные в группах сравнения (у животных при эпидуральном введении изотонического раствора натрия хлорида, у животных при эпидуральном введении эталонного местного анестетика) с результатами, полученными в получавшей ЛС группе (у животных при эпидуральном введении изучаемого вещества). Статистическую обработку проводят с помощью непараметрического метода. Результаты исследований заносят в таблицу (см. табл. 13).

Местноанестезирующая активность тримекаина при эпидуральной анестезии у кроликов

Соединение	Доза (мг/кг)	Анестезия		
		реакция	увеличение болевого порога в % через 15 мин после введения соединения	общая длительность анестезии (ч)
Тримекаин	2,0	Дыхательная	168,7 ± 12,1	1,5–2,0
		Двигательная	135,4 ± 21,8	
		Голосовая	146,9 ± 30,2	

5.5.2. Изучение местноанестезирующей активности у кроликов при эпидуральной анестезии через межкостистую связку

Кролика-самца массой 2,8–3,0 кг фиксируют в положении на животе за лапы на станке. Определяют порог болевой чувствительности животного, используя электростимуляцию одной из задних лап. Раздражение наносят током частотой 50 Гц, длительностью 1 мс с помощью внутрикожных электродов от стимулятора. Показателем болевой реакции является изменение ритма и амплитуды дыхания животного. Регистрацию дыхания осуществляют на самописце (см. раздел 6.2.2.).

На спине кролика определяют месторасположение гребня подвздошных костей. На этом уровне по ходу позвоночника освобождают кожу от шерсти. Анестезию проводят «бескровным» методом. Пункцию эпидурального пространства осуществляют детской иглой для спинномозговой анестезии после анестезии кожи 0,2 мл 0,25% раствором новокаина на один сегмент выше подвздошных костей. Иглу с мандреном вводят в межкостистые связки по центру позвоночника под углом 3–45° краниально. Мандрен удаляют и подсоединяют шприц с изотоническим раствором натрия хлорида. Осторожно продвигают поршень и иглу в перидуральное пространство.

Критериями попадания в перидуральное пространство служат тест утери сопротивления и характерное вздрагивание кролика на введение иглы. Далее через иглу вводят медленно за 20–30 с 1 мл раствора изучаемого вещества, после чего иглу удаляют. Вместе с тем точность введения в эпидуральное пространство таким способом требует хорошего навыка.

Тестирование болевой реакции животного в ответ на стимуляцию задней конечности осуществляют непосредственно после введения вещества, через 3, 5, 15, 30 мин и далее через каждые 30 мин. О времени наступления анестезии, ее глубине и длительности судят по изменению показателя болевого порога животного. Глубину анестезии выражают в процентах. Повышение порога по сравнению с исходным значением на 2 В принимают за 40% анестезию, на 5 В — за 100% и расценивают как полный эпидуральный блок. Результаты исследований заносят в таблицу (табл. 14).

Таблица 14

Местноанестезирующая активность тримекаина при эпидуральной анестезии у кролика (бескровный метод)

Соединение	Концентрация раствора соединения	Доза (мг/кг)	Анестезия			
			время наступления анестезии (мин)		длительность анестезии (мин)	
			40% глубины	100% глубины	100% глубины	40% глубины
Тримекаин	2%	8,0	1,0 ± 0,2	2,5 ± 0,5	37,5 ± 7,5	71,0 ± 14,2

Примечание. Представлены средние данные из 5 исследований со стандартной ошибкой средней.

5.6. Модели спинномозговой анестезии

5.6.1. Изучение местноанестезирующей активности при спинномозговой анестезии у крыс по методу хронической интратекальной катетеризации

Исследования проводят на крысах массой 200–250 г в условиях свободного поведения животных. Предварительно под нембуталовым наркозом крысам вводят полиэтиленовый катетер под твердую оболочку спинного мозга. С этой целью поверхность кожи на уровне IV–V поясничных позвонков тщательно выбривают. Разрезают кожу и фасции, раздвигают мышцы и инъекционной иглой делают отверстие в твердой мозговой оболочке спинного мозга. Катетер диаметром 0,5–1 мм и объемом 5 мкл осторожно вводят через это отверстие и продвигают вверх на 2–3 сегмента. Свободный конец катетера фиксируют к мышцам во время послойного зашивания раны. Эксперименты на животных проводят на 3–4-й день после операционной подготовки. Болевую чувствительность животных оценивают в тесте отведения хвоста (tail-flick) и/или по порогу вокализации при механическом раздражении корня хвоста. Одновременно можно регистрировать реакции артериального давления в сонной артерии и частоту дыхания. Раствор изучаемого вещества вводят с помощью микрошприца типа МШ-М 1. Через выбранные промежутки времени осуществляют повторные определения болевой чувствительности животных, которые сопоставляют с контрольными значениями.

5.6.2. Изучение местноанестезирующей активности при спинальной анестезии у крыс «бескровным» методом

Исследования проводят на крысах-самцах массой 200–250 г. На уровне поясничного отдела позвоночника крысы ножницами отсекают предварительно анестезированный (1–2 мл 2% раствора новокаина) участок кожи диаметром 2 см. В результате обнажаются структуры костно-мышечного аппарата поясничной области, позволяющие обнаружить локализацию остистых отростков позвоночника и связок между ними, которые являются основными ориентирами для направленного погружения инъекционной иглы до уровня спинномозгового канала. Используя тесты отведения лапы и отведения хвоста при электростимуляции лапы, термическом и механическом раздражении корня хвоста, определяют пороги болевой чувствительности животных до введения вещества. Подведение вещества крысам осуществляют с помощью шприца, оснащенного дозирующим микровинтом и соединенного при помощи полиэтиленового капилляра с инъекционной иглой. Для проведения исследования используют инъекционную иглу диаметром 350 мк с измененным углом заточки 45°. Игла вкалывается строго по сагиттальной плоскости каудально, под углом около 50° к линии позвоночного столба, в области связки между остистыми отростками III и IV поясничных позвонков, на глубину до ощущения легкого «провала» иглы. Сразу после этой процедуры приступают к медленному введению раствора изучаемого вещества (объем 40 мкл) в спинномозговой канал крысы с помощью микроинъектора (точность подведения вещества к спинному мозгу требует хорошего навыка). Критерием попадания активного вещества к спинному мозгу является определяемый визуально паралич задних конечностей животного.

В этих условиях приступают к последовательному тестированию болевой чувствительности животных. В первые 15 мин после введения изучаемого вещества определяют изменение болевой чувствительности крыс через каждые 5 мин и далее через каждые 15 мин до восстановления фоновых значений, зарегистрированных непосредственно перед началом эксперимента. На основании изменений болевых порогов животных после введения исследуемого вещества определяют время наступления, глубину и продолжительность анестезии. Увеличение болевого порога в 5 раз при электрическом раздра-

жении лапы или механическом раздражении корня хвоста, а также увеличение порога болевой чувствительности на 10 с при термическом раздражении хвоста животного принимают за 100% анестезию. С каждой концентрацией раствора изучаемого вещества ставят 6 исследований. Контрольным крысам вводят изотонический раствор натрия хлорида (или другой растворитель, используемый для исследуемого вещества) таким же способом, как и получающим ЛС крысам. Результаты исследований сводят в таблицу. В качестве примера см. табл. 15.

Таблица 15

Местноанестезирующая активность тримекаина при спинальной анестезии у крыс («бескровный» метод)

Объем и концентрация раствора соединения	Стимуляция					
	электрическая		термическая		механическая	
	Анестезия					
	глубина в %	длительность (мин)	глубина в %	длительность (мин)	глубина в %	длительность (мин)
Тримекаин 40 мкл 2%	60	10,5 ± 2,4	20	5,01 ± 1,5	25	5,0 ± 1,6

Примечание. Представлены средние данные из 6 исследований со стандартной ошибкой средней.

6. Методики изучения местнораздражающего действия местных анестетиков

Перспективным для клинического применения могут считаться только те препараты, местнораздражающее действие которых проявляется в концентрациях, существенно превосходящих их «терапевтические», т. е. рекомендованные к применению в клинике. В связи с этим при проведении доклинического изучения новых местных анестетиков совершенно необходимым является специальное исследование их местнораздражающих свойств.

Проявления местнораздражающего действия новых препаратов могут быть предварительно обнаружены при скрининге, например, при оценке терминальной анестезии методом Regnier на роговице глаза кролика или инфильтрационной анестезии на морских свинках (метод Vulbring и Wajda). При этом наблюдение за местом инъекции препарата проводят в течение недели, так как повреждающее действие наиболее отчетливо проявляется в этот период. Для более детальной оценки местнораздражающего эффекта исследуемых препаратов целесообразно использовать специальные методы.

6.1. Изучение местнораздражающего действия местноанестезирующих средств на крысах с помощью раствора трипанового синего

Исследования выполняют на белых крысах-самцах массой 120 г и более, которым в область хвоста после предварительного удаления волосяного покрова внутрикожно в 4 точки вводят по 0,1 мл раствора исследуемого соединения в концентрациях, убывающих в геометрической прогрессии. Для определения раздражающих свойств МС его раствор в каждой из исследуемых концентраций должен оцениваться не менее чем на 6 животных. Сразу после последней внутрикожной инъекции каждой крысе в бедренную вену вводят по 0,1 мл на 100 г массы тела 1% раствора трипанового синего. Степень раздражения тканей оценивают спустя 3 ч и 24 ч по 4-балльной шкале (табл. 16).

Оценка местнораздражающего действия соединений

Степень раздражения в баллах	Ранние признаки раздражения тканей (через 3 ч)	Поздние признаки раздражения тканей (через 24 ч)
0	На месте инъекции изменения отсутствуют	Изменения отсутствуют
1	Визуально различаемое слабое окрашивание тканей в месте инъекции диаметром не более 6 мм	Незначительное уплотнение тканей в месте инъекции при отсутствии гиперемии
2	Яркое (от светло-голубого до умеренно синего) окрашивание тканей диаметром 3–7 мм	Незначительная, полностью обратимая геморрагия при отсутствии признаков некроза
3	Яркое темно-синее окрашивание тканей диаметром 4–8 мм	Выраженная геморрагия с начинающимся некрозом тканей, без признаков воспалительной реакции
4	Темно-синее кольцо с ишемическим центром	Выраженный некроз тканей с начинающейся воспалительной реакцией

Для каждой концентрации высчитывают среднее арифметическое значение местнораздражающего действия в баллах и вычерчивают график зависимости раздражающего эффекта от концентрации (по оси абсцисс — логарифмы концентраций, по оси ординат — степень раздражающего действия). График позволяет определить 3 показателя местнораздражающего действия: 1) степень раздражающего действия, вызываемого 1% раствором соединения; 2) пороговую раздражающую концентрацию; 3) среднюю раздражающую концентрацию, при которой степень раздражения равна 2 баллам, т. е. концентрацию, не вызывающую необратимых изменений в тканях. Эти показатели также могут быть получены расчетным путем при использовании метода наименьших квадратов. Бесперспективными для клинического применения следует считать те соединения, у которых средние раздражающие концентрации приближаются к рекомендуемым к применению в клинической практике концентрациям.

6.2. Изучение местнораздражающего действия соединений на коже кролика

Исследования проводят на кроликах-самцах массой 2,5–3,0 кг. Заднюю поверхность спины вдоль позвоночника тщательно, без повреждения кожного покрова, освобождают от шерсти. Растворы анестетиков, приготовленные на изотоническом растворе натрия хлорида, вводят внутрикожно в объеме 0,1 мл. Места введения обводят чернилами. Необходимо использовать специальные шприцы и иглы. Местнораздражающий эффект оценивают через 24 ч по шкале:

Эритема: отсутствует	0
слабо выраженная	1
средне выраженная	2
сильно выраженная	3
Отек: отсутствует	0
слабо выраженный	1

средне выраженный	2
сильно выраженный	3
Размер реактивных изменений (диаметр): 5 мм или меньше	1
от 5 до 10 мм	2
более 10 мм	3
Характер эритемы: равномерное покраснение	0
эритематозное кольцо с ишемическим центром	1

Для каждой концентрации необходимо провести минимум 6 наблюдений в различных точках. Максимальный местнораздражающий эффект соответствует 10 баллам шкалы. Для каждой концентрации рассчитывают средние показатели в баллах, определяют среднюю раздражающую концентрацию, соответствующую 5 баллам. Определение средней раздражающей концентрации можно проводить так же, как описано в предыдущем методе.

6.3. Изучение местнораздражающего действия препаратов на слизистой оболочке глаза кролика

Исследуемые вещества в виде 2% растворов на изотоническом растворе натрия хлорида вводят в конъюнктивальный мешок в том же объеме, как и при определении анестезирующего действия веществ по методу Regnier. Одновременно проводят исследование местнораздражающих свойств новых соединений по указанной методике. Степень местнораздражающего действия соединений (средние данные 8 исследований) оценивают по четырехбалльной шкале через 3 ч и 24 ч после их введения в конъюнктивальный мешок глаза кролика (табл. 17).

При оценке действия препаратов можно использовать и промежуточные градации, например 2,5 и т.д. При резко выраженных проявлениях раздражающего действия препаратов оценка их местноанестезирующего эффекта невозможна из-за сильного блефароспазма.

Таблица 17

Оценка местнораздражающего действия местных анестетиков на слизистой оболочке глаза кролика

Степень раздражения в баллах	Признаки раздражения
0	Полное отсутствие проявлений раздражающего действия
1	Слабо выраженная инъекция сосудов конъюнктивы и увеличение капилляров склеры
2	Начальные признаки воспалительной реакции конъюнктивы, сильное покраснение, слезотечение и выделение секрета
3	Сильно выраженные воспалительные явления и повреждение поверхностных клеточных слоев роговицы при отсутствии необратимых изменений
4	Хемоз, резко выраженное раздражение и воспалительная реакция с образованием пустул, возникновением необратимых изменений в виде рубцов, помутнение роговицы, слепота

7. Программа скрининга местноанестезирующих средств

Скрининг местных анестетиков может проводиться с помощью любых из перечисленных выше методов в зависимости от задач и практических возможностей эксперимента. Однако при оптимизации скрининга — сокращении времени исследования, уменьшении его трудоемкости, повышении прогностического значения полученных результатов — при составлении программы исследования необходимо учитывать три обязательных условия. Во-первых, МА новых соединений должна быть изучена на моделях терминальной, инфильтрационной и проводниковой анестезии. Во-вторых, с учетом современных требований, предъявляемых к МС, исследование свойств новых веществ должно проводиться в сравнении с эталонными препаратами с использованием методов, позволяющих максимально точно (насколько это возможно в экспериментальных условиях) установить продолжительность их эффекта. В-третьих, наряду с исследованием МА новых соединений необходимо определить выраженность их местнораздражающего и общетоксического действия. Только при соблюдении этих условий может быть сделано наиболее полное и объективное заключение о МА исследуемого препарата при различных видах анестезии и о перспективах его клинического применения.

7.1. Первичный скрининг

Модели поверхностной (терминальной) анестезии

Изучение поверхностной анестезии на роговице глаза кролика по методу Regnier (5.1.1).

Модели инфильтрационной анестезии

Изучение МА при инфильтрационной анестезии кожи у морских свинок по методу Bulbring и Wajda (5.2.1).

Изучение МА при инфильтрационной анестезии у крыс методом лучевой анальгиземетрии (5.3.9).

Изучение МА при инфильтрационной анестезии у мышей методом лучевой анальгиземетрии (5.4.1).

Модели проводниковой анестезии

Изучение МА при проводниковой анестезии седалищного нерва лягушки (5.3.1).

Изучение МА при проводниковой анестезии у мышей по методу Bianchi (5.3.3).

Изучение МА при проводниковой анестезии у крыс по методу Camougis и Takman (5.3.4).

Изучение МА при проводниковой анестезии у крыс методом лучевой анальгиземетрии (5.3.9).

Изучение МА при проводниковой анестезии у мышей методом лучевой анальгиземетрии (5.4.1).

Методы выявления местнораздражающего действия

Изучение местнораздражающего действия у крыс с помощью раствора трипанового синего (6.1).

Изучение местнораздражающего действия на коже кролика (6.2).

Изучение местнораздражающего действия на слизистой оболочке глаза кролика (6.3).

В перечень приведенных тестов первичного скрининга включены не один, а несколько методов оценки МА при однотипных видах местной анестезии, что дает более широкие возможности для выбора из них наиболее доступных для исследователя. При выборе программы скрининга следует иметь в виду, что наиболее информативными являются исследование МА новых соединений при разных видах анестезии у одного и того же вида животного в условиях однотипного ноцицептивного воздействия, поскольку это дает возможность объективной оценки основных параметров действия препаратов в сравнительном аспекте. Исходя из экономических соображений (расход изучаемого вещества, временные затраты) и вида животных, в программу скрининга рекомендуется включать методы комбинированного (одновременного) выявления МА веществ у мышей или

проведение последовательного определения МА новых соединений при терминальной, инфильтрационной и проводниковой анестезии на модели термического раздражения хвоста и комбинированного метода изучения местноанестезирующего и местнораздражающего эффектов препаратов на роговице глаза кроликов. Если использование комбинированных методов оценки по каким-либо причинам оказывается невозможным, допустимо применение любого из перечисленных выше методов, моделирующих различные виды анестезии.

При изучении МА новых соединений необходимо параллельно проводить оценку их местнораздражающего эффекта в месте введения в течение ближайших 1–5 сут. Для перспективных в плане клинического применения соединений целесообразно проведение последующего более детального исследования их местнораздражающего действия с использованием методов, сообразных с планируемым целевым назначением препарата (см. раздел 7).

Изучение острой токсичности

В рамках первичного скрининга предпочтительно изучать острую токсичность на мышах при внутрибрюшинном, внутривенном и подкожном введениях исследуемого соединения, с вычислением LD_{50} и дозы (из расчета использованного объема вещества в соответствующей концентрации), вызывающей местноанестезирующий эффект в течение 1 ч у одних и тех же животных, может рассматриваться в качестве ориентировочного показателя терапевтической безопасности исследуемого соединения. Другим показателем терапевтической безопасности является соотношение средней тканераздражающей концентрации (СРК, см. 6.1, 6.2) с концентрацией, вызывающей местноанестезирующий эффект длительностью 1 ч.

Определение общетоксического действия соединений следует проводить в соответствии с общими требованиями настоящего Руководства.

В дальнейшем с целью более детального исследования МА новых соединений с учетом предлагаемого способа применения в клинике должны использоваться методы углубленного (целевого) изучения.

7.2. Углубленное (целевое) изучение

Модели поверхностной (терминальной) анестезии

Изучение поверхностной анестезии на роговице глаза кролика по методу Regnier в более широком диапазоне концентраций (5.1.1).

Изучение МА при поверхностной анестезии слизистой оболочки глотки и трахеи кошек (5.1.2).

Изучение МА при терминальной анестезии хвоста у крыс (5.3.9).

Модели инфильтрационной анестезии

Изучение МА при инфильтрационной анестезии у морских свинок по методу Bulbring и Wajda (5.2.1) в более широком диапазоне концентраций.

Изучение МА при инфильтрационной анестезии брюшной стенки у кроликов (5.2.2).

Модели проводниковой анестезии

Изучение МА при проводниковой анестезии седалищного нерва у крыс (5.3.4).

Изучение МА при проводниковой анестезии седалищного нерва у кроликов (5.3.6).

Изучение МА при проводниковой анестезии нижнего дентального нерва у кроликов (5.3.7).

Изучение МА при проводниковой анестезии большеберцового нерва у кроликов (5.3.8).

Изучение МА при проводниковой анестезии блуждающего нерва у кошки (5.3.10).

Изучение МА при проводниковой анестезии седалищного нерва лягушки (5.3.11).

Модели эпидуральной анестезии

Изучение МА при эпидуральной анестезии у кроликов через дужку позвонка (5.5.1).

Изучение МА при эпидуральной анестезии у кроликов через межкостистую связку (5.5.2).

Модели спинномозговой анестезии

Изучение МА при спинномозговой анестезии у крыс при хронической интратекальной катетеризации (5.6.1).

Изучение МА при спинномозговой анестезии у крыс «бескровным» методом (5.6.2).

Заключение

Методы углубленного изучения, учитывая их сложность и трудоемкость, целесообразно использовать только на конечных этапах исследования с целью уточнения основных параметров действия новых соединений.

Обязательность (или необязательность) исследования новых соединений на тех или иных моделях углубленного (целевого) изучения определяется тем конкретным видом (или видами) анестезии, при котором планируется возможное применение этих соединений в клинике. При этом для каждого выбранного вида анестезии желательно получить информацию не менее чем на 2 моделях данного вида анестезии и на разных животных.

Необходимо отметить, что любая программа исследований, выбранная авторами, должна быть составлена так, чтобы полученные данные давали наиболее полное и объективное представление о местноанестезирующей активности соединения, скорости наступления и продолжительности эффекта при различных видах анестезии, о его местнораздражающих и общетоксических свойствах и о перспективности его клинического применения как препарата.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Анисимова В.А., Осипова М.М., Галенко-Ярошевский А.П., Пономарев В.В., Попков В.Л., Приходько А.К., Каде Е.А., Спасов А.А. Местноанестезирующая активность 1,2-дизамещенных имидазо[1,2- α]бензимидазолов // Химико-фармацевтический журнал. — 2002. — Т. 36. — № 8. — С. 21–24.
2. Бельский М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. — Рига. — 1959.
3. Галенко-Ярошевский А.П., Каталимов Л.Л., Шуреков В.В., Киселев А.В. Снижение рН наружного раствора замедляет скорость блокирования проводимости А-волокон седалищного нерва производным имидазобензимидазола РУ-1117// Кубанский научный медицинский вестник. — № 8. — 2009. — С. 29–33.
4. Галенко-Ярошевский А.П., Каталимов Л.Л., Шуреков В.В., Киселев А.В. Снижение рН наружного раствора ослабляет блокирование проводимости А-волокон седалищного нерва производным имидазобензимидазола РУ-353// Кубанский научный медицинский вестник. — № 8. — 2009. — С. 33–36.
5. Галенко-Ярошевский А.П., Шейх-Заде Ю.Р., Черденник И.Л. Сравнительная оценка проводниковой анестезии, получаемой с помощью новокаина, маркаина и вещества РУ-353 // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 2005. — Т. 139. — №6. — С. 645–646.
6. Игнатов Ю.Д., Васильев Ю.Н., Шальнова Л.И. и др. Местноанестезирующие свойства полимерного соединения тримекаина // Бюл. эксперим. биол. и мед. — 1986. — № 6. — С. 686–688.
7. Каталимов Л.Л., Галенко-Ярошевский А.П. Изменение следовой деполяризации изолированного нерва при выдерживании его в растворе Рингера. — Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — Приложение 3. — 2007. — С. 25–29.
8. Мангушева Н.А., Каталимов Л.Л. Особенности блокирования проведения возбуждения в нерве аймалином и лидокаином. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины 2007. — Т. 3. — С. 262–266.

9. Мангушева Н.А., Каталымов Л.Л. Особенности блокирования проведения возбуждения в нерве лидокаином и аймалином // Бюл. экспер. биологии и медицины. — 2007. — Т. 143. — № 3. — С. 262–266.
10. Чернякова И.В., Жуков В.Н. Метод комбинированной оценки активности новых веществ при проводниковой и инфльтрационной анестезии у мышей с использованием теста «отдергивания хвоста» // Всес. науч. конф. «Оценка фармакологической активности химических соединений: принципы и подходы». — М., 1989. — С. 118.
11. Чернякова И.В., Киселевич В.Е., Осипов С.А. Новый метод проведения проводниковой анестезии в эксперименте // Всес. науч. конф. с междун. участием «Синтез, фармакология и клинические аспекты новых обезболивающих средств». — Новгород, 1991. — С. 114–115.
12. Харкевич Д.А. Руководство к лабораторным занятиям по фармакологии. — М.: Медицина, 1986.
13. Ходоров Б.И., Пеганов Э.М., Шишкова Л.Д. Медленная натриевая инактивация в мембране перехвата Ранвье // Биофизика мембран. — 1973. — С. 620–625.
14. Шейх-заде Ю.Р., Галенко-Ярошевский А.П., Чередник И. Л., Поиков В. И. Способ оценки проводниковой анестезии // Бюл. экспер. биол. и мед. — 1999. — № 4. — С. 412–414.
15. Шейх-заде Ю.Р., Галенко-Ярошевский А.П., Чередник И.Л., Попков В.Л. Способ оценки проводниковой анестезии / Патент № 2157087 РФ. — Оpubл. 10.10.2000 г. в БИ №28.
16. Butterworth J.F., Strichartz G.R. Molecular mechanisms of local anesthesia. — Anesthesiology. — 1990. — V. 72. — P. 711–734.
17. Camourgis G., Takman B. № Methods in pharmacology. — New York, 1971.
18. Hoppe J.O., Alexander E.B., Miller Z.C. Use of the trypan blue and rabbit eye tests for irritation // J. Amer. Pharm. Ass. — 1950. — Vol. 39. — P. 147–151.
19. Quevauviller A. Experimental methods for comparing local anaesthetic activity // Intern. Encyclopedia of Pharmac. and Ther., Sec. 8, v. I Local Anaesthetics.: Pergaman Press, 1971. — P. 291–318.
20. Koelzer P.P., Wehr R.H. Beziehungen zwischen chemischer. Konstitution und pharmacolo-gischer wirkung bei mehreren. Arzneimittel Forsch, 1959. — S. 683–693.
21. Lorente de No R. A study of nerve physiology / Studies from the Rockfeller Institute for medical Research, New York, 1947. — P. 131–132.
22. Valette G., Carion J. Suz une methode depreciation des effects anaesthesiologues locaux sur la mugesure bucco — pharyngel du Zappin // Ann. Pharm. Tr. — 1963. — Bd 21. — S. 723–726.

ГЛАВА 21

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ГИПОТЕНЗИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: академик РАМН В.И. Петров; д. м. н. проф. О.С. Медведев;
член-корр. РАМН, проф. И.Н. Тюренков; д. б. н., проф. А.Н. Мурашев*

Введение

Артериальная гипертония (АГ) как в Российской Федерации, так и во всех странах с развитой экономикой является наиболее распространенной сердечно-сосудистой патологией, приводящей к тяжелым осложнениям: мозговым инсультам, развитию почечной и сердечной недостаточности, прогрессированию атеросклероза и, в конечном счете, к преждевременной инвалидизации и смертности.

Достижение целевого уровня артериального давления является основной задачей лекарственной терапии АГ это доказано в значительном ряде крупных, многоцентровых исследований и реальным увеличением продолжительности жизни в Западной Европе и Северной Америке.

В настоящее время для лечения артериальной гипертонии существует множество ЛС различных классов, которые могут влиять на различные патогенетические механизмы регуляции сосудистого тонуса и АД, способные при моно- или комбинированной терапии достигать «целевого» АД. В связи с расширением спектра антигипертензивных средств, появлением новых инновационных препаратов с оригинальным механизмом действия, с одной стороны, повышаются возможности эффективной фармакотерапии АГ, обеспечивающие проведение персонализированного лечения, с другой — повышаются требования к новым разрабатываемым инновационным средствам лечения гипертонической болезни, и увеличивается объем доклинических исследований специфической активности.

1. Общие положения

Клиническая медицина требует широкого арсенала гипотензивных препаратов, которые обладали бы оригинальными механизмами действия, высокой эффективностью, минимальными побочными эффектами. Антигипертензивный препарат может быть рекомендован для длительной терапии или для купирования острых гипертензивных состояний, если он отвечает ряду требований:

1. При умеренной гипертонии ЛС способствует достижению целевого давления.
2. Антигипертензивное действие должно развиваться постепенно, но стабильно и длительно при однократном суточном приеме, при этом не вызывать ортостатическую гипотонию, не нарушать адаптационных реакций ССС.
3. Не вызывать привыкания и синдрома отмены после прекращения приема препарата, т. е. не давать вторичного гипертензивного эффекта.
4. Улучшать или не ухудшать кровоснабжение жизненно важных органов, положительно влиять на органы-мишени.
5. Не вызывать тахикардию, не ухудшать функциональные резервы сердца (не нарушать процессов срочной и долговременной адаптации сердца к повышенной нагрузке), вызывать обратное развитие гипертрофированного миокарда.
6. Улучшать эндотелиальную функцию (ЭФ).
7. Быть мало токсичным, не ухудшать качество жизни (не снижать умственную, физическую работоспособность, сексуальные потенции), иметь большую широту терапевтического действия.

8. Не нарушать жировой, углеводный и водно-солевой обмен, т.е. препарат должен быть метаболически нейтральным.
9. Снижать риск развития сердечно-сосудистых осложнений, улучшать прогноз.
10. Быть относительно дешевым и удобным в употреблении.

Для купирования острых гипертензивных состояний (гипертонических кризов) лекарственный препарат должен:

1. Обладать высокой антигипертензивной активностью, специфичностью действия на сердечно-сосудистую систему.
2. Приводить к быстрому, но нерезкому снижению системного АД. Оказывать кратковременное гипотензивное действие.
3. Не вызывать тахифилаксии.
4. Не нарушать кровоснабжение жизненно важных органов, не оказывать кардиотоксического действия.

На этапе доклинических исследований гипотензивной активности новых веществ трудно в полной мере ответить на вопрос: а в какой мере новое разрабатываемое лекарственное вещество будет отвечать выше обозначенным требованиям? Однако в ходе доклинического исследования разработчик должен постараться в максимальной степени изучить фармакодинамику и фармакокинетику вещества — для того, чтобы обозначить особенности его кардиоваскулярного действия, дополнительные полезные эффекты и определить, имеющиеся преимущества перед уже применяющимися ЛС для лечения гипертонической болезни и близкими к нему по механизму действия препаратами.

2. Основные этапы доклинических исследований

1-й ЭТАП — скрининг. Задача — из определенного числа близких по структуре соединений выявить и отобрать вещество с выраженным гипо- и антигипертензивным действием, определить зависимость доза–эффект, его острую токсичность и широту терапевтического действия в сопоставлении с препаратом сравнения (эталонном).

2-й ЭТАП — углубленное изучение особенностей и возможного механизма гипотензивного действия фармакологических средств (ФС)

Основные задачи:

1. Изучить влияние ФС на базовые показатели центральной гемодинамики.
2. Исследовать возможный механизм гипотензивного действия (симпатикотропное центральное и периферическое) и влияние на активность ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, миотропное действие.
3. Изучить эндотелиотропные эффекты вещества.
4. Изучить метаболические эффекты исследуемого вещества.

Дополнительные задачи:

1. Изучить влияние ФС на тонус резистивных и емкостных сосудов и приток крови к сердцу.
2. Изучение влияния на буферные сосудистые рефлексы в норме и в условиях эмоционально-болевого воздействия.
3. При выявлении возможного влияния на психо-эмоциональную и когнитивную функцию (процессы поведения, обучения, памяти) расширить изучение спектра психотропных эффектов.
4. При наличии эндотелиотропного действия расширить изучение влияния вещества на другие функции эндотелия (пролиферативную, воспалительную).
5. Изучить влияние вещества на агрегацию свертываемость крови.

2.1. Скрининг

Проведение скрининга и углубленного изучения веществ с антигипертензивным действием может проводиться с учетом технических возможностей лаборатории, обученности исследователей, их предпочтений в выборе средств и путей достижения по-

ставленной цели — это создание оригинального, высокоэффективного и малотоксичного препарата.

Скрининг веществ с гипо- и антигипертензивным действием необходимо выполнить на нескольких видах экспериментальных животных (крысах, кошках, кроликах и др.), нормо- и гипертензивных, наркотизированных и бодрствующих животных, при однократном и курсовом введении.

Для начала необходимо решить первую задачу и ответить на вопрос: обладает ли ФС гипотензивной активностью, будучи взятым в стандартной, заведомо большой дозе.

Для этого выполняются две серии по 3–4 исследования. Регистрацию АД можно осуществлять неинвазивным и инвазивным методами. Неинвазивным методом можно регистрировать АД с хвоста крысы с помощью фотоплетизмографического или сфигмоманометрического датчика и монитора давления и использованием компьютерных пакетов программ. Для этого первоначально в течение 10 дней необходимо приучить крыс к введению препарата через рот, помещению их в пенал для ограничения их движений во время измерения АД и манипуляциям, связанным с измерением АД с хвоста крысы. О приученности судим по отсутствию сопротивления и возбуждения при помещении животных в пенал и по стабильным показателям АД измеряемым этим методом. Такой подход позволяет длительно использовать экспериментальных животных, повторяя введение одной дозы, уменьшая или увеличивая ее.

В первой серии исследований ФС вводится внутрь в дозе 1/10 от молекулярной массы вещества, но не более 50 мг/кг нормотензивным, а при возможности спонтанно-гипертензивным крысам (SHR).

При регистрации АД инвазивным способом предварительно животным вживляется полиэтиленовый катетер в бедренную или сонную артерию для прямой регистрации АД. В течение 6–24 ч после введения вещества регистрируются АД и частота сердцебиений. Для проведения эксперимента требуются электроманометр с малым объемным смещением (не более 0,01 мл/100 мм рт.ст.), кардиотахометр, запускаемый пульсовой волной АД и двухканальный регистратор. ФС подвергается дальнейшему изучению, если под его влиянием АД понижается на 15–25 мм рт. ст. или более на период 2 ч или более. Если вещество первоначально снизило АД незначительно, но продолжительно, можно повторить измерение АД на следующий день и повторно ввести исследуемое вещество и регистрацию продолжить в течение нескольких часов. Если при повторных введениях вещества животным с экспериментальной гипертензией антигипертензивный эффект возрастает и стабильно (длительно) сохраняется сниженным, целесообразно продолжить его изучение. При обнаружении гипо-, антигипертензивного эффекта целесообразно изучить зависимость доза–эффект. Для этого животным вводится вещество в дозе в 2 раза меньше первоначальной, и если эффект выраженный или незначительно уступает предыдущему, дозу можно еще раз уменьшить в 2–5 раз. Такой подход позволит рассчитать ЭД₂₀, т.е. дозу, снижающую АД на 20%.

В исследованиях второй серии (3–4 эксперимента) ФС вводится в дозе 5 мг/кг внутривенно наркотизированным нормотензивным крысам. У животных измеряются АД и частота сердцебиений. В связи с отсутствием гипотензивного эффекта у нормотензивных животных при однократном введении бета-адреноблокаторов и ингибиторов ангиотензин-конвертирующего фермента протокол исследования включает введение стандартной дозы изадрина и ангиотензина-II до и после введения исследуемого вещества. ФС подвергается дальнейшему изучению, если оно приводит к снижению АД на 15–25 мм рт.ст. и более или угнетает эффекты изадрина или ангиотензина-II, даже в случае отсутствия заметного влияния на АД.

Далее необходимо определить ЛД₅₀, лучше при двух путях введения (пероральном и внутрибрюшинном) и на двух видах животных (мышьях и крысах), что позволит рассчитать терапевтический индекс. Подробное описание методов расчетов ЛД₅₀ приведено в данном руководстве.

После этого необходимо определить видовую чувствительность экспериментальных животных к сосудистому действию ФС.

Исследования проводятся на двух–трех видах животных: крысы, кошки, кролики, собаки, морские свинки и др. (желательно два вида грызунов и один вид животных, не относящихся к грызунам) при введении веществ, обладающих отчетливой гипотензивной активностью. ФС вводится в эффективной дозе (ранее определена при изучении зависимости доза–эффект) 3–4 животным. Одинаково выраженное гипотензивное действие ФС в исследованиях на животных разных видов повышает вероятность перенесения экспериментальных данных по гипотензивной активности ФС на человека.

Животное во время исследования обогревается, чтобы температура тела его была в пределах 37–38 °С. В каждой лаборатории должны быть подобраны стандартные дозы тестирующих препаратов (агонистов и антагонистов различных рецепторов).

Предлагаемая схема скрининга эксперимента позволяет получить данные о наличии гипотензивной активности ФС, определить ЭД₂₀, т. е. дозу, снижающую АД на 20%, рассчитать терапевтический индекс (ТИ):

$$ТИ = \frac{ЛД_{50}}{ЭД_{20}}.$$

Если скрининг осуществляется среди соединений одного химического ряда, близких по структуре препарату с известным рецепторным механизмом гипотензивного действия, он может проводиться *in vitro*. *In vitro* исследование выполняется на изолированных сосудах (берется кольцо или спираль артериальных или венозных сосудов, лучше первые) или изолированном сердце или его фрагменте (предсердие, трабекулы миокарда, папиллярные мышцы) с регистрацией их сокращения под влиянием изучаемых соединений в различных концентрациях. Вещество может не оказывать прямого действия на тонус сосудов или на работу сердца, в этом случае следует провести исследование, используя различные агонисты и антагонисты. Таким образом можно выявить возможное альфа- и бета-адреноблокирующее действие, а также дофамино-, М-холино-, серотонино-, ангиотензинергическое действие.

На основании данных, полученных *in vitro*, можно провести сравнение активности исследуемых веществ по IC₂₀ или IC₅₀. После этого необходимо с наиболее активным соединением провести исследование *in vivo*, как это описано выше.

Количественную оценку гипотензивной активности ФС (ЭД₂₀) рекомендуется проводить в исследованиях на крысах с таким типом экспериментальной гипертензии, которая наиболее чувствительна к действию соединений с данным механизмом действия. Так, например, при изучении новых ингибиторов ангиотензин-конвертирующего фермента желательно проводить эксперименты на крысах с двухпочечной моделью гипертензии (удаление одной почечной артерии и выведение другой под кожу спины животного с последующим тугим ушиванием мышц под почкой). У таких животных вследствие ишемии оставшейся почки в первые недели развития гипертензии повышена активность ренин-ангиотензиновой системы. Большинство других соединений с гипотензивной активностью может быть изучено на спонтанно-гипертензивных крысах и крысах с ДОКА-солевой гипертензией.

На основании экспериментов на этапе скрининга экспериментатор имеет возможность сравнить новое ФС и адекватно выбранный препарат сравнения по силе и длительности гипотензивного действия, по терапевтической широте, частично получить предварительные представления о возможных побочных эффектах и т. д.

Данные, полученные на этапе скрининга, пока лишь позволяют сделать вывод о перспективности его дальнейшего углубленного изучения, т.к. выраженность и продолжительность гипотензивного действия еще недостаточно для определения преимуществ перед известными препаратами и окончательного решения о разработке на его основе ЛС. Это вещество при равных кардиоваскулярных свойствах должно иметь определенные

преимущества перед существующими средствами, близкими по механизму действия, по другим дополнительным (плейотропным) свойствам.

Существенными положительными свойствами нового вещества могут быть:

- благоприятный гемодинамический механизм гипотензивного действия (умеренное увеличение сердечного выброса на фоне снижения сосудистого сопротивления и частоты сердечных сокращений);
- улучшение кровоснабжения сердца, мозга, почек;
- улучшение углеводного, жирового, водно-солевого обмена;
- улучшение вазодилатирующей, антитромботической, антипролиферативной, про-тивовосполительной функции эндотелия;
- улучшение психоэмоционального состояния (положительное влияние на тревожно-депрессивную симптоматику) и когнитивной функции.

Результаты второго этапа исследований должны дать ответ на вопрос: имеет ли новое соединение преимущества перед уже известным и используемым в клинике препаратом со сходным механизмом действия.

2.2. Углубленное изучение особенностей и механизма действия нового фармакологического средства

На втором этапе исследований необходимо получить ответы на несколько принципиальных вопросов:

1. Каков гемодинамический механизм гипо-антигипертензивного действия данного вещества, т.е. влияние на основные показатели гемодинамики: минутный объем крови, общее сосудистое сопротивление, частоту сердечных сокращений, сократимость миокарда.
2. Влияние вещества на кровоснабжение жизненноважных органов (сердца, мозга, почек).
3. Учитывая значительную роль в развитии гипертензии эндотелиального фактора и роль эндотелиальной дисфункции в развитии сердечно-сосудистых осложнений — необходимо изучить влияние вещества на эндотелиальную функцию (ограничившись определением ее вазодилатирующей и антитромботической функций).
4. Определить ориентировочный нейро-гуморальный механизм гипотензивного действия:

- наличие центрального или периферического симпатотропного действия;
- взаимодействие вещества с альфа- и бета-адренорецепторами, серотониновыми, М-холинорецепторами и др.;
- возможное влияние на ренин-ангиотензин-альдостероновую систему и уровень катехоламинов в плазме крови;
- миотропное действие.

Предварительные данные о механизме гипотензивного действия ФС позволят обоснованно подойти к выбору препарата сравнения из большого набора применяемых в клинике антигипертензивных препаратов.

2.2.1. Изучение влияния ФС на основные показатели центральной гемодинамики

Экспериментальные животные — крысы 180–350 г, кошки 2–4 кг, кролики 2,5–4 кг, собаки 8–15 кг. Наркоз — нембутал 50 мг/кг или уретан с хлоралозой соответственно 600 и 40 мг/кг. САД измеряется электроманометром или ртутным манометром Людвиг в общей сонной артерии или в бедренной артерии.

Минутный объем крови (МОК) определяется методом электромагнитной, ультразвуковой флоуметрии, термодилуции или тетраполярной реографии.

Электромагнитная и ультразвуковая флоуметрия требует соответствующего оснащения, перехода животного на искусственное дыхание и сложных хирургических манипуляций — вскрытие грудной клетки, выделение восходящей части аорты, наложение датчика на нее и др. Достоинством этого метода определения МОК является:

- а) возможность непрерывного наблюдения за динамикой сердечного выброса;
- б) возможность регистрации первой производной сигнала кровотока в аорте, по которой можно судить о контрактильности левого желудочка.

Для регистрации МОК пригоден старый, но хорошо апробированный метод термодилуции, который подробно описан в литературе, и дающий достоверные данные о величине сердечного выброса. Недостатком метода является дискретность определения показателей МОК.

Для определения ударного выброса и минутного объема крови может с определенным успехом использовать метод тетраполярной реографии, если экспериментатор овладел, а запись и расчет всех показателей производится автоматически с помощью специального пакета компьютерных программ.

В ходе исследования может регистрироваться ЭКГ. Величина общего периферического сопротивления (лучше рассчитывать удельное периферическое сопротивление) оценивается по формуле:

$$УПС = АД / МОК / кг \text{ массы животного.}$$

В фармакологическом эксперименте нас интересует не абсолютная величина показателей кровообращения, а их динамика после введения исследуемого препарата по сравнению с исходными величинами.

Эти исследования имеют важное значение для понимания гемодинамического механизма гипотензивного действия препарата, для прогноза его возможного дальнейшего применения в клинической практике и определения более рациональных путей к дальнейшему его углубленному изучению.

2.2.2. Изучение влияния ФС на кровоснабжение жизненноважных органов: мозг, сердце, почки

В исследованиях данной серии важно оценить влияние ФС на объемную скорость кровотока в жизненно важных органах. Для этого необходимо использовать любой из методов определения кровотока — ультразвуковую или электромагнитную флоуметрию, капельные измерители венозного оттока (методы подробно описаны в других главах настоящего руководства).

Одним из наиболее удобных и информативных является метод с использованием меченых изотопами микросфер [12], позволяющий определить объемную скорость кровотока в любом органе или ткани.

О влиянии нового вещества на коронарное кровообращение, функциональное состояние очага ишемии можно судить по изменению сегмента ST на множественных ЭКГ сердца, записанных в норме и при временной ишемии миокарда до и после введения исследуемого вещества.

2.2.3. Оценка центрального и периферического симпатикотропного компонента в механизме гипотензивного действия ФС

Для оценки центрального компонента в действии ФС могут быть использованы как достаточно простые так и сложные методы с использованием оборудования, позволяющего регистрировать фоновую и вызванную активность в пре- и постганглионарных волокнах, например почечном и нижесердечном нервах. К простым методам можно отнести изучение изменений АД под влиянием вещества у спинальных животных или животных с разрушенным мозгом. Электрическая стимуляция преганглионарных симпатических волокон у животных с разрушенным мозгом осуществляется с помощью спицы из нержавеющей стали, вставленной в спинномозговой канал. Неизолированный участок спицы-электрода может быть установлен на любом уровне канала для избирательной стимуляции сосудистых (уровень нижних грудных и верхних поясничных сегментов) или сердечных (уровень верхних грудных сегментов) симпатических волокон. Отсутствие влияния изучаемого ФС на фоновый уровень давления

и прессорные реакции, вызванные электрической стимуляцией, у животных с разрушенным мозгом позволяет думать о центральном механизме гипотензивного действия. Убедительные данные о наличии или отсутствии центрального гипотензивного действия вещества могут быть получены в исследованиях с введением соединения внутривенно и в позвоночную артерию. Если одинаковое снижение АД может быть вызвано введением в десятки раз меньшей дозы ФС внутриартериально по сравнению с дозой, вводимой внутривенно, то это говорит о наличии центрального механизма в развитии гипотензивного эффекта.

Центральное симпатингибирующее действие можно исследовать в условиях стимуляции седалищного нерва и регистрации изменений АД до и после введения исследуемого вещества (с помощью ртутного, электроманометра на мехатронах, тензодатчиках и др.; в этих случаях жесткие требования к измерителям АД, но желателен небольшой объем смещения). Исследования выполняются на наркотизированных крысах и кошках.

Параметры стимуляции седалищного нерва подбираются произвольно, ориентируясь на величину подъема системного АД (обычно 30–35 мм. рт. ст.). Сравнивая степень прессорной реакции до и после введения исследуемого вещества мы можем судить (при исключении периферического ганглионарного, симпато- и адренолитического действия) о центральном симпатингибирующем действии.

Например: Подъем АД при стимуляции седалищного нерва до введения исследуемого вещества в среднем равнялся $\Delta_1 = 32$ мм.рт.ст., а после введения $\Delta_2 = 8$ мм.рт.ст., тогда симпатингибирующее действие (СИ) можно вычислить по формуле:

$$СИ = \frac{\Delta_1 - \Delta_2}{\Delta_1} \times 100\% = \frac{32 - 8}{32} = 100\% = 75\%,$$

где Δ_1 и Δ_2 — степень повышения АД до (Δ_1) и после (Δ_2) введения вещества.

В данном случае подавление прессорных реакций на 75% зависит от симпатингибирующего действия. Изучение ганглионарного действия описано выше.

Если лаборатория располагает приборами, регистрирующими кровотоки (ультразвуковые, электромагнитные расходомеры), можно выполнить исследование с регистрацией кровотока в бедренной артерии или мышце бедра при стимуляции поясничной симпатической цепочки ниже уровня L_4 .

При раздражении поясничной цепочки, пересеченной выше места стимуляции, наблюдается сужение сосудов и падение кровотока в бедренной артерии или мышце бедра. Сравнивая эффект до и после введения исследуемого вещества, можно заключить о наличии ганглионарного действия. Например: до введения вещества в ответ на стимуляцию поясничной симпатической цепочки кровотоки снижались на 30%, и после введения при тех же параметрах стимуляции кровотоки снижались на 32%. Можно заключить, что вещество не оказывает ганглионарное, симпато- и адренолитическое действие, а подавление прессорных реакций АД, вызванных раздражением седалищного нерва, обусловлено центральным симпатингибирующим действием.

Если вещество уменьшает падение кровотока при раздражении поясничной симпатической цепочки, но не меняет прессорные реакции на введение тирамина и норадреналина, то это свидетельствует о его ганглионарном действии.

2.2.4. Оценка влияния ФС на эндотелиальную функцию, липидный, углеводный и водно-солевой обмен

Такая оценка является важным моментом в характеристике нового химического вещества с антигипертензивным действием. Учитывая частую комбинацию ГБ с сахарным диабетом (СД) или метаболическим синдромом (МС) данные о положительном или негативном влиянии на указанные виды обмена веществ приобретают принципиальное значение и могут либо повысить шансы занятия достойного места в лечении ГБ, либо наоборот, значительно ограничить их клиническое применение в будущем.

Результаты проспективных исследований свидетельствуют, что эндотелиальная дисфункция (ЭДФ) всегда сопутствует ГБ и является прогностическим фактором риска сердечно-сосудистых осложнений и смертности. Поэтому любое лечение сердечно-сосудистых заболеваний должно учитывать влияние терапии на ЭФ/ЭДФ, а при терапии ГБ задачей является не только нормализация АД, но и нормализация ЭФ.

Для изучения влияния веществ одновременно на углеводный, жировой, водно-солевой обмен веществ, а также на эндотелиальную функцию приемлемой моделью может служить экспериментальный СД, индуцированный стрептозотоцином или аллоксаном. В этом случае при моделировании СД на крысах (могут использоваться и беспородные животные, и крысы линии Вистар), зрелого возраста (8–12 мес. и более) и массой 280–350 г. Уже через неделю после введения стрептозотоцина в дозе 40–50 мг/кг отмечается значительное повышение сахара в крови (в дальнейшем в работу отбираются животные с уровнем сахара в крови выше 12–15 ммоль/л), а также ЛПНП, атерогенного коэффициента, развитие эндотелиальной дисфункции, практически всегда микроальбуминурии.

Через 10–15 дней проведенного курсового лечения можно определить влияние соединений на обмен веществ, на потребление пищи и воды, оценить основные функции эндотелия (вазодилатирующую, антитромботическую, пролиферативную, противовоспалительную).

Для оценки влияния вещества на ЭФ могут использоваться различные методы: инвазивные и неинвазивные, биохимические, функциональные, морфологические, выбор которых зависит от поставленных задач и имеющегося оборудования, обученности персонала, его приверженности к методам исследования.

Биохимическими маркерами ЭДФ являются:

- оксид азота (его метаболиты — нитриты, нитраты);
- эндотелиальная NO-синтаза;
- эндотелин-1;
- фактор Виллебранда;
- С-реактивный белок и др.

Разрабатываемая методическая стратегия изучения ЭДФ базируется на определении маркеров, вырабатываемых эндотелием или их метаболитов, или изучение их эффектов. ЭДФ в первую очередь проявляется нарушением продукции NO. Оксид азота является мощным вазодилататором и модулятором выработки других активных веществ в эндотелии, играет ключевую роль в кардиоваскулярном гемостазе, ингибируя адгезию и агрегацию циркулирующих тромбоцитов, предотвращая пролиферацию клеток гладких мышц сосудов и др. В тоже время признается, что именно NO-продуцирующая функция эндотелия оказывается наиболее ранимой системой.

NO имеет короткий период жизни (от 6 до 30 с), поэтому определяются его метаболиты — нитриты и нитраты. Определение метаболитов NO требует тщательной подготовки больного или животного, забора крови в 8–9 ч, когда отмечается базальная концентрация NO. Однако изучение одних метаболитов оксида азота вряд ли позволит получить полную информацию о состоянии NO-продуцирующих систем, поэтому объективным и наиболее реальным способом оценки состояния эндотелия *in vivo* является определение эндотелий-зависимой вазодилатации (ЭЗВД) при инфузии ацетилхолина, серотонина, брадикинина.

Вазодилатирующую функцию эндотелия можно оценить в эксперименте с регистрацией кровотока в определенной сосудистой области (сосудах конечности, мозга, почки и др.) при введении ацетилхолина. Сравнивая ЭЗВД у животных контрольной (интактной) группы и контрольной группы животных с экспериментальным СД, можем заключить о выраженности ЭДФ по разнице вазодилатации у животных этих групп.

Например, введение ацетилхолина интактным животным вызывает увеличение кровотока на 40%, у животных с экспериментальным СД на 12%, а у животных с СД, полу-

жавших исследуемое вещество, на 36%. На основании этих данных можем сделать вывод о том, что у животных с СД ЭЗВД снижена на 75%, а вещество № улучшает ЭФ у животных с экспериментальным СД на 67%.

Эндотелий независимая вазодилатация проверяется по реакции на нитроглицерин или нитропруссид натрия. Как правило, она у животных с экспериментальным СД не отличается от интактных животных, т.е. выраженность вазодилатации практически равная.

Изучение вазодилатирующей функции эндотелия при необходимости можно расширить, используя L-аргинин (воспроизводя «L-аргининовый парадокс»), а мощность NO-синтезирующей системы введением нитро-L-аргинина, или повторными введениями ацетилхолина в нарастающих дозах или через короткий интервал времени [16].

Антитромботическая функция эндотелия может оцениваться использованием тех же регистраторов кровотока в бедренной или сонной артерии при аппликации на стенку артерии 50% раствора хлорида железа, инициирующего развитие тромба в просвете сосуда и, в конечном, остановку кровотока. У интактных животных в сонной артерии, в указанных условиях, полная остановка кровотока происходит через 20–23 мин после аппликации хлорида железа, у животных с СД в среднем через 8 мин, с недостаточностью половых гормонов через 10–11 мин. Это свидетельствует о выраженной эндотелиальной дисфункции и значительном снижении антитромботической функции эндотелия у животных с СД. Общеизвестно утверждение, что микроальбуминурия всегда связана с эндотелиальной дисфункцией. Исходя из этого, для оценки ЭДФ, а также нефропатии, может использоваться тест с микроальбуминурией.

Для оценки степени альбуминурии определяется содержание общего белка в суточной моче с использованием набора (Общий белок «Ольвекс Диагностикум» (с бромфеноловым синим), 200 мл). Принцип метода основан на том, что в результате взаимодействия белковых молекул с бромфеноловым синим в кислой среде образуется окрашенный комплекс, имеющий максимум поглощения при длине волны 613 нм.

Влияние исследуемого вещества на липидный и углеводный обмен можно также изучить на животных с экспериментальным сахарным диабетом. Концентрацию общего холестерина (ХС) и триглицеридов (ТГ) определяют в сыворотке крови, а ХС липопротеидов высокой плотности — в супернатанте после преципитации ЛП, содержащих ЛП низкой и очень низкой плотности с использованием ферментативных колориметрических тестов «Ольвекс Диагностикум», и вычисляют значение концентрации ХС ЛПНП по формуле Фридвальда (1972) и индекс атерогенности по А.Н. Климову (1999).

Общий холестерин определяют с помощью стандартного биохимического набора (например: Холестерин общий, «Ольвекс Диагностикум», (фермент), 2×100 мл). Принцип метода основан на образовании окрашенного соединения (хинониминового красителя); концентрация хининомина, определенная фотометрически при $\lambda = 500$ нм, пропорциональна концентрации общего холестерина в исследуемом образце.

Количественное определение глюкозы в крови и моче можно проводить ферментативным (глюкозооксидазным) методом с измерением величины оптической плотности надосадочной жидкости в кюветах с длиной оптического пути 10 мм при длине волны 500 нм на спектрофотометре с использованием наборов «Глюкоза ФКД» (Россия). В дальнейший эксперимент отбираются животные с уровнем сахара крови выше 12–15 ммоль/л, то есть крысы с развившимся сахарным диабетом.

2.2.5. Изучение влияния ФС на уровень катехоламинов и активность ренина в плазме крови

Для ответа на вопрос о нейро-гормональных сдвигах в организме экспериментальных животных, которые могут возникать под влиянием ФС, нет необходимости проводить специальные эксперименты. Кровь для биохимического определения ренина и катехоламинов может быть забрана у животных, используемых в других сериях исследований.

2.2.6. Влияние ФС на психоэмоциональное состояние и когнитивную функцию

Выявление возможного влияния изучаемого ФС на психоэмоциональное состояние и когнитивную функцию выполняется с применением общепринятых методических подходов: изучение поведения животных в тестах:

- «открытое поле»;
- приподнятый крестообразный лабиринт;
- пассивного избегания с отрицательным (болевым) подкреплением (УРПИ);
- активное избегание с отрицательным (болевым) подкреплением (УРАИ);
- теста экстраполяционного избавления;
- подвешивания мышей за хвост.

При наличии анксиолитического действия можно добавить тест конфликтной ситуации по Vogel.

Результаты, полученные с помощью указанных тестов позволяют отметить наличие или отсутствие влияния изучаемого вещества на психо-эмоциональное состояние животных и их когнитивную функцию.

Предлагаемый комплекс методов позволяет ответить на все вопросы, поставленные перед фармакологом на втором этапе доклинических исследований нового вещества и является достаточным для оценки специфической активности новых антигипертензивных препаратов. Все эксперименты второго этапа исследований должны проводиться в одинаковом объеме для нового соединения и препарата сравнения.

При изучении ФС могут быть случаи, когда по механизму действия новое соединение не похоже ни на одно из классических гипотензивных средств, предлагаемых в качестве препарата сравнения. В таком случае экспериментатору предлагается провести дополнительные исследования с целью более полной характеристики препарата, а в качестве препарата сравнения выбрать препарат, который более других сходен с новым веществом по характеристикам антигипертензивного действия, влиянию на кровоснабжение жизненно важных органов и основные показатели кардио- и гемодинамики.

К *дополнительным методам* исследования могут быть отнесены следующие.

— Углубленное изучение психотропной активности, если она была выявлена на 2 этапе исследований (см. соответствующие главы настоящего руководства). Изучение влияния ФС на гладкие мышцы сосудов.

— Сравнительное изучение действия ФС на тонус резистивных и емкостных сосудов, на приток крови к сердцу.

В физиологической литературе признается значительная роль емкостных сосудов в формировании притока крови к сердцу и динамики сердечного выброса [14]. В последнее время показано, что емкостные сосуды играют важную роль в становлении гипертонической болезни; в частности, повышение тонуса емкостных сосудов в начальной стадии гипертонии ведет к увеличению притока крови к сердцу и повышению сердечного выброса.

Несмотря на важную функцию емкостного отдела в физиологии и патологии системы кровообращения, до сих пор мало изучено действие вазоактивных веществ на тонус венозных сосудов.

Методы исследования тонуса аккумулирующих сосудов у животных описаны [15]. Авторы подчеркивают, что основным параметром венозного отдела сосудистой системы является не венозное давление, которое не может характеризовать ни емкостной функции этих сосудов, ни активности их гладкомышечных образований, а объем крови, что и определяет необходимость изучения кровенаполнения венозных сосудов. Метод аккумуляграфии, предложенный Д.П. Дворецким (1967), позволяет одновременно судить об изменении тонуса резистивных и емкостных сосудов.

— Расширенное исследование эндотелиотропных эффектов, если они были выявлены на втором этапе (влияние ФС на пролиферативные и воспалительные процессы в сосудистой стенке, биохимические маркеры ЭФ/ЭДФ).

— Изучение влияния ФС на сократимость миокарда и функциональные резервы сердца.

Учитывая то, что при ГБ сердце работает с повышенной нагрузкой, миокард гипертрофируется, что первоначально повышает его резервы, а в последующем может вести к их снижению, представляется практически важным дать оценку влияния ФС на инотропные резервы сердца. Исследование выполняется на гипертензивных крысах. Проводится курсовое лечение ФС до нормализации АД и затем еще 2 недели. После этого выполняется тест с физической нагрузкой «до предела». Сравнительно показатели пролеченных животных и животных контрольной группы с той же формой гипертензии, но не леченной, можно сделать вывод о повышении функциональных резервов сердца.

Более валидным подходом к оценке влияния ФС на инотропные резервы сердца является использование нагрузочных проб: нагрузки объемом, пробы на адренореактивность, максимальной изометрической нагрузки (подробное описание выполнения этих экспериментов представлено в данном руководстве в методических рекомендациях по доклиническому изучению эффективности ЛС для лечения заболеваний ССС).

— Изучение влияния на буферные сосудистые рефлексы в норме и в условиях эмоционально-болевого воздействия.

В поддержании нормального уровня системного АД важную роль играют буферные синокаротидные и артериальные рефлексы. Данные о влиянии вещества на функционирование прессорных и депрессорных каротидных рефлексов имеют теоретическое и практическое значение.

Исследования могут выполняться на наркотизированных животных (прессорный и депрессорный рефлекс в этих исследованиях воспроизводится обычным путем) и на животных в свободном поведении.

У животных в свободном поведении прессорный рефлекс можно получить кратковременным пережатием общей сонной артерии окклюдером любой конструкции. Большие трудности представляет воспроизведение депрессорного рефлекса. С этой целью используют лишь кардиохронотропный компонент барорефлекса при повышении АД на 30–40 мм рт. ст., вызванном введением мезатона или норадреналина.

— Влияние ФС на спонтанную и вызванную стимуляцией центральных структур или различных афферентов активность в преганглионарных (белая соединительная веточка) и постганглионарных (почечный и нижнесердечный нервы) волокнах симпатических нервов.

Исследования проводятся на наркотизированных животных с интактным мозгом, децеребрированных (межколликкулярная перевязка) и спинальных (пересечение спинного мозга по С1 или С8) кошках. Спонтанная и вызванная активность в пре- и постганглионарных волокнах регистрируется обычным способом. Сосудистые прессорные и депрессорные реакции АД и электрофизиологические ответы в соответствующих нервах вызываются прямой и рефлекторной активацией продолговатого и спинного мозга.

Заключение

Рекомендованное комплексное исследование позволяет выявить ФС, которые по спектру и характеру своего действия могут быть предложены для КИ в качестве антигипертензивных средств.

Вместе с тем нужно иметь в виду, что в процессе доклинического изучения нового ФС может возникнуть необходимость проведения дополнительных исследований, направленных на более детальное изучение механизмов действия, имеющих важное значение для оптимизации клинического применения каждого из предложенных веществ. В данном случае перечень дополнительных методов исследования ФС может быть столь обширным, что экспериментатор должен сам решить, какие методы самые информативные с учетом специфических особенностей каждого соединения.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении

правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Алмазов В.А., Цырлин В.А., Шляхто Р.В., Маслова Н.П. Антигипертензивные препараты. — Л., 1997.
2. Арабидзе Г.Г., Белоусов Ю.Б., Варакин Ю.Я. Диагностика и лечение артериальной гипертонии: Методические рекомендации. — М., 1997.
3. Вальдман А.В., Козловская М.М., Медведев О.С. Фармакологическая регуляция эмоционального стресса. — М., 1979.
4. Воронина Т.А., Середенин С.Б. Экспериментальное изучение препаратов с транквилизирующим (анксиолитическим) действием // Вестник Фармакологического комитета. — 1998. — № 2. — С. 19–24.
5. Воронина Т.А., Островская Р.У. Экспериментальное изучение препаратов с ноотропным типом действия // Вестник Фармакологического комитета. — 1998. — № 2. — С. 25–31.
6. Дворецкий Д.Л. Регуляторные взаимоотношения сосудов малого и большого кругов кровообращения: Дисс. ... канд. мед. наук. — Л., 1967.
7. Доклад научной группы ВОЗ. Принципы оценки лекарственных средств, применяемых в медицине. Серия технических докладов ВОЗ. — 1997. — № 563.
8. Доклад комитета экспертов ВОЗ. Борьба с артериальной гипертонией. — М., 1997.
9. Зубарев А.Р., Григорян А.Р. Ультразвуковое ангиосканирование. — М., 1991.
10. Климов А.Н. Обмен липидов и липопротеидов и его нарушения. — СПб.: Питер, 1999.
11. Кушаковский М.С. Гипертоническая болезнь и вторичные артериальные гипертензии. — М., 1982.
12. Медведев О.С., Южаков С.Д., Машковский М.Д. и др. Влияние атиенолола и пропранолола на системную и региональную гемодинамику // Бюлл. экспер. биол. и мед. — 1983. — № 7. — С. 59–61.
13. Петров В.И., Недогада С.В., Тихонов В.П. Гипертоническая болезнь. — Волгоград, 1997.
14. Ткаченко Б.И. Венозное кровообращение. — Л., 1974.
15. Ткаченко Б.И., Чернявская Г.В. Изучение емкостных сосудов. — В кн.: Методы исследования кровообращения. — Л., 1976. — С. 4–78.
16. Тюренков И.Н., Воронков А.В. методический подход к оценке эндотелиальной дисфункции в эксперименте // Эксперим. и клин. фармакология. — 2008. — №1. — С. 49–51.
17. Чазов Е.И. Пути поиска фармакологически активных веществ для лечения больных с заболеваниями сердца и сосудов. — В кн.: Целенаправленный поиск новых сердечно-сосудистых препаратов. — Рига, 1980. — С. 5–19.

Список сокращений

АГ — артериальная гипертония
АД — артериальное давление
ЛПНП — липопротеины низкой плотности
МОК — минутный объем крови
МС — метаболический синдром
СД — сахарный диабет
ТГ — триглицериды
ТИ — терапевтический индекс
ФС — фармакологическое средство
ХС — холестерин
ЭДФ — эндотелиальная дисфункция
ЭЗВД — эндотелий-зависимая вазодилатация
ЭКГ — электрокардиограмма
ЭФ — эндотелиальная функция

ГЛАВА 22

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ КАРДИОТОНИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: член-корр. РАМН, проф. И.Н. Тюренков; д. б. н. В.Н. Перфилова

Введение

Сердечная недостаточность (СН) — наиболее тяжелая сердечно-сосудистая патология, которая является следствием многих заболеваний: перенесенных инфаркта миокарда и инфекций, врожденных или приобретенных пороков сердца, артериальной гипертензии, некоторых гормональных заболеваний, хронической алкоголизации и мн. др. СН характеризуется снижением сократимости миокарда и падением сердечного выброса, что ведет к ухудшению кровоснабжения жизненно важных органов. В свою очередь, нарушение кровоснабжения мозга, почек, сердца запускает целый каскад патофизиологических процессов, формируя порочный круг, ведущий к дальнейшему прогрессированию СН. Например, снижение кровоснабжения мозга ведет к активации симпатических центров и симпатической нервной системы (СНС), а последнее — к сужению резистивных и емкостных сосудов и к увеличению пред- и постнагрузки. Гипоксия почек приводит к усилению выработки ренина, что в сочетании с активацией СНС ведет к стимуляции всей системы ренин-ангиотензин-альдостерон (РААС). Повышенная активность РААС приводит к сужению резистивных и емкостных сосудов, задержке Na и воды в организме, централизации и увеличению объема циркулирующей крови, повышению пред- и постнагрузки. На определенном этапе развития СН сердце перестает справляться с возросшей нагрузкой и перекачивать всю притекающую к нему кровь, в результате в полости сердца растут остаточный объем крови и конечно-диастолическое давление (КДД), дилатируются левый желудочек и левое предсердие, растет центральное венозное давление. Под влиянием СНС, РААС, а также вследствие гипоксии и растяжения устьев полых вен растет автоматизм синусового узла и, вследствие этого, увеличивается частота сердечных сокращений (ЧСС), сердце становится более чувствительным к действию аритмогенных факторов.

Повышенная пред- и постнагрузка, гипертрофированный миокард, высокая ЧСС и КДД ведут, с одной стороны, к повышению потребления сердцем кислорода, с другой, к снижению гемоперфузии сердца, что еще больше усугубляет гипоксию миокарда, при этом нарушаются процессы энергообразования с переходом метаболизма на энергетически менее выгодный анаэробный путь, сопровождающийся повышением в сердечной мышце лактата, возникновением ацидоза. В условиях сформировавшегося и прогрессирующего порочного круга нарастают явления сердечной недостаточности, снижения толерантности к физической нагрузке. Без фармакотерапевтической, а иногда и хирургической помощи больные обречены на преждевременную смерть. В распоряжении клиницистов для лечения СН имеются различные препараты, действие которых направлено на повышение сократимости миокарда (кардиотонические средства) и/или уменьшение нагрузки на сердце (ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, блокаторы ангиотензиновых рецепторов, β -адреноблокаторы, диуретики). В дополнение к указанным группам ЛС назначают и препараты, улучшающие обмен веществ в сердечной мышце, но они играют вспомогательную роль, и эффективность их оценивается невысоко.

Кардиотонические средства гликозидной и негликозидной природы являются базовыми средствами для лечения СН III и IV класса и острой сердечной недостаточности. К сожалению, все кардиотоники, применяющиеся в клинике, обладают малой широтой терапевтического действия, могут вызывать тяжелые осложнения вплоть до летальных, что ограничивает их широкое применение. Эти факты определяют актуальность и социальную значимость создания новых кардиотонических средств, которые бы отвечали ряду принципиальных требований — они должны:

- оказывать выраженное положительное инотропное действие без повышения потребления сердцем кислорода;
- не увеличивать общее периферическое сопротивление, частоту сердечных сокращений;
- не оказывать аритмогенного действия;
- снижать тонус СНС и ингибировать РААС;
- не задерживать Na и воду в организме, не вызывать гипокалиемию и гипомагниемию;
- быть совместимыми с другими препаратами, применяющимися для лечения СН;
- быть малотоксичными, иметь большую широту терапевтического действия;
- быть удобными в употреблении, действовать длительно.

1. Основные этапы исследования

I этап. Скрининг (первичный отбор) веществ с кардиотоническим действием *in vitro* на изолированных органах или *in vivo* с записью параметров, отражающих скорость сокращения и скорость расслабления миокарда. Анализ зависимости «доза (концентрация)—эффект» определение наиболее эффективной дозы соединений, острой токсичности и широты терапевтического действия. Скрининг целесообразно проводить с использованием простых, легко воспроизводимых и экономичных методов, например, оценки параметров изометрического сокращения изолированных препаратов миокарда теплокровных животных или записи ВЖД, регистрации скорости выброса крови в восходящей аорте.

II этап. Изучение кардиотонической активности отобранных соединений на различных экспериментальных моделях острой и хронической сердечной недостаточности *in vivo*, влияние их на гемодинамику, метаболизм, обмен электролитов и др. в сравнении с эталонными препаратами. По завершении II этапа необходимо определить оптимальный путь введения и схему применения соединений.

III этап. Углубленное изучение кардиоваскулярного действия вещества:

- влияния на центральную гемодинамику в норме и при экспериментальной патологии;
- влияния на кровоснабжение жизненно важных органов (сердца, мозга, почек);
- влияния на изменение чувствительности сердца к действию аритмогенных факторов (химических, физических, нейро-вегетативных);
- влияния на потребление сердцем O_2 , утилизацию глюкозы, антиоксидантное действие, митохондриальное дыхание и окислительное фосфорилирование;
- влияния на агрегантные свойства крови и систему гемостаза.

2. Рекомендуемые тесты и биологические модели

Выбор тестов и моделей определяется задачами, стоящими перед исследователями, их обученностью и предпочтениями, имеющимися техническими возможностями. На I этапе необходимо получить ответ на вопрос: обладает ли вещество ино- и хронотропным действием? Для решения этой задачи могут быть использованы методы 1, 2, 4, 5. На II этапе нужно определить выраженность терапевтического действия с использованием моделей 1, 2, 3, показатели терапевтической эффективности, инотропного действия исследуемых соединений (изменения скорости сокращения и скорости расслабления мио-

карда), инотропные резервы, толерантность к физической нагрузке, насосную функцию, показатели центральной гемодинамики.

1. Метод оценки параметров изометрического сокращения изолированных препаратов сердца теплокровных животных (изолированные предсердия, папиллярные мышцы, трабекулы).

2. Метод изучения сократительной функции миокарда на препарате изолированного сердца, перфузируемого по Лангендорфу.

3. Модель сердечной недостаточности изолированных препаратов сердца, вызванная дефицитом кислорода.

4. Метод оценки сократительной активности миокарда путем катетеризации его полостей и записи внутрижелудочкового давления.

5. Метод изучения сократительной функции миокарда на основе анализа кривой фазового кровотока в восходящей части дуги аорты. Этот же метод позволяет определить насосную функцию сердца (УВ, МОК, а при регистрации АД рассчитать ОПСС).

6. Модель острой левожелудочковой недостаточности у собак.

7. Модели хронической сердечной недостаточности:

— дозированный надклапанный стеноз аорты (крысы, кролики, собаки);

— изадриновая интоксикация у крыс;

— экспериментальный инфаркт миокарда у крыс, мышей.

8. Метод определения функциональных резервов сердца с помощью нагрузочных тестов.

3. Условия проведения исследования

Действие фармакологического вещества может изменяться под влиянием ряда физиологических факторов: суточные и сезонные ритмы деятельности организма, температура, влажность, освещенность и кратность воздухообмена помещения, состав подстилок, загрязненность помещения ксенобиотиками и др. Содержание экспериментальных животных должно соответствовать действующим Санитарным правилам по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев). В связи с циркадными ритмами вводить фармакологические вещества в фиксированное время суток и указывать время года, когда проводились эксперименты. Существенное действие на чувствительность животных к фармакологическому веществу может оказать состав пищи. Рекомендуется давать животным стандартную пищу в соответствии с действующими нормами. Для питания мелких лабораторных животных целесообразно использовать автопоилки. Кормление следует производить в фиксированное время, т.к. прием пищи может изменить чувствительность животных к фармакологическому веществу. Наряду с животными, получающими исследуемые фармакологические вещества, в аналогичных условиях должны содержаться контрольные животные.

К моменту начала тестирования необходимо располагать сведениями о химической структуре вещества, его молекулярной массе, физических и физико-химических свойствах: растворимости в воде, жирах, летучести, степени раздробленности, степени электролитической диссоциации и т. д., так как действие лекарственных веществ может зависеть от их физических и физико-химических свойств, например, неполярные, гидрофобные соединения легко всасываются в ЖКТ и способны оказывать резорбтивное действие, большинство полярных веществ плохо всасывается в желудке и кишечнике, и поэтому использование их перорально может быть малоэффективно.

4. Оборудование, инструменты и реактивы

Для изучения инотропных эффектов исследуемых веществ на изолированных органах могут использоваться приборы, обеспечивающие, с одной стороны, оптимальное жизнеобеспечение органа (термостатируемые ванночки, необходимые питательные растворы), с другой стороны — чувствительную систему регистрации сокращений органа (изолирован-

ных предсердий, трабекул, папиллярных мышц). Для этого могут использоваться изометрические и изотонические датчики с механической записью на приборе с широким диапазоном усиления сигнала или с цифровой индикацией. Исследования, выполняемые на изолированных органах, позволяют в широком диапазоне установить зависимость «доза–эффект» (разведение 10^{-3} – 10^{-12}), показать логарифмы «доза–эффект» — $ЭК_{20}$, $ЭК_{50}$, а используя агонисты и антагонисты различных типов рецепторов, установить возможный рецепторный или метаболический механизм кардиотропного действия.

Для регистрации ВЖД в исследованиях *in vivo* при катетеризации левого желудочка (лучше через сонную артерию вводить катетер непосредственно в левый желудочек без вскрытия грудной клетки и помимо записи ВЖД) можно проводить пробы с объемной нагрузкой и на адренореактивность, но нельзя выполнить тест с максимальной изометрической нагрузкой. Для проведения ее и теста навязанного ритма необходимо вскрывать грудную клетку и переводить животных на управляемое дыхание [19]. Для качественной регистрации ВЖД в этих исследованиях нужно использовать высокочувствительные датчики давления без или с очень малым объемом смещения (не более 0,01/на 10 мм рт. ст. смещения). Чем мельче животное и выше ЧСС, тем выше требования к датчикам давления и системам регистрации.

5. Растворители и разбавители

В качестве растворителей могут быть использованы: дистиллированная вода, физ. р-р, ДМСО, спирт в низкой концентрации. В случае применения растворителей типа ДМСО, спирта, необходимо в контрольных исследованиях определить их кардиотропные эффекты. Повысить растворимость исследуемой субстанции может подогревание (но не кипячение!), размешивание при помощи магнитной мешалки.

6. Дозы, пути и режимы введения

Дозы тестируемого вещества нужно рассчитывать на единицу массы тела (мг/кг), если исследование выполняется *in vivo*, если *in vitro* — в концентрации 10^{-10} – 10^{-3} .

Действие каждого фармакологического вещества зависит от дозы (или концентрации). Зависимость доза–эффект может носить линейный, S-образный, гиперболический или иной характер. Если опыты выполняются *in vitro*, кардиотропные эффекты веществ изучаются в разведениях от меньшей (10^{-10} до 10^{-3} моль/л). При сравнении двух одинаково действующих веществ сопоставляют их дозы, в которых вещества вызывают одинаковые по величине эффекты, и по этому показателю судят об активности веществ. Например, если вещество А увеличивает скорость сокращения на 20% в концентрации 10^{-9} моль/л, а вещество Б — в концентрации 10^{-7} , считают, что вещество Б в 100 раз активнее вещества А. Если исследование выполнено *in vivo*, сравнение кардиотропного действия веществ производится по терапевтическому индексу.

Изучаемое вещество необходимо вводить тем способом, который предполагается использовать при клиническом применении. Пероральное (интрагастральное) введение испытуемых веществ проводится с помощью зонда. Внутривенное введение веществ осуществляется, чаще всего, в наружную яремную вену (или интраперитонеально).

7. Экспериментальные животные

При выборе вида лабораторных животных и методов изучения кардиотонического действия соединений необходимо стремиться к тому, чтобы патогенез моделируемых состояний был максимально близок к таковым у человека.

Для получения количественной характеристики специфической активности препарата обязательным условием является проведение исследований на достаточно большом количестве животных.

Для исследований кардиотонического действия веществ применяют здоровых половозрелых животных, прошедших карантин не менее 10–14 дней. Необходимо указать

питомник, из которого получены животные. Не контролируемые питомниками пользоваться не следует. У животных разных видов активность фармакологических веществ может сильно отличаться, поэтому необходимо проводить исследования на нескольких видах животных, причем наряду с грызунами (мыши и крысы) обязательно использовать не грызунов (кошек, кроликов, собак). Исследования можно проводить как на нелинейных, так и на линейных животных. В последнем случае следует указать линию животных, поскольку чувствительность к фармакологическому веществу может меняться и внутри вида в зависимости от линии. Группы животных должны формироваться по возрасту, полу и массе. Эксперименты можно проводить на животных обоего пола с учетом полученных данных отдельно для самок и самцов. Следует указать возраст и пол животных, т.к. в зависимости от этого могут измениться фармакокинетика и активность фармакологического вещества. Разброс по исходной массе тела не должен превышать $\pm 10\%$.

8. Критерии выбора препарата сравнения

Выбор препарата сравнения проводится в связи с задачами эксперимента. Эталонном может быть:

- препарат данного ряда (аналог исследуемого вещества по химической структуре), если он успешно применяется в клинике как кардиотоническое средство;
- препарат, сходный по механизму действия;
- наиболее эффективный по изучаемому (однаправленному) профилю среди ЛП, применяемых в практике.

Одним из основных и принципиальных условий правомерности количественного сопоставления активности двух препаратов является параллелизм линий, выражающих зависимость между дозой введенного вещества и полученным эффектом («линии регрессии»).

9. Описание эксперимента и особенностей его проведения.

Методические приемы, используемые для скрининга и доклинического изучения кардиотонической активности соединений

9.1. Метод оценки параметров изометрического сокращения изолированных препаратов сердца животных (изолированные предсердия, папиллярные мышцы, трабекулы)

Эксперименты проводятся на изолированных органах. Для получения препарата животных наркотизируют (эфир, фторотан, рауш-наркоз, уретан 400 мг/кг, хлоралоза, этаминал-натрия 30 мг/кг и др.), производят торакотомию, перкардотомию, извлекают сердце и помещают его в ванночку с оксигенируемым питательным раствором, охлажденным до 20 °С. Для скрининга веществ с кардиотоническим действием среди соединений стероидной структуры лучше использовать препараты, полученные из сердца морской свинки, для веществ нестероидной структуры — изолированные препараты (папиллярные мышцы, трабекулы, полоски желудочков и левого предсердия), сердец млекопитающих двух биологических видов (крысы, морские свинки, кролики, кошки) и изолированное сердце. Не используются препараты из правого предсердия, они обладают собственной ритмической активностью. Папиллярные мышцы у морских свинок выделяют из правого, у крыс — из левого, у кроликов и кошек — из обоих желудочков. Выделение и фиксация препарата должны осуществляться в течение 3–4 мин.

Затем препараты сердечной мышцы помещают в термостатируемую перфузионную камеру. Перфузию препаратов миокарда крыс осуществляют раствором Кребса при температуре $+28-30 \pm 0,5$ °С, для препаратов сердца морских свинок используют раствор Тироде с температурой $+30-34$ °С. Скорость перфузии — 5 мл/мин. Раствор оксигенируют газовой смесью, содержащей 95% O₂ и 5% CO₂. Препарат одним концом крепится к неподвижному крючку, а другим жестко фиксируется к рычагу механоэлектрического пре-

образователя силы — механотрона. Силу ($F_{\text{макс}}$) и напряжение покоя (T_0), развиваемые каждым препаратом и измеренные при помощи механотронов после усиления и дифференцирования записывают на регистрирующем приборе со скоростью не менее 100 мм/с. Препараты стимулируют прямоугольными импульсами длительностью 3–5 мс и амплитудой на 10–20% выше пороговой. Препарат «отмывают» 30–40 мин [5]. «Эталонными» веществами являются: изопротеренол (изадрин) — [1×10^{-8} М]; строфантин-Г — [1×10^{-7} М], дофамин [1×10^{-5} М]. Соединения, не реагирующие на «эталонные» препараты, в дальнейших исследованиях не используются. Изучаемое соединение добавляют в перфузионный раствор в концентрации 10^{-8} М. Если в течение 10 мин оно не оказывает влияния на сократительные свойства изолированного препарата, добавляют раствор с концентрацией соединения на порядок выше (от 10^{-7} до 10^{-4} М), каждый раз наблюдение длится 10 мин.

Активность исследуемых соединений оценивают при сопоставлении $ЭК_{20}$ и $ЭК_{50}$ (концентрация, увеличивающая $F_{\text{макс}}$ на 20 и 50%, соответственно) с таковыми «эталонных» препаратов. Статистическую обработку результатов проводят на основании данных не менее 8 экспериментов общепринятыми методами.

9.1.1. Определение избирательности инотропного действия соединений

Оценку влияния веществ на частоту сердечных сокращений проводят на спонтанно сокращающемся изолированном правом предсердии по вышеописанной методике. Отношение $ЭК_{50\text{инотр}}/ЭК_{50\text{хрон}}$ ($ЭК_{50\text{инотр}}$ — концентрация вещества, вызывающая увеличение $F_{\text{макс}}$ на 50%, а $ЭК_{50\text{хрон}}$ — концентрация вещества, вызывающая увеличение на 50% частоты сокращений изолированного правого предсердия). У соединения, обладающего селективностью, отношение $ЭК_{50\text{инотр}}/ЭК_{50\text{хрон}}$ должно быть менее 1.

9.1.2. Изучение кардиотонической активности соединений на препарате изолированного сердца

Эксперименты проводят на изолированном по Лангендорфу сердце, перфузируемом в условиях постоянного давления и сокращающемся в спонтанном режиме. Сердце перфузируется раствором Креба-Хенселейта, pH 7,3–7,4, насыщенным карбогеном при $t=37^\circ\text{C}$.

Наркотизированным (этаминал-натрия 30 мг/кг с гепарином 5000 ЕД/кг) животным производят торакаотомию и перикардотомию, отсекают сердце от удерживающих его сосудов и быстро помещают в сосуд с 0,9-процентным раствором NaCl, стоящий на льду. Вся процедура должна занимать не более 30 с (полная остановка сердца происходит через 30–40 с от момента вскрытия грудной клетки). Канюлируют через аорту сердце и легочную артерию и перфузируют с давлением на клапан аорты 18–20 см вод. ст. После стабилизации параметров сердца (через 20–30 мин) начинают регистрацию исследуемых параметров. Модель позволяет регистрировать частоту и силу сокращений сердца, параметры сократимости миокарда, коронарный кровоток, скорость потребления миокардом кислорода, измерять в перфузате концентрации кислорода, лактата, пирувата и др.

На этой и предыдущей моделях, используя агонисты и антагонисты различных типов рецепторов, блокаторы метаболизма и т. д., можно выявить некоторые механизмы кардиотропного действия изучаемых соединений.

По $ЭК_{20}$ и $ЭК_{50}$ (концентрация, увеличивающая $F_{\text{макс}}$ на 20 и 50%) судят об эффективности исследуемого вещества.

9.1.3. Модель сердечной недостаточности на изолированных органах

Исследование кардиотонического действия веществ на изолированных органах позволяет выявить интракардиальные механизмы реализации эффекта в отсутствие нейрогуморальных влияний.

9.1.4. Модель сердечной недостаточности

изолированных препаратов сердца, вызванная дефицитом кислорода

Моделирование сердечной недостаточности осуществляется при помощи аэрация изолированных органов газовой смесью, содержащей 5% O₂, 5% CO₂ и 90% N₂ или 95% N₂ и 5% CO₂, что вызывает снижение параметров сократимости на 30–90% от исходного уровня в течение первых 10 мин. Сравнивая динамику и выраженность снижения параметров сократимости при введении в перфузат исследуемого вещества, можно судить о положительных свойствах соединения.

9.1.5. Определение острой токсичности исследуемых соединений

Острую токсичность веществ (ЛД₅₀) определяют методом Личфилда и Уилкоксона (Беленький М.Л., 1968).

9.2. Методы изучения влияния веществ на параметры кардио- и гемодинамики животных

Минутный объем крови (МОК) является важнейшим показателем производительности сердца и лимитируется состоянием сократительного аппарата миокарда, степенью диастолического наполнения желудочка (преднагрузка), сопротивлением выбросу крови в аорте и легочной артерии (постнагрузка) и частотой сокращения сердца. Поэтому изменения МОК анализируют совместно с показателями сократительной активности миокарда.

9.2.1. Метод оценки сократительной активности миокарда

путем катетеризации его полостей и записи внутрижелудочкового давления

Наркотизированным (этаминал натрия, 30 мг/кг) животных (собаки, кошки, кролики, крысы) через бедренную, сонную артерию и яремную вену в полости сердца вводят катетеры. Измеряют величину развиваемого давления в полостях сердца и его скорость, а также скорость укорочения и расслабления миокарда. Рассчитывают индексы сократимости [17, 25, 28]. По ЭКГ определяют ЧСС и другие показатели.

9.2.2. Изучение сократительной функции миокарда

на основе анализа кривой фазового кровотока в восходящей части дуги аорты

Эксперименты проводятся на анестезированных животных (наркоз — этаминал натрия 30 мг/кг, внутривенно) (крысы, кошки, кролики, собаки и др.). После интубации трахеи и перевода животных на ИВЛ им производится торакотомия и перикардотомия, на восходящую часть дуги аорты помещают датчик электромагнитного или ультразвукового расходомера. Для измерения АД катетеризуют левую бедренную или сонную артерию, для введения препаратов — наружную яремную или правую бедренную вены. Для прямой оценки сократительных свойств миокарда в полость левого желудочка через верхушку сердца или путем катетеризации аорты можно ввести катетер для регистрации левожелудочкового давления и его производных [dP/dt и (dP/dt)/P]. На основании анализа кривой фазового кровотока в восходящей части дуги аорты [26] определяют время систолического выброса, время диастолического расслабления, ударный объем сердца (мл), минутный объем сердца (л/мин), максимальную линейную скорость кровотока в аорте (см/сек), максимальное ускорение кровотока в аорте (см/с²), характеризующее сократимость миокарда, индекс энергетических затрат, работу сердца и ОПСС. Частоту сердечных сокращений (уд/мин) рассчитывают, определяя время между двумя сердечными циклами. Для дальнейшего изучения отбираются вещества, влияющие на увеличение параметров сокращения и расслабления миокарда, МОК, УОК, снижающие ОПСС, не влияющие на электрофизиологические показатели сердца.

9.2.3. Модель острой левожелудочковой недостаточности у собак

Эксперименты проводятся на наркотизированных (нембутал 40 мг/кг внутривенно) собаках. После интубации трахеи и перевода животных на ИВЛ производится торакотомия затем перикардотомия, выделяются участкигибающей и нисходящей ветви левой коронарной артерии. Под сосуды подводят лигатуры и последовательно перевязывают коронарные артерии, начиная с дистальных участков. Недостаток модели — частые фибрилляции желудочков сердца и высокий риск гибели животных.

9.3. Модели хронической сердечной недостаточности

9.3.1. Дозированный надклапанный стеноз аорты

Эксперименты проводятся на наркотизированных кроликах в условиях искусственной вентиляции легких. Животным производится торакотомия, надклапанный стеноз аорты воспроизводится затягиванием шелковой лигатуры на шаблоне диаметром 2,4 мм, что соответствует уменьшению наружного диаметра аорты в 2,5 раза. Клинические признаки и регуляторные нарушения, характерные для сердечной недостаточности, возникают через 1,5 месяца после операции. Недостатком модели является высокий процент гибели животных [8].

9.3.2. Модель изадриновой интоксикации у крыс

Эксперименты проводят на крысах массой 200–250 г. Животным контрольной группы животных подкожно вводят изадрин (новодрин) в дозе 80 мг/кг дважды с интервалом 24 ч. Введение больших доз изадрина вызывает повреждение β -адренорецепторов сердца и развитие некротических изменений в миокарде, что приводит к снижению физической работоспособности (плавательная проба, бег в тредбане), уменьшению устойчивости к гипоксии, увеличению ЧСС. Животным групп, получающим ЛС, наряду с изадрином вводится исследуемое вещество. С 5–7-го дня после введения 2-й дозы изадрина проводится исследование толерантности к физической нагрузке, функциональных возможностей миокарда [9].

9.3.3. Экспериментальный инфаркт миокарда у крыс, мышей

Эксперименты проводятся на наркотизированных животных (крысы, мыши). После интубации трахеи и перевода животных на ИВЛ производится торакотомия и перикардотомия. Осуществляется перевязка нисходящей ветви левой коронарной артерии на границе верхней и средней трети. Затем осуществляется послойное ушивание раны, перед наложением заключительных швов воздух из грудной клетки удаляется с помощью резиновой трубки. Сердечная недостаточность развивается на 21 сутки (до 4–6 недель) [22, 24].

9.3.4. Метод определения функциональных резервов сердца с помощью нагрузочных тестов

Изучение влияния вещества на функциональные резервы сердца осуществляется на крысах и кошках с использованием нагрузочных проб: нагрузки объемом — быстрое, в течение 2 с, внутривенное введение животным физиологического раствора из расчета 0,3 мл/на 100 г массы; дозированной стимуляции адренорецепторов сердца — введение адреналина 0,1 мл (в разведении 10^{-7} г/мл) на 100 г массы животного, максимальной изометрической нагрузки — пережатие восходящей части дуги аорты на 30 с. Регистрация ЛЖД и его первой производной ($dp/dt+$ и $dp/dt-$) осуществляется электроманометром на механотронных датчиках с малым объемом смещения (0,05 мл на 250 мм рт.ст.). Перед проведением нагрузочных проб проводится следующая оперативная подготовка: после перевода животных на искусственную вентиляцию легких в четвертом межреберье осуществляются торакотомия, затем перикардотомия. Для измерения артериального давле-

ния катетеризируется левая общая сонная артерия. В полость левого желудочка через верхушку сердца вводится катетер для измерения левожелудочкового давления. Регистрируются следующие показатели кардио- и гемодинамики: максимальное левожелудочковое давление, скорость сокращения и расслабления миокарда ($dp/dt+$ и $dp/dt-$), частота сердечных сокращений. ИФС (интенсивность функционирования структур) и МИФС (максимальная интенсивность функционирования структур) определяются расчетным способом ((ЛЖД ср.х ЧССср)/масса левого желудочка +1/3 межжелудочковой перегородки) [14, 19].

Введение исследуемых веществ, физиологического раствора и адреналина осуществляется через катетер, имплантированный глубоко в правую наружную яремную вену. После периода стабилизации (10 мин) и записи исходных показателей животным последовательно проводятся нагрузочные пробы. После проведения экспериментов показатели кардиодинамики животных получающих ЛС и контрольной группы сопоставляются между собой. Если функциональные возможности сердца животных, получавших исследуемое вещество, оказываются выше, чем у животных контрольной группы, делается заключение о его позитивном воздействии на функциональные резервы сердца.

9.3.5. Изучение влияния соединений на метаболизм миокарда

- изучение влияния соединения на потребление сердцем O_2 [10];
- определение содержания макроэргов (адениловых нуклеотидов, КФ) [1, 2] для выявления действия веществ на процессы синтеза или катаболизма макроэргов в кардиомиоцитах;
- определение активности креатинфосфокиназы характеризует скорость переноса энергии от мест образования к местам утилизации [6];
- изучение влияния соединения на утилизацию глюкозы (глюкозооксидазный метод) и содержание гликогена и жирных кислот в гомогенате сердечной мышцы по методам [23] позволяет судить об интенсивности использования и образования основных энергетических субстратов в миокарде;
- определение содержания пирувата и лактата в миокарде и крови, их соотношения, а также активность лактатдегидрогеназы позволяет судить о влиянии изучаемых соединений на интенсивность реакций аэробного и анаэробного окисления [13, 20];
- определение содержания субстратов и активности отдельных ферментов гликолиза и цикла трикарбоновых кислот;
- определение содержания никотинамидных коферментов [7, 15];
- определение интенсивности окислительного фосфорилирования в митохондриях;
- влияние на активность K^+ -, Na^+ -АТФазы;
- влияние на активность аденилатциклазы и фосфодиэстеразы, функцию медленных кальциевых каналов, а также рецепторный аппарат сердца;
- влияние на концентрацию ионов натрия, калия, кальция, магния и др.;
- антиоксидантное действие [3,11,16];
- влияния на агрегантные свойства крови и систему гемостаза (см. методики в соответствующих разделах данного руководства).

Заключение

Выбор тех или иных методов диктуется конкретной задачей, стоящей перед исследователем. При этом изучаемые соединения, как минимум, не должны обладать аритмогенными, гипертензивными и агрегатными свойствами и не должны повышать потребность миокарда в кислороде.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необхо-

димо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Алейникова Т.А., Рубцова Г.В. Руководство к практическим занятиям по биологической химии. — М., 1988. — С. 115–117.
2. Алексеева А.М. Биохимия. — 1951. — Т. 16. — №2. — С. 97–103.
3. Андреева Л.И., Коженикин Л.А., Кишкун А.А. Лаб. дело. — 1988. — № 11. — С. 41–43
4. Беленький М.Л. В кн: Элементы количественной оценки фармакологического эффекта.— Л., 1968.— 151 с.
5. Блаттнер Р., Классен Х., Денерг Х. Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц: Пер с англ. М.: Мир, 1983. — 208 с.
6. Дмитриенко Н.П. Биохимия, 1971. — № 6. — С. 1161–1167.
7. Диксон М., Узбб Э. Ферменты, пер. с англ., М., 1982. — Т. 1–3.
8. Дугин С.Ф., Городецкая Е.А. Кардиология.— 1984.— Т. 24. — № 7. — С. 102–104.
9. Ковалев Г.В., Петров В.И., Гурбанов К.Г. и др. В кн.: Фармакология кардиотонических средств. — А.: АМН СССР, 1988. — С. 106–110.
10. Корнеев А.А. Исследование некоторых кислородзависимых процессов на изолированном сокращающемся сердце при гипоксии: Дисс. ... канд. биол. наук. — М., 1985. — 176 с.
11. Костюк В.А., Потапович А.И., Ковалева Ж.В. // Вопр. мед. химии. — 1990. — №2. — С. 88–91
12. Лопухин Ю.М. Экспериментальная хирургия.— 1971.— 346 с.
13. Маевский Е.И., Гришина Е.В., Розенфельд А.С. и др. // Российский биомедицинский журнал — 2000. — Т. 1. — № 3.— С. 32–36.
14. Меерсон Ф. З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. — М.: Медицина, 1984. — 269 с.
15. Мешкова Н. П., С. Е. Северин. Практикум по биохимии. — М., 1979.
16. Моин В.М. Лаб. дело. — 1986. — №12. — С. 12–16.
17. Мойбенко А.А., Орлова Н. Н. // Физиологический журнал. — Киев, 1978. — Т. 24, № 6. — С. 839–848.
18. Прозоровский В.Б. и др. // Фармакология и токсикология. — 1978. — Т. 41. — № 4. — С. 497–502.
19. Тюренков И.Н., Гурбанов К.Г. В кн.: Достижения современной экспериментальной фармакологии сердечно-сосудистой системы. — 1981. — С. 50–66.
20. Muller-Hocker J., Seibel P., Schneiderbanger K. et.al. Hum-Pathol. — 1992. — Vol. 23. — №12. — P.1431-1437.
21. Neely J. R., Liebermeister H., Battersby E.J., Morgan H.E. // Am. J. Physiol. — 1967. — Vol. 212, №4. — P. 804–814.
22. Pfeffer M.A., Pfeffer J.M., Fishbein M.C. et al. // Circ.Res.— 1979.— Vol.44. — P.503–512.
23. Seifter S. // Arch. Biochem. — 1950. — Vol. 25. — P. 191–200.
24. Selye H., Bajusz S., Grasso S. et al. // Angiology.—1960.— Vol.11.—P.398–407.
25. Siegal J.H., Sonnenblick E.H. // Circlat. Res. — 1963. — Vol. 12. — P. 597–610.
26. Spencer M.F., Greis P.S. 11 // Circulat. Res. — 1962. — Vol. 10. — P. 274–279.
27. Taegmeyer H.Hems R., Krebs H.A. // Biochem. J. — 1980. — Vol. 186, № 3. — P. 701–711.
28. Veragut U.P., Krayenbuehl H.P. // Cardiol. — 1965. — Vol. 47, № I. — P. 96–112.

ГЛАВА 23

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ АНТИАРИТМИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: член-корр. РАМН, проф. П.А. Галенко-Ярошевский;
д. м. н., проф. Н.В. Каверина; д. м. н., проф. А.Г. Камкин; к. б. н. А.И. Турилова;
к. м. н. С.К. Богус; д. м. н., проф. Ю.Р. Шейх-заде*

Введение

Антиаритмические препараты — ЛС, проявляющие специфическую способность подавлять аномальный автоматизм, проводимость и возбудимость миокарда. Несмотря на наличие большого количества антиаритмических препаратов, поиск новых высокоэффективных и безопасных антиаритмических ЛС является одной из наиболее актуальных задач современной фармакологии. Это обусловлено тем, что используемые в медицинской практике антиаритмические ЛС обладают серьезными побочными эффектами и, в частности, проаритмическим действием. Современная классификация антиаритмических ЛС была предложена Е.М. Vaughan Williams в 1969 году и в последующем модифицирована D.C. Harrison в 1979 году, а затем и другими исследователями. Она включает в себя пять классов: 1 класс — блокаторы натриевых каналов; 2 класс — β -адреноблокаторы; 3 класс — блокаторы калиевых каналов; 4 класс — блокаторы кальциевых каналов; 5 класс — специфические брадикардические средства, отрицательное хронотропное действие которых обусловлено их способностью блокировать f-каналы, встроенные в клеточную мембрану пейсмекерных клеток синусно-предсердного узла.

Поиск и доклиническое изучение потенциальных антиаритмических ЛС можно условно разделить на несколько этапов:

I этап — скрининг (первичный отбор и первичная оценка возможных механизмов действия соединений с потенциальной антиаритмической активностью).

На этом этапе поиска оценивают антиаритмическую активность соединений на моделях аритмий, вызванных химическими соединениями. Помимо этого, в рамках этих исследований на основании LD_{50} и ED_{50} определяют антиаритмический индекс (терапевтическую широту) изучаемых соединений. Как правило, скрининг проводят на нескольких моделях нарушений ритма сердца. Антиаритмический индекс изучаемых соединений сравнивают с аналогичными показателями известных антиаритмических ЛС.

По завершении I этапа исследований необходимо провести систематизированную оценку полученных результатов, отобрать наиболее перспективные соединения, после чего определить диапазон доз и схему изучения отобранного соединения на II-м этапе изучения.

II этап — изучение активности отобранных соединений на различных моделях нарушений сердечного ритма.

На этом этапе все исследования проводят на моделях:

- воспроизводящих наджелудочковые нарушения сердечного ритма;
- воспроизводящих желудочковые нарушения сердечного ритма;
- воспроизводящих реперфузионные нарушения сердечного ритма;
- воспроизводящих фибрилляцию различных отделов сердца.

Изучение эффективности изучаемых соединений проводится в сравнении с референтными антиаритмическими ЛС.

Поскольку антиаритмические ЛС часто используются у пациентов, страдающих коронарной болезнью сердца, в том числе острым коронарным синдромом, в завершение II этапа исследований необходимо оценить антиишемическую активность отобранных соединений.

По завершении исследований II этапа оценивают спектр антиаритмической активности отобранных соединений, определяют их эффективную дозу, оптимальные пути введения, разрабатывают принципиальную схему их применения в клинике. При проведении исследований II этапа обязательным является использование того способа введения соединений, который предполагается использовать при его клиническом изучении.

III этап – изучение электрофизиологических механизмов отобранных соединений в экспериментах *in vivo* и *in vitro* и особенностей их рецепторного действия.

1. Скрининг и первичная оценка возможных механизмов действия изучаемых соединений

Первый этап исследования начинают с определения LD_{50} изучаемого соединения. LD_{50} (при внутривенном введении) определяют на нелинейных крысах по общепринятой методике.

1.1. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений при нарушениях сердечного ритма периферического генеза

1.1.1. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений на аконитиновой модели нарушений сердечного ритма

Исследования проводят на нелинейных крысах-самцах массой 160–180 г.

Перед началом эксперимента у животных регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение). Затем подбирают дозу аконитина, которая во всех экспериментах вызывает смешанную предсердно-желудочковую экстрасистолию. Аконитин вводят в хвостовую вену в дозе 40–50 мкг/кг. Нарушения ритма сердца, как правило, начинают формироваться с первой-второй минуты после окончания введения аконитина. Регистрацию ЭКГ проводят через 3, 5, 10, 15 и 20 мин после введения аконитина. Изучаемое соединение вводят профилактически за 1–2 мин до введения аконитина. Эксперимент проводят по схеме контрольных исследований. Активность изучаемого соединения оценивают по его способности предотвращать нарушения ритма сердца, вызываемые аконитином.

Поскольку доза аконитина, вызывающая выраженные нарушения сердечного ритма, не стабильна и может у одной и той же группы животных варьировать в течение недели, контрольную серию и серию экспериментов по оценке эффективности одной дозы изучаемого соединения следует проводить в течение одного дня. По окончании экспериментов рассчитывают среднеэффективную дозу изучаемого соединения – $ЭД_{50}$, т. е. дозу, которая у 50% животных предотвращает развитие нарушений ритма сердца. Обработку данных проводят по методу Литчфилда и Уилкоксона. Помимо этого, рассчитывают антиаритмический индекс (терапевтическую широту), т. е. отношение LD_{50} к $ЭД_{50}$.

В основе аритмогенного действия аконитина лежит его способность нарушать функциональную активность быстрых трансмембранных потенциалзависимых натриевых каналов, поэтому эту модель рассматривают для оценки эффективности антиаритмиков I класса по классификации Е.М. Vaughan Williams. Имеются также данные о том, что определенный вклад в аритмогенное действие аконитина вносит его способность нарушать функциональную активность трансмембранных потенциалзависимых Ca^{++} каналов L-типа. Поэтому в качестве референтных препаратов на этой модели аритмий используют антиаритмики I A класса (хинидин, новокаинамид), I B класса (лидокаин и др.) и антиаритмики I C класса (этmozин, этацизин и др.).

1.1.2. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений на хлоридкальциевой модели нарушений сердечного ритма

Высокие дозы кальция хлорида (250–300 мг/кг) вызывают у бодрствующих и наркотизированных нелинейных крыс-самцов (массой 200–250 г) тяжелые нарушения сердечного ритма, заканчивающиеся летальной фибрилляцией желудочков.

Перед началом эксперимента у животных регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение). Затем подбирают дозу кальция хлорида, которая во всех экспериментах вызывает фибрилляцию желудочков сердца. кальция хлорид вводят внутривенно в виде 10% раствора. Нарушения ритма сердца, как правило, начинают формироваться с 1-й мин после окончания внутривенного введения кальция хлорида. Регистрацию ЭКГ проводят через 5, 10, 15 и 20 мин после введения кальция хлорида. Изучаемое соединение вводят внутривенно за 1–2 мин до введения кальция хлорида. Эксперименты с изучаемым соединением сопоставляют с контрольными исследованиями.

По окончании экспериментов рассчитывают среднюю эффективную дозу изучаемого соединения и антиаритмический индекс.

Аритмогенная активность кальция хлорида связана с его способностью существенно повышать содержание ионов Ca^{++} в кардиомиоцитах и тем самым вызывать их асинхронное возбуждение, а также в определенной мере нарушать процессы реактивации натриевых каналов, поэтому эту модель используют для оценки эффективности антиаритмиков IV, а также I класса по классификации E.M. Vaughan Williams. В качестве референтных препаратов на этой модели аритмий используют антиаритмики IV класса (верапамил и др.) и антиаритмики I В класса (лидокаин и др.).

1.1.3. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений на адреналиновой модели нарушений сердечного ритма

1.1.3.1. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений в исследованиях на кошках

Эфирно-адреналиновую модель аритмии воспроизводят на кошках массой 2,5–3,5 кг. Животных наркотизируют внутрибрюшинным введением этаминал-натрия (нембутала) в дозе 40–50 мг/кг. Катетеризируют яремную вену для введения исследуемых веществ и сонную артерию для регистрации артериального давления. ЭКГ регистрируют во II стандартном отведении. Исследуемое соединение вводят в 3 мл дистиллированной воды. После повторной записи ЭКГ адреналина гидрохлорид вводится внутривенно в дозе 20 мкг/кг одновременно с эфиром, который инстиллируется в трахею из расчета 0,1 мл/кг через катетер, введенный при помощи ларингоскопа. Последующие записи ЭКГ проводятся через 1, 3, 5, 10, 15, 30 и 50 мин. Антиаритмическую эффективность изучаемых соединений оценивают по их способности предупреждать гибель животных от фибрилляции желудочков. Учитывают процент выживших животных, а также отношение числа погибших животных к общему количеству.

1.1.3.2. Исследование эффективности изучаемых соединений в исследованиях на бодрствующих кроликах

В связи с тем, что одновременное использование двух и более аритмогенных факторов затрудняет интерпретацию полученных данных, рекомендуется использовать модель нарушений ритма сердца, вызванных адреналина гидрохлоридом у бодрствующих кроликов. Кроликов массой 2,5–3,5 кг фиксируют в специальном станке и регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение). Затем в краевую вену уха вводят раствор 0,1% адреналина в дозах 120–150 мкг/кг. В течение 6–7 мин после внутривенного введения адреналина развивается политопная желудочковая экстрасистолия, однако в ряде случаев при использовании адреналина в дозе 150 мкг/кг развивается рефлекторная брадикардия и/или атриовентрикулярная блокада, которая через 2–3 мин

меняется желудочковой экстрасистолией или желудочковой тахикардией. Через 30 мин после прекращения нарушений ритма сердца, внутривенно вводят изучаемое соединение в 1 мл растворителя, а затем через 2 мин аритмогенную дозу адреналина.

ЭКГ регистрируют через 1, 3, 5, 10, 15 и 20 мин после введения адреналина. Эффективность изучаемого соединения оценивают по его способности предотвращать желудочковые нарушения ритма сердца.

По окончании экспериментов рассчитывают среднеэффективную дозу изучаемого соединения и антиаритмический индекс.

1.1.3.3. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений в исследованиях на крысах и мышах

У наркотизированных животных (уретан 1,0–1,3 г/кг внутривенно) регистрируют ЭКГ во II стандартном отведении. Затем в вену хвоста вводят раствор адреналина гидрохлорида из расчета 100 мкг/кг. Мышам параллельно вводят в трахею 0,1 мл галотана. Через 1–2 мин развивается политопная желудочковая экстрасистолия, в большинстве случаев переходящая в фибрилляцию желудочков сердца. В тех случаях, когда при использовании данной дозы адреналина не удается достичь стойких нарушений сердечного ритма, дозу адреналина увеличивают до 100–110–120 и более мкг/кг. ЭКГ регистрируют через 1, 3, 5, 10, 15 и 20 мин после введения адреналина. Изучаемое соединение, приготовленное на физиологическом растворе, вводят за 1–2 мин до внутривенного введения и за 5–7 мин до внутривенного введения адреналина (крысам — в 0,3–0,5 мл растворителя, мышам — в 0,1–0,2 мл растворителя). Эффективность изучаемого соединения оценивают по его способности предотвращать желудочковые нарушения ритма сердца и/или гибель животных от фибрилляции.

Поскольку адреналиновая модель нарушений сердечного ритма у мелких животных, так же как и аконитиновая модель, достаточно сложно поддается интерпретации, эксперименты по изучению одной дозы изучаемого соединения следует проводить в течение одного дня. Адреналиновая модель нарушений ритма сердца воспроизводит аритмогенный эффект, вызванный повышением активности симпатической иннервации и содержания катехоламинов, в основе которых лежит опосредованная возбуждением β -адренорецепторов активация медленных трансмембранных кальциевых каналов L-типа, провоцирующая развитие эктопической активности водителей ритма 1-го, 2-го и 3-го порядка. Поэтому в качестве референтных препаратов на этой модели используют антиаритмики II класса (пропранолол, метопролол и др.) и IV класса (верапамил) по классификации E.M. Vaughan Williams.

1.1.4. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений на хлоридбариевой модели нарушений сердечного ритма

Известно, что бария хлорид способен угнетать калиевую проводимость. В соответствии с этим, модель аритмии с использованием бария хлорида является адекватной для выявления веществ со свойствами III класса антиаритмического действия. Исследования проводят на бодрствующих кроликах массой 2,0–3,0 кг, в ушную вену которых вводят 2% раствор бария хлорида (3–4 мг/кг) и регистрируют ЭКГ путем наложения электродов на конечности. Для дальнейшего исследования отбирают только тех животных, у которых в течение каждой мин возникает не менее 1 экстрасистолы на протяжении 15 мин исследования. Через 5–7 дней животных снова берут в эксперимент и вводят ту же дозу бария хлорида, затем через 2 мин не более чем в 1 мл растворителя вводят изучаемое соединение. ЭКГ регистрируют во II стандартном отведении в течение 15 с со скоростью 50 мм/с. Определяют фон, после введения бария хлорида и через каждую минуту после инъекции изучаемого соединения. Вслед за введением бария хлорида в дозе 3–4 мг/кг обычно развивается многофокальная аритмия, поэтому подбирают дозу исследуемого вещества, в которой оно уменьшает или полностью устраняет аритмию в течение 15 мин. Эффект изучаемого соединения вычисляют в процентах для каждой дозы.

Поскольку в основе нарушений ритма сердца, вызванных бария хлоридом, лежит блокада трансмембранных потенциалзависимых калиевых каналов, в качестве референтных препаратов используют антиаритмики III класса (амиодарон, дофетилид, соталол и др.).

1.1.5. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений на строфантиновой (оуабаиновой) модели нарушений сердечного ритма

Строфантиную аритмию вызывают у наркотизированных уретаном (1,0–1,3 г/кг) морских свинок (самцы массой 300–400 г). Контрольным животным в яремную вену вводят раствор строфантина *K* в дозе 0,5 мг/кг. Через 1–2 мин развивается брадикардия и/или атриовентрикулярная блокада, сменяющаяся политопной желудочковой тахикардией, которая через 15–20 мин переходит в фибрилляцию желудочков сердца. Изучаемое соединение вводят внутривенно в 0,3–0,5 мл растворителя за 3–5 мин до введения строфантина *K*. ЭКГ регистрируют во II стандартном отведении каждые 2–5 мин после введения строфантина в течение 30 мин и более.

Аритмию можно вызывать также оуабаином (строфантином *G*). Оуабаин вводят наркотизированным эфиром морским свинкам в дозе 250 мг/кг. Изучаемое соединение вводят внутривенно за 2–3 мин до введения оуабаина. Эффективность соединений определяют по их способности предупреждать гибель морских свинок в процентах по отношению к гибели животных в контроле.

В качестве референтных препаратов на этой модели, как правило, используют антиаритмики IA и IB класса. Для окончательного суждения о принадлежности нового соединения к определенному классу необходимо провести электрофизиологическое исследование.

По завершении I этапа исследования необходимо осуществить системный анализ полученных данных, оценить потенциальное сродство изучаемых соединений к тому или иному виду трансмембранных ионных каналов, отобрать наиболее эффективное (эффективные) из изучаемых соединений, определить дозы и схему проведения экспериментов, которые будут использованы на II этапе исследования.

2. Исследование активности и спектра антиаритмического действия соединений в модельных экспериментах

2.1. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений при нарушениях сердечного ритма периферического генеза

2.1.1. Исследование активности изучаемых соединений на наджелудочковых моделях нарушений сердечного ритма

*2.1.1.1. Исследование влияния изучаемых соединений на максимально воспроизводимую частоту предсердий в экспериментах *in vitro* [17]*

Выделенное правое ушко предсердия кролика или морской свинки сразу же после экстирпации помещается в термостатируемую камеру с постоянно оксигенируемым раствором Рингера-Локка. Температура раствора 29–31 °С. Препарат подвешивают на специальном фиксирующем кронштейне. К ушку сердца подводят платиновые электроды для электрической стимуляции и регистрации частоты его сокращений. После 30-минутной адаптации ушка его начинают стимулировать прямоугольными электрическими импульсами электрического тока длительностью 3–5 мс с постоянно нарастающей частотой. Параллельно с этим регистрируют частоту его сокращений. Частоту раздражения повышают до тех пор, пока не происходит «выпадение» очередного сокращения, т. е. до того момента, когда ушко перестает усваивать заданный ритм. Этот цикл возбуждения условно принимается за величину эффективного рефрактерного периода — ЭРП. Затем

ушку дают «отдохнуть» в течение 10–15 мин и в раствор вводят изучаемое соединение. Определяют количество изучаемого соединения, которое на 15% уменьшает максимальную воспроизводимую частоту — ЭД₁₅.

2.1.1.2. Исследование активности изучаемых соединений на модели трепетания предсердий [36]

Эксперименты проводятся на беспородных собаках обоего пола массой 10–15 кг. Собак наркотизируют (пентобарбитал натрия 40 мг/кг внутривенно или 50 мг/кг внутриплеврально) до IIIа уровня хирургического наркоза, после чего интубируют и переводят на искусственное дыхание кислородно-воздушной смесью в соотношении 1:1 (возможна вентиляция комнатным воздухом). Животных фиксируют на операционном столе в положении на левом боку. После торако- (по 3–4-му межреберью) и перикардотомии находят и выделяют сино-атриальный узел, располагающийся в месте соединения верхней полой вены и свободной стенки правого предсердия (сино-атриальный узел располагается под эпикардом в жировой ткани и имеет продолговатую форму; размер около 3–5 мм). Выделенный сино-атриальный узел разрушают (лучше путем термокоагулирования). В ткань правого предсердия на расстоянии 0,5 см друг от друга вводят два позолоченных стимулирующих электрода и подшивают два электрода для регистрации электрограммы правого предсердия. Параллельно с этим регистрируют ЭКГ во II стандартном отведении.

После регистрации фоновой электрограммы правого предсердия и стандартной ЭКГ начинают постоянную стимуляцию правого предсердия прямоугольными электрическими импульсами длительностью 5 мс и исходной частотой 15–20 Гц. Через 1–10 мин, как правило, развивается трепетание предсердий. Если при этой частоте стимуляции трепетание предсердий не развивается, частоту стимуляции поступательно увеличивают до его развития. Через 30 мин после возникновения трепетания предсердий начинают инфузию изучаемого соединения. Эффективность изучаемого соединения оценивают методом «биологического титрования». Например, при проведении скрининговых экспериментов установлено, что эффективная доза изучаемого соединения составляет 1 мг/кг. В этом случае изучаемое соединение вводят внутривенно с постоянной объемной скоростью в дозе 1 мг/кг/мин до полного прекращения трепетания предсердий. Определяют суммарную дозу, необходимую для купирования трепетания предсердий, и сравнивают ее с таковой для референтных препаратов.

Трепетание предсердий можно вызвать и аппликацией на правое предсердие аконитина хлорида или бария хлорида, однако следует учитывать, что в этом случае валидизация результатов существенно затруднена.

2.1.1.3. Исследование активности изучаемых соединений на модели нейрогенной фибрилляции предсердий

Исследования проводятся на кошках, находящихся под хлоралозо-этаминал-натриевым наркозом (75 и 15 мг/кг соответственно, внутрибрюшинно) при автоматическом поддержании температуры тела на уровне $37 \pm 0,05$ °С (с помощью аквариумного рефлектора мощностью 100–150 Вт, управляемого через ректально вводимый контактный термометр). Для исключения гипоксии, сильно влияющей на автоматию, возбудимость и сократимость миокарда, животное переводится на искусственную вентиляцию легких, для чего желательно использовать клапанное устройство, не обладающее мертво-пространственным эффектом. После этого выделяют, лигируют и перерезают на уровне щитовидного хряща правый блуждающий нерв.

Периферический конец нерва накалывают на биполярные игольчатые электроды (изготавливаемые из инсулиновых инъекционных игл с межполюсным расстоянием 2,5–3 мм) и заливают расплавленной смесью медицинского воска и вазелинового масла, быстро отвердевающей при температуре тела (соотношение компонентов подбирается эмпирически).

Через правую яремную и правую бедренную вену в правое предсердие вводят 2 биполярных зонда с межполюсным расстоянием 1,0–1,5 мм, один из которых предназначен для раздражения миокарда электрическими импульсами, а другой — для регистрации внутрипредсердной ЭКГ, максимальным зубцом которой является зубец Р (2,0–2,5 мВ) (техника изготовления электродов изложена ниже в разделе 2.1.3.1.).

Для раздражения блуждающего нерва и правого предсердия используют 2 электро-стимулятора, способных работать либо в периодическом, либо в залповом режиме, обеспечивающем подачу на нерв или миокард одиночного раздражения из 1–3 импульсов. Для получения такого раздражения электрокардиографический сигнал подается на устройство, выделяющее зубец Р ЭКГ и запускающее от него (с необходимой задержкой) «предсердный» или «вагусный» стимулятор, находящийся в ждущем режиме.

Для получения нейрогенной фибрилляции предсердий предварительно определяют пороговую силу раздражения блуждающего нерва (обычно 0,3–0,4 В), вызывающую 10% удлинение интервала РР ЭКГ при раздражении нерва в периодическом режиме (2 мс, 40 Гц) в течение 5 с.

После этого определяют хронотропный эффект блуждающего нерва, нанося на него одиночный залп из 3-х импульсов (2 мс, 40 Гц, 6 порогов) синхронно с зубцом Р ЭКГ. Выраженность хронотропного эффекта (ХЭ, %) оценивают по формуле: $ХЭ = 100 (T_c - T_n) / T_n$, где T_n – длительность последнего интервала РР перед раздражением нерва, а T_c – длительность следующего за ним интервала РР, совпадающего по времени с нанесением на нерв серии импульсов.

Затем определяют конечно-диастолический порог раздражения миокарда, периодически нанося в конечную фазу цикла РР ЭКГ постепенно нарастающие по амплитуде одиночные электрические импульсы длительностью 5 мс, и так до тех пор, пока не появится первая экстрасистола. Установив диастолический порог раздражения, увеличивают его в 4 раза и определяют абсолютный рефрактерный период предсердия, постепенно укорачивая время задержки тестирующего импульса, и так до тех пор, пока не перестанут возникать экстрасистолические возбуждения предсердий.

После указанной подготовки включают периодическое раздражение блуждающего нерва (2 мс, 40 Гц, 6 порогов) и на фоне наступившей остановки сердца наносят на предсердие одиночную пару импульсов (5 мс, 25 Гц, 4 порога), что приводит к пароксизму нейрогенной фибрилляции предсердий продолжительностью до 3–6 мин (при условии продолжения стимуляции блуждающего нерва). В случае прекращения вагусной стимуляции фибрилляция миокарда немедленно прекращается, но так же легко может быть вызвана вновь через 1–2 мин. Исследование антиаритмического эффекта изучаемого вещества осуществляется следующим образом. Сначала определяют исходную длительность пароксизма нейрогенной фибрилляции предсердий при установленных параметрах функционального состояния блуждающего нерва и сердца (порог раздражения и хронотропный эффект нерва, длительность интервалов РР и РQ ЭКГ, диастолический порог и абсолютный рефрактерный период правого предсердия).

После этого вводят в кровь необходимое количество изучаемого вещества, и через 5, 30, 60, 90, 120 мин повторяют определение всех перечисленных показателей, отмечая наличие или отсутствие кардиотропного и/или нейротропного эффекта.

Для каждой концентрации изучаемого вещества выполняют 5–7 экспериментов с обобщением результатов в виде таблицы.

Об эффективности изучаемого соединения судят по его способности предупреждать развитие нейрогенной фибрилляции предсердий. Эффект изучаемого соединения сравнивают с действием референтных антиаритмических препаратов, обладающих холинолитической активностью (например, антиаритмик IA класса прокаинамид и антиаритмик IC класса этацизин).

Таким образом, преимуществами описываемой методики являются: 1) возможность получения фибрилляции на совершенно здоровых животных без предварительного по-

вреждения миокарда; 2) полностью обратимый характер аритмогенного воздействия на миокард; 3) произвольно осуществляемый механизм получения и прекращения аритмии, что позволяет на одном и том же животном изучать динамику аритмогенного или антиаритмического эффекта при постепенном увеличении дозы изучаемого вещества.

2.1.1.3. Техника изготовления внутрисердечных электродов для мелких лабораторных животных

В ходе фармакологических исследований нередко возникает потребность в раздражении миокарда или регистрации его электрической активности у мелких животных *in situ*, что требует применения соответствующих по размеру внутрисердечных электродов. В связи с этим предлагается простейшая методика изготовления указанных электродов в лабораторных условиях, в частности, для кошек.

К одному из полюсов на выходе лабораторного трансформатора присоединяют лакированный медный провод (длиной 50–70 см и диаметром 0,15–0,2 мм), а к другому полюсу – обычный сетевой провод (длиной около 50 см), свободный конец которого припаян к металлическому колпачку угольного стержня (диаметр 7–8 мм), извлекаемого из круглой бытовой электробатарейки (1,5 В). Затем включают трансформатор, устанавливая выходное напряжение на уровне 10–20 В и на долю секунды прикасаются тонким проводом к свободному торцу угольного стержня. Возникающая при этом электрическая дуга мгновенно оплавляет конец провода в виде шарика диаметром 0,8–1,0 мм. После этого укорачивают оплавленный провод до 45 см и вводят его обрезанным концом в сосудистый катетер длиной 40 см (внутренний диаметр 0,4 мм, наружный диаметр 1,0–1,2 мм). Натянув провод в катетере до упора (то есть до заклинивания шариком отверстия в катетере), опускают кончик катетера с выглядывающим из него металлическим шариком в эфир на глубину 2–3 мм. Через 1–2 мин кончик катетера размягчается, что позволяет втянуть шарик внутрь катетера на 5–7 мм. Подсушивают заготовку до восстановления твердости катетера, после чего под лупой обрезают его бритвой по экватору шарика и несколько раз покрывают конец конструкции лаком для ногтей. Тщательно просушивают изделие, после чего мелкой наждачной шкуркой счищают лак с центральной (то есть выступающей из катетера) части металлического шарика. На противоположный конец катетера плотно натягивают 5–6 см более широкой и более мягкой пластиковой трубочки, пропуская внутри нее выступающий из катетера электродный провод. Последний припаивают к мягкому многожильному проводу (длиной 8–10 см) с внешним диаметром изоляции, равным наружному диаметру катетера, после чего оттягивают мягкую трубочку назад, закрывая место спайки электрода и многожильного провода. К свободному концу многожильного провода припаивается клемма для подключения электрода к электро-стимулятору или электрокардиографу (желательно через удлинитель). Чтобы получить биполярный электрод, изготавливают 2 одинаковых униполярных электрода, которые скрепляются затем вместе 4–5 растягивающимися колечками (шириной 1,5–2,0 мм), нарезанными из вышеописанной мягкой трубочки.

2.1.2. Исследование эффективности изучаемых соединений на моделях желудочковых нарушений ритма сердца

2.1.2.1. Исследование эффективности изучаемых соединений на модели двуступенной перевязки коронарной артерии [24]

Исследования проводятся на бодрствующих беспородных собаках обоего пола массой 10–15 кг. За сутки до эксперимента животных наркотизируют (пентобарбитал натрия 40 мг/кг внутривенно или этаминал-натрия 40 мг/кг внутривенно) до уровня IIIа хирургического наркоза, интубируют и переводят на искусственное дыхание кислородно-воздушной смесью в соотношении 1:1. Животных фиксируют на операционном столе в положении на правом боку, проводят торакотомию по 4-му межреберью, после чего при

помощи ранорасширителя формируют операционное окно приблизительно 7×7 см, проводят перикардотомию и на расстоянии 1–2 см ниже ушка выделяют 0,5 см нисходящей ветви левой коронарной артерии, под которую подводят две лавсановые лигатуры. Затем на выделенный участок коронарного сосуда (по длиннику) накладывают атравматическую хирургическую иглу № 6, затягивают на ней одну лигатуру, после чего иглу извлекают. Эта манипуляция воспроизводит частичную окклюзию коронарного сосуда и в существенной мере снижает риск развития фибрилляции желудочков сердца. Через 30 мин производят полную окклюзию коронарного сосуда путем затягивания второй лигатуры. В рану вводят антибиотики, ребра стягивают лигатурами и рану послойно ушивают. Для введения изучаемых соединений катетеризируют наружную яремную вену, свободный конец катетера выводят на холку животного. После восстановления у животного зрачкового рефлекса, что обычно совпадает с временем восстановления самостоятельного дыхания (3–5 ч от момента дачи наркоза), его отключают от аппарата искусственного дыхания и деинтубируют.

Через 24 ч после перевязки коронарной артерии животных берут в эксперимент и регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, продолжительность записи 3 раза по 60 с). Для дальнейшего исследования отбирают только тех животных, у которых регистрируется стойкая желудочковая экстрасистолия или желудочковая тахикардия. Количество эктопических сокращений не менее 70–75% (по результатам трех измерений). Затем внутривенно вводят изучаемое соединение (болюсом, медленно струйно или капельно; способ введения определяет предполагаемая схема применения изучаемого соединения в клинике).

Об эффективности изучаемого соединения судят по его способности восстанавливать нормальный сердечный ритм. В качестве референтных препаратов используют антиаритмики I класса.

Модификация метода Harris [24] позволяет оценить влияние изучаемых соединений на аритмогенез в острую фазу инфаркта миокарда. Для проведения подобного рода экспериментов необходимо наличие оборудования, позволяющего проводить суточное мониторирование ЭКГ по Холтеру. Животных наркотизируют, переводят на искусственное дыхание и при помощи рекордера в течение 1 ч регистрируют ЭКГ. Затем животных оперируют по вышеприведенной методике. Рану послойно зашивают и через час после операции начинают регистрацию ЭКГ, которую продолжают в течение 24 ч. Медикаментозный сон у животных поддерживают путем внутрибрюшинного введения пентобарбитала натрия (20 мг/кг 1 раз в 4–5 ч).

Изучаемое соединение при помощи инфузионного насоса вводят внутривенно с постоянной скоростью и в постоянном объеме, начиная с первого часа после операции, и продолжают в течение суток (скорость введения подбирают таким образом, чтобы в 1 ч была введена 1/24 от среднесуточной дозы соединения). Об эффективности изучаемого вещества судят по его способности подавлять злокачественные нарушения ритма сердца. В качестве референтного препарата используют антиаритмик I В класса лидокаин [11].

Эксперименты проводятся также на беспородных собаках [5, 11, 24].

Через 24 ч после вышеописанной подготовки животных электрокардиографически определяют процент эктопических сокращений желудочков по отношению к общей частоте сокращений сердца за 1 мин. Проводят две серии исследований. В первой — определяют *пороговые антиаритмические дозы исследуемого вещества и референтного препарата*. При этом учитывают время достижения максимального антиаритмического действия и время уменьшения антиаритмического эффекта на 50% после внутривенного введения исследуемого вещества и референтного препарата. Первоначально изучаемые соединения и препарат сравнения вводят в минимальных дозах. В случаях отсутствия антиаритмического действия избранных доз веществ увеличивают их в 2 раза до тех пор, пока не будут определены их минимальные (пороговые) дозы, вызывающие снижение эктопических сокращений желудочков более чем на 50%. Одноминутные ЭКГ-записи осуществляют с интервалом 2 (до 10 мин после введения вещества) и 5 мин в течение 70 мин. Во второй серии — *исследуют пороговые и изотоксические дозы изучаемого вещества и референтного*

препарата. При этом частоту сердечных сокращений и эктопические сокращения желудочков (в %) учитывают до введения веществ (фон), затем через 1, 3, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 и более мин после их инъектирования до возвращения фоновых значений или полного купирования нарушений ритма сердца.

2.1.2.2. Исследование эффективности изучаемых соединений на модели желудочковых аритмий, вызванных цезия хлоридом

Исследование проводится на наркотизированных (уретан 1,0–1,3 г/кг, внутривентриально) нелинейных крысах-самцах массой 200–250 г. Наркотизированных животных фиксируют на операционном столе в положении на спине. Перед началом эксперимента у животных регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, продолжительность записи 30 с). Затем подбирают дозу цезия хлорида, которая во всех экспериментах вызывает злокачественные желудочковые нарушения ритма сердца, в том числе и тахикардию типа «пируэт». Обычно аритмогенная доза цезия хлорида колеблется в пределах от 1 до 5 мМ/кг, в среднем 3 мМ/кг, что равно 504 мг/кг. Эффективная доза препарата вызывает стойкие злокачественные нарушения ритма сердца – политопную желудочковую экстрасистолию, желудочковую тахикардию, тахикардию типа «пируэт», переходящую в фибрилляцию желудочков сердца.

После проведения контрольной серии экспериментов рассчитывают процент животных, у которых цезия хлорид вызвал желудочковую экстрасистолию, желудочковую тахикардию, тахикардию типа «пируэт».

Изучаемое соединение вводят за 5–10 мин до введения цезия хлорида (в ранее подобранной дозе). Об эффективности изучаемого соединения судят по его способности предотвращать развитие злокачественных нарушений ритма сердца. В качестве референтных препаратов используют антиаритмики I и III класса по классификации E.M. Vaughan Williams. Поскольку нарушения ритма сердца, вызванные цезия хлоридом, обусловлены его способностью блокировать трансмембранные потенциалзависимые калиевые каналы, на этой модели наиболее эффективны антиаритмики III класса.

2.1.3. Исследование эффективности изучаемых соединений на модели реперфузионных аритмий

2.1.3.1. Исследование эффективности изучаемых соединений

на модели реперфузионных аритмий в исследованиях на кошках

Исследования проводятся на наркотизированных (пентобарбитал натрия 40 мг/кг внутривенно или этаминал-натрия 40–50 мг/кг внутривентриально) беспородных кошках обоего пола массой 2,5–3,5 кг. Животных после трахеотомии переводят на искусственное дыхание кислородно-воздушной смесью в соотношении 1:1 (возможно дыхание комнатным воздухом). Животных фиксируют на операционном столе в положении на спине. После проведения торако- и перикардотомии под нисходящую ветвь левой коронарной артерии на расстоянии 0,5–1 см от ее выхода из-под ушка сердца подводят лигатуру. Катетеризируют бедренную артерию для регистрации артериального давления и бедренную вену – для введения исследуемых соединений. Регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, длительность регистрации 60 с). Затем при помощи окклюдера пережимают коронарную артерию. Через 30 мин окклюдер снимают. Запись регистрируемых показателей проводят перед снятием окклюдера, а затем на 5, 10, 15, 20 и 30 минуте от момента снятия окклюдера. На 1–3 минуте после снятия окклюдера у животных развивается политопная желудочковая экстрасистолия, которая у 40–60% животных переходит в фибрилляцию желудочков сердца. Изучаемое соединение вводят внутривенно в 1 мл растворителя за 5 мин до снятия окклюдера. Об эффективности исследуемого соединения судят по его возможности предотвращать развитие злокачественных нарушений ритма сердца.

В качестве референтных веществ используют антиаритмические препараты IA, IC и IV класса по классификации E.M. Vaughan Williams [39].

В этих же экспериментах, помимо оценки антиаритмического действия изучаемых соединений, возможна оценка их влияния на основные показатели гемодинамики и деятельности сердца. Для этой цели левый желудочек сердца катетеризируют для измерения внутрисердечного давления, а на восходящую часть дуги аорты помещают датчик электромагнитного или ультразвукового расходомера.

2.1.3.2. Исследование эффективности изучаемых соединений на модели реперфузионных аритмий в исследованиях на крысах

Исследования проводятся на наркотизированных (пентобарбитал натрия, 60 мг/кг, внутрибрюшинно) нелинейных крысах-самцах массой 180–240 г. Животных после трахеотомии переводят на искусственное дыхание комнатным воздухом (может быть использован аппарат искусственной вентиляции легких для грызунов Rodent Ventilator, UGO BASILE (Италия)). Крыс фиксируют на операционном столе в положении на спине. После проведения торако- и перикардотомии под нисходящую ветвь левой коронарной артерии на расстоянии 1–2 мм от ее выхода из-под ушка сердца подводят лигатуру. Регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, длительность регистрации 30 с). Затем при помощи окклюдера пережимают коронарную артерию и через 7 мин производят реперфузию. Запись регистрируемых показателей проводят перед снятием окклюдера, а затем на 1, 3, 5, 10 и 15 минуте от момента снятия окклюдера. Через 1–2 мин после снятия окклюдера у животных развивается политопная желудочковая экстрасистолия, которая у 70% животных переходит в фибрилляцию желудочков сердца. Исследуемое соединение вводят внутривенно в 0,3–0,5 мл физиологического раствора или воды для инъекций за 5–6 мин до снятия окклюдера.

Об эффективности изучаемого соединения судят по его возможности предотвращать развитие злокачественных нарушений ритма сердца.

В качестве референтных препаратов используют антиаритмические препараты IA, IC и IV класса по классификации E.M. Vaughan Williams [39].

2.1.4. Исследование противofiбрилляторной активности изучаемых соединений на моделях фибрилляции желудочков

2.1.4.1. Исследование противofiбрилляторной активности изучаемых соединений в исследованиях на кошках с интактным и ишемизированным миокардом

Исследования проводятся на наркотизированных (пентобарбитал натрия 40 мг/кг внутривенно или этаминал-натрия 40 мг/кг внутрибрюшинно) беспородных кошек обоего пола массой 2,5–3,5 кг. Животных фиксируют на операционном столе в положении на спине, затем производят трахеотомию и переводят их на искусственное дыхание кислородно-воздушной смесью в соотношении 1 : 1 (возможно дыхание комнатным воздухом). После проведения торако- и перикардотомии в миокард левого желудочка (верхняя треть) вводят два позолоченных электрода на расстоянии 0,5 см друг от друга. Регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, длительность регистрации 60 с) и артериальное давление в бедренной артерии. Порог электрической фибрилляции сердца определяют повторяющимся сканированием уязвимого периода сердечного цикла сериями из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока увеличивающейся силы до возникновения фибрилляции. Если фибрилляция через 60 с самостоятельно не проходит, работу миокарда восстанавливают разрядом дефибриллятора (в режиме зарядки 20–50 Дж). За порог фибрилляции принимают минимальную силу тока, стабильно вызывающую фибрилляцию желудочков (длительностью более 60 с) при повторной стимуляции. После определения порога фибрилляции сердца животным дают «отдохнуть» 10–15 мин, после чего внутривенно в 1 мл растворителя вводят изучаемое соединение и определяют порог электрической фибрилляции сердца. Запись регистрируемых показателей производят

сразу же по окончании стимуляции левого желудочка сердца. Об эффективности изучаемых соединений судят по их способности повышать порог электрической фибрилляции сердца.

В качестве референтных препаратов используют антиаритмические средства I и III класса по классификации E.M. Vaughan Williams.

Исследования по изучению противофибрилляторной активности изучаемых соединений у животных с ишемизированным миокардом проводятся по аналогичной схеме. Ишемию миокарда вызывают одномоментной перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии на границе ее верхней и средней трети. Порог электрической фибрилляции определяют до и через 30 мин после перевязки коронарной артерии. При адекватном проведении экспериментов через 30 мин ишемии порог фибрилляции снижается на 10–15 и более процентов. Изучаемое соединение вводят внутривенно в 1 мл физиологического раствора или воды для инъекций через 30 мин после перевязки коронарной артерии (сразу же после повторного определения порога).

2.1.4.2. Исследование противофибрилляторной активности изучаемых соединений в исследованиях на собаках [29]

Исследования проводятся на наркотизированных (пентобарбитал натрия 40 мг/кг внутривенно или этаминал-натрия 40 мг/кг внутривенно) собаках массой 7–12 кг. Животных наркотизируют до IIIа уровня хирургического наркоза, после чего интубируют и переводят на искусственное дыхание кислородно-воздушной смесью в соотношении 1 : 1 (возможна вентиляция комнатным воздухом). После торако- (по 4-му межреберью) и перикардотомии под нисходящую ветвь левой коронарной артерии на расстоянии 0,5–1 см после ее выхода из-под ушка сердца подводят лигатуру. Регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, длительность регистрации 60 с). Затем проводят одномоментную перевязку коронарной артерии. Как правило, в первые 1–7 мин после перевязки коронарной артерии у 80% животных развивается политопная желудочковая экстрасистолия, сменяющаяся желудочковой тахикардией, переходящей в фибрилляцию желудочков.

Изучаемое соединение вводят за 5 мин до одномоментной перевязки коронарной артерии. Регистрацию ЭКГ проводят перед окклюзией и через 1, 3, 5, 10, 15 и 20 мин после перевязки коронарной артерии.

Об эффективности изучаемых соединений судят по их способности предотвращать развитие фибрилляции желудочков сердца.

В качестве референтных препаратов используют антиаритмические средства I и III класса по классификации E.M. Vaughan Williams.

2.1.4.3. Исследование противофибрилляторной активности изучаемых соединений на модели электрической фибрилляции желудочков сердца в исследованиях на крысах

Исследование проводится на наркотизированных нелинейных крысах-самцах массой 300–400 г. Животных фиксируют на операционном столе в положении на спине, производят трахеотомию и переводят на искусственное дыхание комнатным воздухом. После торако- и перикардотомии в миокард левого желудочка вводят два позолоченных электрода (расстояние между электродами 0,3–0,5 см). Регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение). Порог электрической фибрилляции сердца определяют повторяющимся сканированием уязвимого периода сердечного цикла серией из 20 прямоугольных импульсов постоянного тока увеличивающейся интенсивности. За порог фибрилляции желудочков принимают минимальную силу тока, вызывающую при двукратном повторении фибрилляцию желудочков. В исследование отбирают животных, у которых фибрилляция желудочков развивается при силе тока не более 6 мА. После определения порога фибрилляции животным дают «отдохнуть» 10–20 мин, затем внутривенно в 0,3–0,5 мл

физиологического раствора или воды для инъекций вводят изучаемое соединение и через 3–5 мин определяют порог электрической фибрилляции сердца. Об эффективности изучаемых соединений судят по их способности увеличивать порог электрической фибрилляции сердца.

В качестве референтных препаратов используют антиаритмические средства I и III класса по классификации E.M.Vaughan Williams.

2.1.5. Исследование вклада кардиальных и экстракардиальных механизмов в реализацию антиаритмического (антифибрилляторного) действия изучаемых соединений

Эксперименты проводятся на наркотизированных (пентобарбитал натрия 40 мг/кг внутривенно или этаминал-натрия 40 мг/кг внутривенно) беспородных кошек обоего пола массой 2,5–3,5 кг. Животных после трахеотомии переводят на искусственное дыхание кислородно-воздушной смесью в соотношении 1 : 1 (возможно дыхание комнатным воздухом), фиксируют на операционном столе в положении на спине, проводят торако- и перикардотомию. Денервацию сердца производят следующим образом: на уровне щитовидного хряща пересекают правый и левый №.vagus, а затем производят экстирпацию правого и левого звездчатых ганглиев, расположенных на задней поверхности верхней трети средостения, прилегающей к позвоночному столбу (справа и слева). Об эффективности денервации сердца судят по статистически значимому урежению частоты сердечных сокращений.

Порог электрической фибрилляции сердца определяют до и после денервации сердца. Затем внутривенно в 1 мл растворителя вводят изучаемое соединение и оценивают его влияние на величину порога электрической фибрилляции сердца.

В тех случаях, когда порог интактного и денервированного сердца не различается, высказывают предположение о том, что вклад экстракардиальных механизмов в реализацию антиаритмического действия изучаемого соединения незначителен.

2.2. Исследование антиаритмической активности изучаемых соединений при нарушениях сердечного ритма центрального генеза

Известно, что сердечные аритмии часто являются следствием нарушения нервной регуляции сердечного ритма.

В ряде экспериментальных работ убедительно показано, что стимуляция электрическими импульсами или химическими агентами определенных структур мозга в области коры, гипоталамо-гипофизарной и лимбической систем, продолговатого мозга индуцирует проявление различных форм аритмий — от синусовой тахикардии до фибрилляции желудочков.

Нарушения ритма сердца центрального происхождения могут иметь место у пациентов с различными неврологическими заболеваниями, особенно часто — с нарушениями мозгового кровообращения. Постоянно возрастает удельный вес расстройств сердечного ритма психосоматического генеза. Это диктует необходимость создания антиаритмических ЛС соответствующей направленности действия.

2.2.1. Исследование влияния изучаемых соединений на аритмии, вызванные введением в IV желудочек мозга аконитина, строфантина К и цезия хлорида

Эксперименты проводят на наркотизированных (внутрибрюшинно 40 мг/кг α -хлоралозы и 30 мг/кг этаминал-натрия) кошках массой 2,5–3,5 кг. Животных укладывают на столик спиной вверх, голову фиксируют зажимами под углом 45° по отношению к туловищу. Затем иглой (с мандреном) для внутримышечных инъекций пунктируют IV желудочек мозга, при этом иглу вводят по заднему краю большого затылочного отверстия на глубину 0,7–1 см, мандрен извлекают, после чего в просвете

иглы должен появиться ликвор, что свидетельствует о нахождении иглы в IV желудочке мозга. Для предотвращения истекания ликвора отверстие иглы закрывают пробкой. Спустя 7–10 мин фиксируют ЭКГ во II стандартном отведении. Аритмогенные вещества — аконитин [2–6 мкг/кг в растворе 1 : 20000], строфантин К [0,01–0,050 мг/кг в растворе 1 : 5000] и цезия хлорид [0,5–1,5 мг/кг в 1% растворе] вводят каждые 3–5 мин (с шагом: для первого вещества 2 мкг/кг, для второго — 0,01 мг/кг, для третьего — 0,5 мг/кг) в возрастающих дозах в IV желудочек мозга до появления стойких нарушений сердечного ритма. Через 5–7 мин внутривенно вводят изучаемое соединение в ранее определенных антиаритмических дозах. При наличии антиаритмического эффекта изучаемое вещество (в дозе 10–15 раз меньшей, чем для внутривенного введения) может быть инъецировано (на фоне аритмии) непосредственно в IV желудочек мозга. В качестве референтных препаратов могут быть избраны антиаритмики, устраняющие нарушения сердечного ритма периферического генеза, вызванные аконитином, строфантином К и цезия хлоридом.

2.2.2. Исследование влияния изучаемых соединений на аритмии, индуцированные электрораздражением нейроструктур головного мозга

Исследования могут быть проведены на собаках, кошках или кроликах массой 8–10, 3,0–4,0 и 2,5–3,5 кг соответственно.

Исследования на собаках. Для раздражения структур гипоталамуса наркотизированным (этаминал-натрия 40–50 мг/кг внутривенно) собакам вживляются нихромовые биполярные электроды (межэлектродное расстояние 1–1,2 мм) согласно атласу головного мозга для собак и фиксируются к костям черепа с помощью быстро твердеющей массы «Стиракрил». После операции вживления электродов исследования начинают проводить не ранее чем через 6–7 суток. Во время исследования животные находятся в станке в положении стоя. В экспериментах регистрируется ЭКГ в стандартных отведениях. Гистологический контроль локализации электродов проводится после коагуляции зоны раздражения. Стимуляция нервных образований гипоталамуса осуществляется прямоугольными импульсами тока с переменным напряжением (1–12 В), частотой (50–250 Гц) и постоянной длительностью импульса в 1 мс с использованием электростимулятора, позволяющего задавать соответствующие параметры. Продолжительность стимуляции 15 с.

При раздражении ретикулярного гигантоклеточного ядра ретикулярного каудального ядра моста, медиального и латерального преоптического и супраоптического ядер наиболее частой формой нарушений сердечного ритма является *вентрикулярная экстрасистолия*.

При стимуляции ретикулярного ядра моста, ретикулярного мелкоклеточного ядра и ядер вестибулярного комплекса наиболее часто наблюдается *политопная вентрикулярная экстрасистолия*.

Атриовентрикулярный (узловой) ритм развивается на фоне брадикардии при активации ретикулярного гигантоклеточного ядра и ретикулярного ядра покрывки.

Синусовая аритмическая брадикардия наблюдается на фоне раздражения структур ретикулярного гигантоклеточного ядра.

Следует отметить, что при стимуляции ретикулярного, мелкоклеточного и гигантоклеточного ядер и структур вестибулоспинального тракта может иметь место симптоматика нарушений коронарного кровообращения: смещение интервала S–T от изолинии, инверсия или увеличение вольтажа зубца Т ЭКГ [34].

Исследуемые вещества и референтные препараты (в избранных дозах) вводят собакам внутривенно перед (превентивное действие) или на фоне (купирующее действие) получения (в контроле) стойких нарушений сердечного ритма. ЭКГ регистрируют через избранные временные интервалы.

Исследования на кошках. Вживление электродов в вышеотмеченные структуры головного мозга осуществляют подобно экспериментам на собаках. Исследования изучаемых

веществ (при избранном пути введения) начинают проводить на наркотизированных кошках через 6–7 дней после вживления электродов. ЭКГ регистрируют согласно избранному алгоритму.

Исследования на кроликах. Этапы вживления электродов в определенные структуры головного мозга практически соответствуют тем, что были избраны для собак и кошек. Погружение электродов в соответствующие структуры головного мозга осуществляется по координатам атласа Е. Фифкова и Дж. Маршала [13]. После операции вживления электродов исследования начинают проводить не ранее, чем через 5–7 дней. Гистологический контроль положения электродов осуществляют путем подготовки серии срезов мозга, окрашенных гематоксилином-эозином. Они сравниваются с аналогичными срезами соответствующего стереотаксического атласа.

Изучаемое вещество или референтный препарат (в определенных дозах) вводят в краевую вену уха и затем регистрируют ЭКГ во II стандартном отведении в избранные временные интервалы.

2.2.3. Исследование влияния изучаемых соединений

на центральные звенья симпатической регуляции сердечного ритма

Эксперименты проводят на кошках массой 2,5–3,5 кг, наркотизированных смесью α -хлоралозы и этаминал-натрия (50 и 10 мг/кг соответственно внутривенно). Вентральную поверхность продолговатого мозга обнажают путем удаления ската затылочной кости после предварительной ампутации гортани, глотки с языком и глубоких мышц шеи. После этого вскрывают твердую и мягкую мозговые оболочки. За точку отсчета (нулевой уровень) принимают середину корешков XII пары черепно-мозговых нервов. Расположение определенных образований продолговатого мозга находят по соответствующим стереотаксическим атласам.

Локальную электростимуляцию продолговатого мозга осуществляют прямоугольными импульсами длительностью 0,2 мс, частотой 40 Гц и амплитудой 2–20 В при помощи монополярных вольфрамовых электродов ($d = 100 - 150$ мкм). Погружение электрода производят с помощью микроманипулятора с шаговым двигателем на глубину 1–2 мм от вентральной поверхности.

Химическую стимуляцию проводят микроинъекциями L-глутамата, который стимулирует только клеточные тела. Микроинъекции осуществляют с помощью микрошприца (цена деления 130 мкл). Глутамат (IM; pH 7,4–7,8) вводят в объеме 50–130 мкл.

ЭКГ регистрируют в специальном грудном отведении. ЧСС определяют при помощи анализатора сигналов «Ф-37». После накопления 100 циклов анализатор строит гистограмму, средняя ЧСС рассчитывается по ее пику. За исходную принимают ЧСС перед началом воздействия. Давление в аорте и левом желудочке регистрируют электроманометром. Запись ЭКГ, кривых давления в аорте и левом желудочке осуществляют на прямокоординатном самопишущем приборе, например «Н-3021/3».

Исследуемые соединения (в избранных дозах) и референтные препараты вводят внутривенно (лидокаин – 5 мг/кг, новакаинамид – 10 мг/кг, пропранолол – 0,5 мг/кг, амиодарон – 10 мг/кг, верапамил – 0,25 мг/кг) и в симпатизирующие нейронные структуры продолговатого мозга в дозах, составляющих 1/1000 от внутривенных (лидокаин – 0,005 мг, новакаинамид – 0,010 мг, пропранолол – 0,0005 мг, амиодарон, верапамил – 0,00025 мг).

3. Исследование механизма действия отобранных соединений

Исследования, выполняемые на III этапе поиска и изучения механизма действия антиаритмических ЛС, требуют участия высококвалифицированных специалистов, занимающихся электрофизиологическими, биохимическими и радиолигандными методами исследования.

3.1. Изучение механизма действия соединений, проявивших высокую активность при нарушениях сердечного ритма периферического генеза

3.1.1. Метод микроэлектродной техники

Метод микроэлектродной техники позволяет изучать влияние соединений на потенциалы клеток ткани сердца, регистрируя разность потенциалов между внутренней и наружной средой клетки. Используют выделенные из различных отделов сердца полоски миокарда теплокровных животных (кролики, морские свинки, крысы и т. д.). Изучают влияние соединений на потенциал покоя, амплитуду потенциала действия, максимальную скорость деполяризации, длительность потенциала действия при различных уровнях реполяризации (на уровне 25%, 50% и 90% фазы реполяризации — action potential duration: APD25, APD50 и APD90 соответственно), пороговый и максимальный диастолический потенциал, абсолютный эффективный рефрактерный период, частоту генерации потенциалов действия. Параллельно оценивают изометрическую силу, регистрируемую у несокращающейся мышцы (или в период между сокращениями) при данной степени предрастяжения или растяжения препарата (resting force: RF), и изометрическую силу, регистрируемую у сердечной мышцы в период сокращения (active force: AF).

Для исследований применяют микроэлектроды, изготовленные из боросиликатных марок стекла «Пирекс», «Феникс», «Кимакс», заполненные 2,5 М раствором KCl и имеющие электрическое сопротивление, величина которого лежит в диапазоне от 5 до 20 МОм, что свидетельствует о высоком качестве колоющей части. Для исследований спонтанно сокращающегося или стимулированного фрагмента ткани миокарда используют «плавающий» тип фиксации микроэлектрода. Микроэлектрод в этом случае свободно завешивается над тканью на проволоке (90% платины и 10% иридия) диаметром 20–30 мкм, причем один из концов проволоки соединен с хлорсеребряной иглой, которая вводится в электролит микроэлектрода, а другой подсоединен к входу измерительной аппаратуры через соединительные провода. После введения микроэлектрода в клетку он колеблется в такт с сокращениями ткани и удерживается некоторое время во внутриклеточном положении.

Для измерения изометрической силы, регистрируемой у несокращающейся мышцы, и у мышцы в период сокращения один конец ткани сердца жестко фиксируют, а другой присоединяют к механо-электрическому преобразователю.

3.1.2. Метод patch-clamp

Влияние соединений на ионные токи, протекающие через потенциалуправляемые ионные каналы мембраны рабочих кардиомиоцитов и клеток проводящей системы, проводят на клетках, изолированных из различных отделов сердца теплокровных животных (кролики, морские свинки, крысы и т. д.). На фоне действия соединений изучают либо суммарные ионные токи, текущие через мембрану, либо отдельно натриевые, калиевые и кальциевые токи, текущие через мембрану, либо токи, текущие через тот или иной тип одиночного потенциалуправляемого ионного канала. При этом метод позволяет регистрировать ионные каналы с изолированного кусочка мембраны, который может быть расположен по отношению к отверстию пипетки либо внешней, либо внутренней стороной. Дополнительно можно изучать параметры потенциала действия изолированного кардиомиоцита.

В основе этого метода лежат фиксация потенциала на мембране целой клетки или на фрагменте мембраны и измерение тока, протекающего через потенциалуправляемые ионные каналы. Для исследований применяют стеклянную микропипетку (patch-пипетку) с оплавленным кончиком, которая имеет электрическое сопротивление от 1,5 до 2,5 МОм. Внутри пипетки, заполненной раствором электролита, располагается хлор-серебряный электрод, а второй электрод размещается внеклеточно в омывающей препарат жидкости.

Для вычленения тех или иных ионных токов используют различные по композиции растворы, заполняющие patch-пипетку, и различный поддерживаемый потенциал. Например, если задача эксперимента включает в себя регистрацию только пика кальциевого тока, раствор должен включать в себя 140 мМ CsCl, 5,5 мМ MgCl₂, 5 мМ Na₂ATP, 0,01 мМ EGTA, 10 HEPES/КОН (pH 7,2). В этом случае Cs⁺ выступает как блокатор K⁺-тока. Для полного ингибирования Na⁺-тока можно добавить необходимое количество блокаторов Na⁺-каналов, хотя обычно правильно подобранная величина поддерживаемого потенциала (holding potential) ингибирует Na⁺-ток. Разумеется, что во внеклеточном растворе 5,4 мМ KCl надо также заменить на 5,4 мМ CsCl.

Сначала patch-пипетку подводят вплотную к мембране изолированной клетки и создают в ней небольшое отрицательное давление. Это приводит к тому, что мембрана плотно закупоривает отверстие пипетки и формируется высокоомный контакт — конфигурация cell-attached, или, иначе, переход пипетка — мембрана с сопротивлением утечки более 1 ГОм (так называемый giga seal). После нормализации давления в пипетке конфигурация cell-attached близка к физиологической ситуации, поскольку зона мембраны, захваченная пипеткой, с внутренней стороны контактирует с внутриклеточной жидкостью, а с внешней стороны — со стандартным внеклеточным раствором, которым заполняют patch-пипетку. Эта конфигурация, с одной стороны, позволяет регистрировать одиночные ионные каналы под пипеткой, а с другой, является промежуточной для других конфигураций. Конфигурация позволяет изучать на одиночном канале роль соединений, которые активируют или инактивируют каналы снаружи.

Конфигурация cell-attached позволяет сформировать другую конфигурацию, называемую inside-out patch. К ее образованию приводит резкое отрывание пипетки от клетки, причем giga seal не меняется. В этом случае на пипетке находится лишь фрагмент мембраны (patch), внутренняя сторона которой смотрит в омывающий раствор перфузионной камеры, а внешняя контактирует с содержимым пипетки. Данная конфигурация используется для изучения вклада соединений цитоплазмы в канальную активность.

Конфигурация cell-attached позволяет двумя путями (в зависимости от задач исследователя) сформировать конфигурацию, называемую whole-cell. В одном случае для ее получения в пипетку необходимо резко и одновременно подать небольшое отрицательное давление, разрывающее мембрану под пипеткой и образующее низкоомный путь между внутренней средой клетки и раствором в пипетке. При этом в мембране возникает дырка, величина которой позволяет осуществлять обмен ионов и различных соединений между пипеткой и цитоплазмой. В другом случае низкоомный путь между внутренней средой клетки и раствором в пипетке формируется за счет влияния соединений, находящихся в пипетке и вызывающих образование в мембране пор, проницаемых для ионов, но не для молекул. Это перфоративный (perforated) patch. Антибиотики нистатин (nystatin) и амфотерицин-В (amphotericin-B) используют в пипеточном растворе, чтобы образовать специфические поры на участке мембраны под пипеткой. Они пропускают через мембрану моновалентные катионы и анионы. Еще одно соединение — грамицидин (gramicidin) — помогает формировать каналы, проницаемые только для моновалентных катионов. Эта методика позволяет исследовать ионные токи, протекающие через мембрану, идентифицировать и вычленить их.

Конфигурация whole-cell позволяет сформировать другую конфигурацию — outside-out patch. Медленное оттягивание пипетки от клетки заставляет мембрану растягиваться до тех пор, пока она не отделится от клетки и не сошлется. Теперь ее внутренняя часть будет контактировать с раствором в пипетке, а внешняя — с омывающим раствором в перфузионной камере. Эта конфигурация используется для изучения вклада соединений внешней среды клетки в активность единичных каналов.

Далее о токах, текущих через мембрану целой клетки или одиночный ионный канал, представляют в виде вольт-амперной характеристики клетки. Для этого с шагом в 10 мВ, а при приближении к точке пересечения оси абсцисс с осью ординат (то есть к нулевой

точке потенциала и тока) с шагом в 5 мВ от величины holding potential, должны быть поданы тестирующие импульсы отрицательной полярности до -100 мВ, после чего тестирующие импульсы положительной полярности до величины +100 мВ.

Важно определение емкости клетки. Для этого от уровня в -80 мВ (или несколько большего) на клетку подают тестирующий импульс отрицательной полярности величиной не более 10 мВ (на самом деле точная величина тестирующего импульса не так важна, хотя обычно на клетку подают действительно 10 мВ. Важно чтобы не активировался ни один ток) и регистрируют площадь емкостных пиков, соответствующих фронту нарастания сигнала (в положительную область) и фронту падения сигнала (в отрицательную область), вычисляя на этой основе емкость клетки. В этом случае используется простой расчет, связанный с RC-цепочкой. Если подать достаточно длинный импульс, то площадь под емкостным артефактом равна RC при соблюдении двух приближений. Необходимо пренебречь фронтом нарастания и считать спад как моноэкспоненциальный. Если импульс длинный, то ток в конце импульса дает величину $R=U/I$ и соответственно можно подсчитать C. Емкость клетки необходима для нормирования величины тока, то есть для получения значений pA/pF. Такое нормирование крайне необходимо, поскольку величина тока зависит от размеров клетки, определение которых практически невозможно. Другими словами, у разных по размеру клеток будут регистрироваться разные по величине токи, поэтому проведение статистического анализа практически невозможно. Однако поскольку размеры клетки напрямую связаны с ее емкостью, принято осуществлять нормирование по величине емкости.

По завершении этих исследований определяют особенности электрофизиологического действия и тропность изучаемых соединений к потенциалуправляемым ионным каналам и, следовательно, принадлежность к тому или иному классу антиаритмических препаратов.

Физиология и молекулярная биология мембран клеток, микроэлектродные методы и их техническое обеспечение подробно описаны в работах [6, 7].

3.1.3. Электрофизиологический метод исследования механизма действия отобранных соединений в экспериментах in vivo

Исследование влияния изучаемых соединений на проводящую систему сердца при помощи программной электрической стимуляции миокарда проводится на наркотизированных (пентобарбитал 40 мг/кг внутривенно) беспородных собаках обоего пола массой 10–15 кг. Собак наркотизируют до Ша уровня хирургического наркоза, после чего интубируют и переводят на искусственное дыхание кислородно-воздушной смесью в соотношении 1:1 (возможна вентиляция комнатным воздухом). Животных фиксируют на операционном столе в положении на правом боку. После торако- (по 3–4-му межреберью) и перикардотомии биполярный электрод (расстояние между полюсами электрода 5 мм) фиксируется на левом ушке сердца. При помощи этого электрода проводят электрическую стимуляцию и регистрацию электрограммы левого желудочка. Вторую пару электродов вводят в толщу миокарда левого желудочка в области, прилежащей к левому предсердию. С его помощью проводят стимуляцию и регистрируют электрограмму левого желудочка. Третий биполярный зонд проводят через левую бедренную артерию и устанавливают в начальной части аорты для регистрации электрограммы пучка Гиса. Параллельно регистрируют ЭКГ во II стандартном отведении. Оценивают следующие показатели:

- интервал PP;
- интервал PQ;
- длительность комплекса QRS;
- интервал QT.

Измерения производят на синусовом ритме, величину интервала QT выражают в абсолютных величинах в мс, обозначая данный показатель QT_{max} . Величину интервала QT выражают также в корригированной форме (QT_c), определяя ее по формуле:

$$QT_c = \frac{QT_{(c)}}{\sqrt{RR_{(c)}}}.$$

Длительность интервала QT измеряют также при частой стимуляции предсердий в последнем навязанном цикле, определяя наименьшую его величину во всем диапазоне частот стимуляции. Этот показатель обозначают как QT_{\min} ;

– интервал PA (время внутрисердечного проведения) – время от начала зубца P в любом из трех стандартных отведений наружной ЭКГ до первой быстрой высокоамплитудной осцилляции предсердий на электрограмме пучка Гиса;

– интервал AH (время проведения импульсов по атриовентрикулярному узлу) – время от начала первой быстрой высокоамплитудной осцилляции предсердий на электрограмме пучка Гиса до начала осцилляции пучка Гиса;

– интервал HV (время проведения импульсов по системе Гиса-Пуркинье) – время от начала осцилляции пучка Гиса до начала возбуждения желудочков по электрограмме пучка Гиса или наружной ЭКГ в зависимости от того, где возбуждение желудочков регистрируется раньше;

– минимальная длительность цикла стимуляции предсердия, при которой сохраняется проведение импульсов на желудочки с кратностью 1:1 (CL 1:1);

– время восстановления функции синусового узла (SNRT) – время от начала последней активации предсердий, вызванной электростимулом, до начала первой спонтанной активации предсердий после прекращения серии частой стимуляции предсердий. Данную величину определяют на всех частотах стимуляции предсердий и в качестве SNRT выбирают максимальную из них. Вычитая из полученной величины SNRT длительность спонтанного синусового цикла (интервал PP), получают скорректированное время восстановления функций синусового узла (CSNRT);

– эффективный рефрактерный период предсердий (ERPA);

– функциональный рефрактерный период предсердий (FRPA);

– общий рефрактерный период предсердий (TRPA);

– относительный рефрактерный период предсердий (RRPA) – разность между TRPA и ERPA;

– эффективный рефрактерный период атриовентрикулярного узла (ERP AVN);

– функциональный рефрактерный период атриовентрикулярного узла (FRP AVN);

– общий рефрактерный период системы Гиса-Пуркинье (TRPHPS);

– эффективный рефрактерный период желудочков (ERP V);

– функциональный рефрактерный период желудочков (FRP V).

При электростимуляции желудочков различают следующие виды спонтанной эктопической активности:

– повторный желудочковый ответ (RR) – от 1 до 5 следующих друг за другом спонтанных эктопических возбуждений желудочков;

– неустойчивая желудочковая тахикардия (VTNS) – спонтанная желудочковая эктопическая активность продолжительностью более 5 циклов, но менее 30 с;

– устойчивая желудочковая тахикардия (VTS) – спонтанная желудочковая эктопическая активность продолжительностью более 30 с;

– фибрилляция желудочков (VFb).

При развитии VFb или VTS, не купирующейся электростимуляцией желудочков и приводящей к серьезным гемодинамическим последствиям, проводят электроимпульсную терапию (DS shock). При этом энергию импульса подбирают, начиная с 1,0 кВ, так, чтобы определить порог дефибрилляции. Если это происходит в контрольном исследовании до введения препарата, то после восстановления нормального ритма следует выждать период не менее 20 мин, контролируя величину ERPV и давая ей возможность вернуться к контрольному значению.

После завершения контрольного исследования вводят изучаемый препарат. В течение 60 мин через каждые 5 мин измеряют интервалы ЭКГ и электрограммы пучка Гиса. Начиная с 15 мин, проводят программу электростимуляции в последовательности, описанной выше. В случае, когда у одного животного изучают препарат в двух разных дозах, вторую дозу следует вводить не менее чем через час после введения первой. Контрольными значениями изучаемых показателей для второй дозы служат те же величины, что и для первой.

3.2. Исследование механизма действия соединений, проявивших высокую активность при нарушениях сердечного ритма центрального генеза

3.2.1. Исследование влияния изучаемых соединений на трансмембранные ионные токи — кальциевые, натриевые и медленные калиевые

Исследования проводят на изолированных нейронах брюхоногого моллюска — прудовика большого (*Lymnaea stagnalis*) по методу [4]. При этом используют неидентифицированные нейроны. Из тела моллюска выделяют окологлоточное кольцо нервных ганглиев, которое затем обрабатывают 0,25 % раствором трипсина в течение 40–60 мин. Ферментативная обработка позволяет освободить поверхность мембраны нейронов от соединительнотканых оболочек, глиальных клеток и других диффузионных барьеров. После обработки трипсином ганглии помещают в раствор «Рингер К» и через 5–10 мин подвергают механическому разделению под бинокулярным микроскопом с помощью вольфрамовых игл и полиэтиленовой пипетки. Полученные таким образом нейроны жизнеспособны и сохраняют свои электрические характеристики в течение 1–3 суток.

Используют растворы со следующим ионным составом:

1. Наружные (перфузирующие) растворы (в мМ):

а) для регистрации суммарного входящего тока («Рингер К»): NaCl — 100; KCl — 5; CaCl₂ — 2; MgCl₂ — 1,5; Tris-ОН — 2; pH = 7,5;

б) для регистрации кальциевого тока: CaCl₂ — 10; MgCl₂ — 5; CsCl — 100; Tris-ОН — 2; pH = 7,5.

в) для регистрации натриевого тока: NaCl — 110; MgCl₂ — 1,5; Tris-ОН — 2; pH = 7,5.

2. Внутриклеточные (диализирующие) растворы (в мМ):

а) для регистрации суммарного выходящего калиевого тока: KCl — 120; Tris-ОН — 2; pH = 7,4;

б) для регистрации кальциевого или натриевого токов: CsCl — 120; Tris-ОН — 2; pH = 7,4.

Перфузирующий раствор подают в камеру, где находится нейрон на полиэтиленовой микропипетке, а диализирующий раствор — внутри этой пипетки. Исследуемые вещества добавляют в перфузирующий (наружный) раствор.

Для измерения трансмембранных ионных токов применяют метод внутриклеточной перфузии изолированных нейронов и фиксации мембранного потенциала. В состав установки для измерения трансмембранных ионных токов входят следующие блоки: камера (полиэтиленовая пипетка, нейрон, кювета с наружным раствором, электроды); усилители для фиксации потенциала; осциллограф; программируемый генератор импульсов ПГИ-100; блок питания усилителей для фиксации потенциала; компьютер; принтер.

Для изготовления микропипетки с «порой» используют тонкую полиэтиленовую трубку длиной 3 см, согнутую V-образно в струе горячего воздуха, и на ее губе тонкой стальной проволокой формируют выступ. Затем на вершине выступа под бинокулярной лупой иглой делают отверстие. Изготовленную микропипетку соединяют с системой трубочек для подачи диализирующего раствора. По величине электрического сопротивления (порядка 200–400 кОм) оценивают диаметр отверстия (3–5 мкм), т. е. пригодность микропипетки для дальнейшей работы.

С раствором в полиэтиленовой микропипетке должен контактировать агаровый мостик с неполяризуемым хлор-серебряным электродом, через который с помощью

усилителей поддерживается фиксированный потенциал. Второй такой же электрод помещают в камеру и используют для регистрации ионных токов с помощью усилителя-преобразователя «ток-напряжение».

Кривые ионных токов визуально оценивают на экране осциллографа, вводят в компьютер и распечатывают на принтере.

Эксперименты и обработку результатов проводят следующим образом.

Изолированную живую клетку помещают на полиэтиленовую пипетку при фиксированном потенциале -80 мВ. В микропипетке создаются толчки отрицательного гидростатического давления. Вследствие этого в области «поры» пипетки мембрана находящегося в ней нейрона разрушается и создается электрический контакт неполяризуемого электрода (соединенного с усилителем фиксации потенциала) с внутриклеточным содержимым. При гиперполяризующем сдвиге мембранного потенциала на экране осциллографа регистрируются параметры емкостных токов мембраны и неспецифического тока утечки, который «вычитают» из величины общего тока. После переключения тестирующего импульса на «деполяризацию» регистрируют входящий (натрий-кальциевый) и выходящий (быстрый и медленный калиевый) ток.

Вслед за регистрацией суммарных ионных токов производят замену внутриклеточного и наружного растворов на растворы, необходимые для регистрации отдельного тока. Выделение чистых кальциевых или натриевых токов со стабильными их параметрами, которые принимаются за исходные значения (до начала действия исследуемого вещества), происходит через 3–5 мин после полной замены растворов. Затем раствор в камере, где находился нейрон, заменяют на раствор с исследуемым веществом. Когда изменения ионных токов, вызванные влиянием этого вещества, стабилизировались (через 2–3 мин), вновь регистрируют величины токов (в период действия вещества). Затем раствор заменяют на раствор с большей концентрацией и в конце эксперимента — на раствор с исходной концентрацией и наблюдают динамику восстановления ионных токов.

Исследуемые соединения в избранных концентрациях (мкМ) добавляют в наружные растворы для выделения соответствующих токов и их оценки.

На основании полученных данных с помощью компьютера анализируются вольт-амперные характеристики и их корреляции в системе «концентрация-эффект». Исходные величины токов принимают за 100%, а установившиеся при действии исследуемых веществ величины токов сопоставляют (в процентах) с исходными. Во внимание принимают различия, соответствующие t -критерию Стьюдента.

3.2.2. Исследование влияния изучаемых соединений на ионный гомеостаз в кардиомиоцитах крыс

К основным причинам развития аритмий относится ишемия миокарда. Индуцируемые гипоксией сдвиги внутриклеточного энергетического метаболизма вызывают изменения трансмембранных ионных потоков Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , приводящие к различным нарушениям автоматизма и проводимости кардиальных клеток. К числу важных аритмогенных факторов относятся: повышение диастолической концентрации свободных ионов натрия и кальция в цитоплазме кардиомиоцитов, снижение потенциала покоя плазматической мембраны клеток. В основе молекулярного механизма действия антиаритмических препаратов лежит специфическое ингибирование активности ионных каналов для Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , блокада b_1 -адренорецепторов сердца. Молекулярными мишенями действия антиаритмиков являются ионные каналы, переносчики и адренорецепторы наружной плазматической мембраны кардиомиоцитов. На основе механизма их действия антиаритмические препараты классифицированы E.M. Vaughan Williams на I–V классы.

В связи с этим новые соединения с антиаритмической активностью важно исследовать в плане влияния их на ионный гомеостаз покоящихся и стимулированных кардио-

миоцитов крыс. В качестве референтных препаратов могут быть использованы антиаритмики различных классов (согласно классификации E.M. Vaughan Williams).

В работе используют следующие реактивы: CdCl_2 , NiCl_2 ; HEPES, NaCl , KCl , CaCl_2 , NaH_2PO_4 , MgSO_4 , ЭГТА, тапсигаргин; Fura-2/AM; MnCl_2 , дигитонин, изопротеронол, кофеин, адреналин; HCl , NaOH . Все растворы готовят на дистиллированной воде.

Определение ионов кальция $[\text{Ca}^{++}]_{\text{цит}}$ в кардиомиоцитах осуществляют с помощью флуоресцентного зонда — тетраацетоксиметилового эфира (Fura-2/AM).

Внутриклеточную концентрацию кальция рассчитывают на основании измерений при двух длинах волн возбуждения (F_{340} и F_{380}), используя следующий прием. В общем виде значения интенсивностей, соответствующие этим двум длинам волн, выражают следующим образом:

$$F_{340} = S F f_{340} \times cf + S b_{340} \times cb; F_{380} = S F f_{380} \times cf + S b_{380} \times cb,$$

где cf и cb — концентрации свободного индикатора и его комплекса с кальцием соответственно, а S — фактор, зависящий от коэффициента поглощения, интенсивности возбуждающего света, длины оптического пути в кювете, квантового выхода.

Затем, вводя параметр $R = F f_{340} / F f_{380}$ и применив уравнение закона действующих масс для реакций первого порядка $cb = cf \times [\text{Ca}^{++}]_{\text{цит}} / K_d$, переходят к выражению:

$$(S f_{340} + S b_{340} \times [\text{Ca}^{++}]_{\text{цит}} / K_d) \times (S f_{380} + S b_{380} \times [\text{Ca}^{++}]_{\text{цит}} / K_d) = R.$$

Решив это уравнение относительно R , получают

$$[\text{Ca}^{++}]_{\text{цит}} = K_d (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R) / (S f_{380} / S b_{380}),$$

где $R_{\min} = R$ при $cb = 0$, т. е. $R_{\min} = S f_{340} / S f_{380}$, $R_{\max} = R$ при $cf = 0$, т. е. $R_{\max} = S b_{340} / S b_{380}$.

Конечная формула принимает вид:

$$[\text{Ca}^{++}]_{\text{цит}} = K_d \times k \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R).$$

R — регистрируемый уровень флуоресценции. Значение $K_{\text{дисс}}$ — равновесной константы диссоциации Fura-2/AM с Ca^{++} — определяют в модельных исследованиях, используя раствор Fura-2.

Определение внутриклеточной концентрации ионов натрия в кардиомиоцитах с помощью флуоресцентного зонда SBFI проводят по методу, описанному A.I. Khankoeva et al. (1997). Концентрацию ионов натрия в саркоплазме рассчитывают по формуле:

$$[\text{Na}^+]_{\text{цит}} = K_d \times k \times (R - R_{\min}) / (R_{\max} - R),$$

где R — отношение флуоресценции при длинах возбуждающего света 340 нм (F_{340}) и 380 нм (F_{380}); R_{\min} и R_{\max} — то же при нулевой и насыщающей концентрации $[\text{Na}^+]_{\text{цит}}$ (150 мМ); k — отношение интенсивности флуоресценции при 380 нм для свободного и связанного зонда ($2,1 \pm 0,1$); K_d — равновесная константа диссоциации комплекса зонд– Na , равная $20,8 \pm 1,4$ мМ.

Оценку изменений внутриклеточной концентрации ионов калия в кардиомиоцитах с помощью флуоресцентного зонда PBFI проводят по методике, описанной Ru-Chi Shieh et al. (1994).

Для моделирования условий гипоксии клетки инкубируют в течение 30 мин при 37°C в среде, содержащей 0,5 мМ KCN и 10 мМ 2-дезоксиглюкозу.

Электрическую стимуляцию кардиомиоцитов осуществляют с помощью установки MacLab system (Австралия) или ее аналогов. Стимуляцию β_1 -адренорецепторов карди-

омиоцитов проводят путем добавления к клеточной суспензии 30 нМ изопротеренола. Для определения содержания цАМФ в кардиомиоцитах используют стандартные наборы фирмы «Amersham» или их аналоги.

Расчет доверительных интервалов экспериментальных значений и оценку достоверности различий между ними проводят с помощью параметрического t-критерия Стьюдента при уровне значимости, равном 0,05.

3.2.3. Исследование влияния изучаемых соединений на функциональную активность различных типов рецепторов основных нейромедиаторов ЦНС на модели изолированных мембран синапсом продолговатого мозга крыс

Нормализующее влияние на нарушенный ритм сердечных сокращений могут оказывать вещества, относящиеся к разным классам химических соединений и принадлежащие к различным фармакологическим группам. Антиаритмический эффект могут оказывать успокаивающие (седативные, транквилизирующие) препараты, многие нейротропные средства (холиноблокаторы и холиномиметики, адреноблокаторы и адреномиметики, местные анестетики, некоторые антиконвульсанты с противоэпилептической активностью), препараты, содержащие соли калия, антагонисты ионов кальция и др.

Исходя из вышеизложенного представляется важным исследовать влияние нового вещества (в случае наличия у него нейротропных свойств) на основные рецепторные системы, принимающие участие в центральных механизмах регуляции сердечного ритма. К ним относятся рецепторы глутамата (NMDA и метаботропные рецепторы), рецепторы серотонина различных подтипов (5-НТ₁, 5-НТ₂ и 5-НТ₃) [30, 34]. В качестве препаратов сравнения могут быть избраны различные антиаритмики, относящиеся к различным классам по классификации Е.М. Vaughan Williams. Исследуемое вещество может быть изучено в плане влияния его на функциональную активность двух различных семейств рецепторных систем, отличающихся по механизмам передачи внеклеточного сигнала с плазматической мембраны нейронов, и формирования клеточного ответа, а именно рецепторов, сопряженных с ионными каналами и синтезом циклических нуклеотидов.

Активацию мембранных рецепторов нейромедиаторов ЦНС, встроенных в плазматические мембраны нейронов, которые одновременно являются ионными каналами, можно оценить по изменению содержания ионов кальция, натрия, хлора в синапсосомальных везикулах, образованных плазматическими мембранами. В частности, к ним относятся 5-НТ₃-тип рецепторов серотонина, ГАМК_A-тип рецепторов ГАМК и NMDA-тип рецепторов глутамата.

Согласно данным Y. Pankratov et al. [35] функциональная активность 5-НТ₃-типа рецепторов серотонина опосредована открытием кальциевого канала и последующим повышением внутриклеточного/синапсосомального уровня свободных ионов кальция ($[Ca^{2+}]_{\text{вн}}$). Активность ГАМК_A-типа рецепторов ГАМК определяется током ионов хлора через ионофор, входящий в состав ГАМК-бензодиазепинового комплекса [33]. Активация NMDA-типа рецепторов глутамата сопровождается открытием катионного канала и поступлением ионов кальция и натрия из внеклеточного пространства в синапсосомы [28].

Функциональную активность другого семейства мембранных рецепторов нейромедиаторов ЦНС, представленного рецепторами, локализованными в плазматических мембранах нейронов и сопряженными с активацией G-белков, можно оценить, регистрируя изменения концентрации в синапсосомах вторичных мессенджеров — циклического аденозинмонофосфата и инозитол-трифосфата. Активация 5-НТ₁-типа рецепторов серотонина сопровождается ингибированием активности аденилатциклазы и последующим снижением внутриклеточной/синапсосомальной концентрации вторичного мессенджера цАМФ. В то же время активация метаботропных рецепторов глутамата и 5-НТ₂-типа рецепторов серотонина приводит к увеличению внутриклеточного/синапсосомального содержания вторичного мессенджера инозитол-трифосфата [16]. Стимуляция β-адрено-

рецепторов вызывает повышение внутриклеточной/синаптосомальной концентрации вторичного мессенджера цАМФ [17].

Синаптосомы — везикулы плазматических мембран — из вентролатеральных отделов продолговатого мозга получают с помощью метода дифференциального центрифугирования в градиенте перколла [18]. Для оценки изменений внутриклеточной концентрации свободных ионов кальция и натрия используют специфические флуоресцентные индикаторы Fluo-3 и SBF1. Процедуры нагружения синаптосом флуоресцентными зондами, расчет концентрации ионов в везикулах проводят по методикам, описанным в работах [21]. Конечная концентрация зондов во внутривезикулярной среде желательна в пределах 5–7 мкМ. Концентрацию везикулярного ионизированного кальция ($[Ca^{2+}]_{\text{вн}}$) рассчитывают по формуле [31]:

$$[Ca^{2+}]_{\text{вн}} = K_d (F_{\text{max}} - F_{530}) / (F_{530} - F_{\text{min}}),$$

где F_{530} — интенсивность флуоресценции образца при 530 нм; F_{max} — флуоресценция в условиях насыщения зонда кальцием, определяемая после внесения 30 мкМ дигитонина и 1 мМ $CaCl_2$; F_{min} — интенсивность флуоресценции при нулевой (в присутствии 5 мМ ЭГТА и 5 мкМ A23187) концентрации кальция; K_d — равновесная константа диссоциации комплекса Fluo-Ca, равная 0,42 мкМ.

Перед измерением включения Ca^{2+} пробы преинкубируют при 37 °С в течение 30 мин — времени, достаточном для достижения равновесия в системе среда — везикулы. Для вычисления количества Ca^{2+} , накопленного в везикулах, в предварительных экспериментах определяют внутривезикулярный объем.

Для перерасчета интенсивности флуоресценции зонда SBF1 в $[Na^+]_{\text{вн}}$ выполняют процедуру калибровки.

Концентрацию ионов натрия в везикулах рассчитывают по формуле:

$$[Na^+]_{\text{вн}} = K_d \times k \times (R - R_{\text{min}}) / (R_{\text{max}} - R),$$

где R — отношение флуоресценции при длинах возбуждающего света 340 нм (F_{340}) и 380 нм (F_{380}); R_{min} и R_{max} — то же при нулевой и насыщающей концентрации $[Na^+]_{\text{вн}}$ (150 мМ); k — отношение интенсивности флуоресценции при 380 нм для свободного и связанного зонда ($2,1 \pm 0,1$); K_d — равновесная константа диссоциации комплекса зонд-Na, равная $20,8 \pm 1,4$ мМ.

Определение изменений содержания ионов хлора ($[Cl^-]_{\text{вн}}$) в изолированных синаптосомах основано на использовании флуоресцентного индикатора Cl^- , 6-метокси-N-этилхинолина йодида. Минимальное значение флуоресценции (F_{min}) определяют после инкубации везикул в течение 10 мин в присутствии 150 мМ KSCN и 25 мкМ валиномицина. При этом анион $KSCN^-$ вытесняет Cl^- из комплекса с красителем, валиномицин служит в качестве ионофора, переносящего $KSCN^-$ через плазматическую мембрану в везикулы. Для определения величины константы Штерна-Волмера экспериментальные данные представляют в следующих координатах:

$$F_o / F_{Cl^-}; [Cl^-],$$

где $F_o = F_{\text{max}} - F_{\text{min}}$, F_{Cl^-} — значение флуоресценции при заданной концентрации ионов хлора в среде ($[Cl^-]$).

Везикулярную концентрацию хлора в исследуемых образцах рассчитывают на основании построенной калибровочной кривой, подставляя экспериментальное значение флуоресценции образцов.

Для определения содержания цАМФ в синаптосомах используют стандартные наборы фирмы «Amersham». Содержание инозитол-трифосфата определяют радиометрически.

Активацию рецепторов осуществляют путем внесения в суспензию синапсом, выделенных из вентролатеральных отделов продолговатого мозга, селективных агонистов соответствующих типов рецепторов (табл. 1).

Таблица 1

Используемые в работе специфические лиганды различных типов рецепторов

Тип рецептора	Агонист	Антагонист
5-HT1	8-ОН-DPAT	Спиперон
5-HT2	α -Me-5HT	Метисергид
5-HT3	Хлорфенил-бигуанид	Ондансетрон
ГАМКА	Муцимол	Блокатор хлорного ионофора пикротоксин
NMDA	N-метил-D-аспартат	CGS 19755
Met-Glu	D-AP4	MCPG
β -AR	Изопротеренол	Пропранолол

Сокращения: 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino)tetralin (8-ОН-DPAT); alpha-methyl-5-hydroxytryptamine (α -Me-5HT); CGS19755 (selfotel) = memantine; D-2-amino-4-phosphobutanoic acid (D-AP4); methyl-4-carboxyphenylglycine (MCPG).

Для оценки специфичности выявленных изменений в качестве контроля используют избирательные антагонисты/ингибиторы изучаемых в работе рецепторных систем.

Расчет доверительных интервалов экспериментальных значений и оценку достоверности различий между ними проводят с помощью параметрического t-критерия Стьюдента при уровне значимости, равном 0,05.

4. Общие фармакологические свойства, аритмогенное действие и токсичность изучаемых соединений

4.1. Методы, позволяющие выявить общую фармакологическую активность антиаритмических лекарственных средств

4.1.1. Использование методов радиолигандного связывания для исследования спектра взаимодействия изучаемых соединений с мембранными рецепторами различных типов

В настоящее время для изучения характера действия исследуемых химических веществ широко применяют методы радиолигандного связывания. Методы радиолигандного анализа позволяют выявить мишени — специфические рецепторы, через которые вещество влияет на метаболизм клетки. Изучение механизмов взаимодействия химических соединений с различными типами рецепторов позволяет выявить особенности строения вещества, которые определяют его свойства, и на этой основе сформулировать требования к направленному синтезу новых соединений. С другой стороны, представляет значительный интерес исследование спектра взаимодействия уже изученного нового препарата с мембранными рецепторами различных типов. Для изучения антиаритмических препаратов представляет интерес исследование связывания соединений с рецепторами натриевых, кальциевых и калиевых каналов, мускариновыми рецепторами (M_1M_2); α_1, α_2 -адренорецепторами, β_1, β_2 -адренорецепторами, дофаминовыми, D_2 -рецепторами, гистаминовыми рецепторами и т. д. Определяют константы связывания исследуемого соединения с мембранными рецепторами различных типов.

4.1.2. Исследование влияния на сердечно-сосудистую систему

В исследованиях на наркотизированных или бодрствующих собаках или кошках регистрируют артериальное давление и деятельность сердца (частоту сердечных сокращений, ударный и минутный объемы, сократительную функцию миокарда). Влияние на сократимость имеет большое значение для оценки нового антиаритмического препарата. Так как угнетение сократимости присуще многим антиаритмическим веществам, важно выяснить, насколько интенсивно оно выражено. В той же степени это относится и к влиянию нового соединения на частоту сердечных сокращений и функцию проведения.

4.1.3. Исследование влияния на вегетативный отдел нервной системы

Исследование проводят на целом животном (наркотизированные кошки) и на изолированных органах (изолированные отрезки кишечника). На целом животном изучают влияние вещества на реакции артериального давления, вызванные введением адреналина, норадреналина, ацетилхолина, а также раздражением периферического отдела блуждающего нерва, а также на сокращение третьего века у кошек при раздражении симпатического нерва на шее.

В исследованиях на изолированных отрезках кишечника исследуют влияние веществ на спазм кишечника, вызванный ацетилхолином.

4.2. Исследование острой и хронической токсичности, аритмогенного (проаритмического) действия изучаемых веществ

4.2.1. Исследование острой и хронической токсичности изучаемых веществ

Острую токсичность изучают на первом этапе исследований, вычисляют LD_{50} и терапевтическую широту (LD_{50}/ED_{50}). При этом ED_{50} можно взять из результатов исследований, полученных на аконитиновой или хлоридкальциевой модели.

Хроническую токсичность изучают так же, как и для соединений другого типа действия. Длительность введения вещества зависит от того, в какой лекарственной форме предполагается применять препарат.

В связи с тем, что для купирования или профилактики аритмий требуются различные по длительности курсы лечения, а также разные способы введения препаратов (внутри или парентерально в виде одномоментной струйной или длительной капельной инфузии), особое значение для выбора оптимально эффективных доз имеет изучение фармакокинетики.

4.2.2. Исследование проаритмического действия изучаемых соединений

Выраженность проаритмического действия имеет большое значение для оценки нового соединения, предлагаемого в качестве антиаритмического препарата. Проаритмическое действие является одним из самых неприятных побочных явлений антиаритмических средств.

Под проаритмическим действием антиаритмических средств понимают следующее:

I. Ухудшение течения существующих аритмий:

- А. Увеличение числа желудочковых экстрасистол или появление парных желудочковых экстрасистол или коротких эпизодов пароксизмальных желудочковых тахикардий.
- Б. Переход коротких пароксизмов желудочковых тахикардий в более длительные периоды желудочковых тахикардий.
- В. Увеличение частоты длительных периодов желудочковой или наджелудочковой тахикардий.
- Г. Увеличение продолжительности периодов длительной желудочковой или наджелудочковой тахикардий.

- Д. Снижение порога фибрилляции.
- Е. Появление аритмий, которые стало труднее или вообще невозможно купировать.
- II. Появление новых аритмий:
 - А. наджелудочковая тахикардия.
 - Б. Наджелудочковая экстрасистолия.
 - В. Желудочковая экстрасистолия.
 - Г. Полиморфные желудочковые тахикардии.
 - Д. Аритмии типа «пируэт».
 - Е. Развитие фибрилляции желудочков.
- III. Развитие брадиаритмий:
 - А. Появление синусовой брадикардии и остановки синусового ритма или развитие синоатриальной блокады.
 - Б. Развитие атриовентрикулярной блокады.

4.2.2.1. Исследование влияния изучаемых соединений

на продолжительность скорректированного интервала QT (QT_c)

Исследование проводится на бодрствующих морских свинках массой 300–400 г. Животных фиксируют на операционном столе в положении на животе и регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, длительность регистрации 30 с). Затем внутривенно вводят изучаемое соединение и через 30, 60, 90 и 120 мин повторно регистрируют ЭКГ. Анализируют ЭКГ и определяют продолжительность интервалов RR, PQ и QT. Продолжительность интервала RR отражает частоту сердечных сокращений, продолжительность интервала PQ – скорость атриовентрикулярного проведения, а продолжительность интервала QT – продолжительность потенциала действия желудочков. Так как продолжительность интервала QT зависит от частоты сердечных сокращений, определяют независимый от ЧСС скорректированный интервал QT, который рассчитывается по следующей формуле:

$$QT_c = QT \text{ (мс)} / RR \text{ (с)}.$$

Поскольку многие антиаритмические средства обладают способностью «кумулятивно» удлинять интервал QT, в следующей серии экспериментов оценивают влияние изучаемого соединения на продолжительность интервала QT после его 7-дневного внутривенного введения. В этом случае ЭКГ регистрируют до и после окончания 7-дневного введения изучаемого соединения.

В тех случаях, когда изучаемое соединение в остром или хроническом эксперименте удлиняет скорректированный интервал QT более чем на 20–25%, его исключают из дальнейшего исследования.

4.2.2.2. Исследование аритмогенных влияний изучаемых соединений

Исследования проводятся на наркотизированных (уретан 1,0–1,3 г/кг, внутривенно) нелинейных крысах-самцах массой 200–250 г. Животных фиксируют на операционном столе в положении лежа на спине и регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, продолжительность записи 30 с). Затем подбирают минимальную дозу цезия хлорида, которая вызывает злокачественные нарушения ритма сердца. В следующей серии экспериментов внутривенно вводят изучаемое соединение и через 5–10 мин подобранную дозу цезия хлорида. В том случае, если на фоне изучаемого соединения количество злокачественных нарушений ритма сердца увеличивается и/или пороговая доза цезия хлорида сдвигается влево (уменьшается), то это свидетельствует о наличии у изучаемого соединения аритмогенного действия. Если изучаемое соединение увеличивает количество эпизодов тахикардии типа «пируэт», его исключают из дальнейшего исследования.

4.2.2.3. Исследование триггерной активности изучаемых соединений

Эксперименты проводятся на наркотизированных (α -хлоралоза 90–120 мг/кг внутривенно) кроликах-самцах массой 2,5–3 кг. Животных фиксируют на операционном столе в положении на спине, проводят трахеотомию и переводят на искусственное дыхание кислородно-воздушной смесью в соотношении 1 : 1 (возможно дыхание комнатным воздухом). Катетеризируют бедренную артерию для измерения артериального давления и бедренную вену для введения изучаемых соединений. Затем регистрируют ЭКГ (II стандартное отведение, длительность регистрации 60 с), после чего в течение 15 мин проводят инфузию α -адреностимулятора метоксамина со скоростью 15 мг/кг/мин. По окончании инфузии метоксамина начинают инфузию изучаемого соединения, которую продолжают в течение часа. Оценивают количество эпизодов желудочковой тахикардии и тахикардии типа «пируэт» и сравнивают их количество с аналогичными показателями, полученными для референтных препаратов. В том случае, если количество злокачественных нарушений ритма у изучаемого соединения выше, чем у референтного препарата, его исключают из дальнейшего исследования.

По завершении II этапа исследования, в случае выявления потенциального антиаритмического соединения, превосходящего по своей активности референтные антиаритмические ЛС, определяют возможные показания, дозы и схемы его клинического применения, спектр побочных эффектов и переходят к следующим этапам исследования.

4.2.2.4. Исследование влияния изучаемых соединений

на гипополяризацию кардиомиоцитов, вызванную калия хлоридом [9]

Исследования проводят на нелинейных крысах обоего пола массой 160–200 г. Животных фиксируют под этаминал-натриевым наркозом (35 мг/кг внутривенно) и регистрируют ЭКГ во II стандартном отведении. Животных разделяют на 4 группы. В 1-ю (контрольная; $n = 5$) входят крысы, которым внутривенно вводят физиологический раствор по 0,2 мл в течение 2 с. ЭКГ регистрируют в момент введения раствора и последующие 30 с. Во 2-ю ($n = 10$) — животные, получающие внутривенно 1,5% раствор КСI в ранее установленной минимальной аритмогенной дозе (в среднем 20 мг/кг), в течение 2 с (ЭКГ регистрируют непрерывно до нормализации синусового ритма). Минимальную аритмогенную дозу КСI определяют путем постепенного увеличения объема 1,5% раствора КСI, вводимого в бедренную вену в течение 2 с. Таким образом, эмпирически подбирают дозу, при которой нарушения ритма и проводимости регистрируются в течение 3–10 с. Интервал между повторными внутривенными инъекциями КСI должен быть не менее 15 мин.

Введение физиологического раствора животным 1-й группы не изменяет ЭКГ. У крыс 2-й группы после введения КСI на ЭКГ регистрируются атриовентрикулярные и внутрижелудочковые блокады разных степеней, а также экстрасистолическая аритмия сердца. Продолжительность нарушений ритма обычно не превышает 10 с.

Крысам 3-й группы ($n = 10$) внутривенно вводят изучаемое вещество в оптимальных антиаритмических концентрациях и дозах, а через 5 мин — 1,5% раствор КСI в дозе 20 мг/кг. ЭКГ регистрируют до нормализации синусового ритма.

Крысам 4-й группы ($n = 10$) за 5 мин до введения КСI проводят инфузию референтного препарата — новокаинамида (1% раствор 20 мг/кг) или амиодарона (0,5 раствор 10 мг/кг). Новокаинамид через 3–4 мин после введения КСI вызывает на ЭКГ внутрижелудочковые и атриовентрикулярные блокады, кардиоплегию (полную атриовентрикулярную блокаду), которая продолжается 1–3 мин [9]. Затем появляются редкие желудочковые комплексы идиовентрикулярного ритма. В течение 2,0–2,5 мин частота сердечного ритма у большинства крыс (6 из 10) повышается, и идиовентрикулярный ритм трансформируется в регулярную синусовую брадикардию. У части животных (3) идиовентрикулярный ритм прогрессивно замедляется, дыхание прекращается, и животные погибают. При использовании амиодарона наблюдаются такие же изменения ЭКГ. Летальность отмечена в единичных случаях (у 1 крысы).

При анализе изменений ЭКГ авторы метода выделяют 4 степени гипополяризации плазматических мембран кардиомиоцитов: к I степени отнесены случаи, при которых после внутривенного введения минимальной дозы KCl в течение 2 с у животных регистрируется замедление атриовентрикулярной и внутрижелудочковой проводимости без аритмий сердца, ко II – те же изменения и появление эктопических нарушений ритма сердца, к III – кратковременную кардиоплегию, при которой развивается полная атриовентрикулярная блокада при сохранении зубцов P и отсутствии желудочковых комплексов (после возобновления комплекса QRS у части животных появляется эктопическая пейсмекерная активность, что на ЭКГ проявляется единичными или групповыми экстрасистолами; продолжительность кардиоплегии у разных крыс может колебаться в пределах от 1 с до 2–3 мин), к IV - остановку сердца и гибель животных.

Статистическую обработку количественных показателей проводят по методу вариационной статистики с использованием t-критерия Стьюдента.

Полученные результаты заносят в таблицу. В качестве примера см. таблицу 2, отражающую влияние KCl, новокаинамида и амиодарона на K⁺-индуцируемые аритмии сердца у крыс.

Прижизненная регистрация гипополяризационных аритмий сердца без вскрытия грудной клетки позволяет исследовать аритмогенные эффекты антиаритмических веществ, в том числе не входящих в классификацию Vaughan Williams, например гликозидных кардиотоников, которые в силу особенностей механизма своего антиаритмического действия не могут быть отнесены к какому-либо из 4 классов антиаритмиков, а также изучать патогенез внезапной смерти при использовании блокаторов Na⁺-каналов.

Представленный метод определения гипополяризации мембран, степени ее выраженности и регистрации гипополяризационных аритмий сердца отличается предельной простотой и легко применим в лабораториях экспериментальной фармакологии и кардиологии. Однако для получения воспроизводимых результатов исследования необходимы точная дозировка раствора KCl и расчет скорости его внутривенного введения (по секундомеру).

Таблица 2

Влияние KCl, новокаинамида (1% раствор 20 мг/кг, внутривенно) и амиодарона (0,5% раствор 10 мг/кг, внутривенно) на K⁺-индуцированные нарушения ритма сердца у крыс

Группа	Атриовентрикулярная блокада				Внутрижелудочковая блокада		Желудочковая экстрасистолия		Кардиоплегия		Выживаемость	
	I–II степени		III степени		абс.	%	абс.	%	абс.	%	абс.	%
	абс.	%	абс.	%								
1-я	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	5	100
2-я	10	100	2	20	10	100	3	30 ± 6	1	10 ± 2	10	100
3-я	10	100	10	100**	10	100	7	70 ± 8	10	100**	7	70 ± 3*
4-я	4	40 ± 7**	7	70 ± 9**	10	100	8	80 ± 9*	8	90 ± 9**	9	70 ± 9

Примечание. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ по сравнению со 2-й группой.

5. Исследование фармакокинетики, биодоступности изучаемых антиаритмических лекарственных средств и сопоставление их фармакодинамики и фармакокинетики

Для сопоставления фармакодинамики и фармакокинетики антиаритмических препаратов обычно используют модель желудочковой аритмии на собаках, полученную с

помощью метода Hargis. У собак берут пробы крови до введения препарата и после его введения. Промежутки времени забора крови определяют в каждом отдельном случае в соответствии с длительностью действия препарата.

В большинстве исследований для изучения фармакокинетики используют метод ВЭЖХ. Важную роль в фармакокинетике препарата играют возможные активные метаболиты, которые могут брать на себя долю антиаритмического действия. Расчет показателей фармакокинетики и биодоступности не отличается от расчета показателей при изучении препаратов других типов действия. Очень важным для любого препарата является его биодоступность.

Заключение

Рекомендованный комплекс методов позволит выявить соединения, которые по спектру и характеру своего действия могут быть предложены для КИ в качестве антиаритмических средств.

Вместе с тем не следует забывать, что в ходе клинического изучения нового препарата может возникнуть необходимость проведения дополнительных экспериментальных исследований, направленных на более детальное изучение механизмов действия, имеющее большое значение для оптимизации клинического применения каждого из предложенных средств.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Адрианов О.С., Меринг Т.А. Атлас мозга собаки. — М.: Медгиз, 1959. — 236 с.
2. Буряк М.А. Влияние ингибиторов моноаминоксидазы на аритмии сердца и нарушения коронарного кровообращения, вызванные раздражением структур гипоталамуса и понто-медуллярного отдела ствола мозга // В кн.: 27 науч. сессия института по вопросам экспериментальной и клинической кардиологии. — Курск, 1968. — С. 26–30.
3. Буряк М.А. Влияние холинолитиков и анаприлина на аритмии сердца и нарушения коронарного кровообращения, вызванные стимуляцией гипоталамуса у собак с перенесенным инфарктом миокарда // В кн.: Фармакологическая коррекция кровоснабжения, метаболизма и жизнеспособности ишемизированного миокарда. — Воронеж, 1977. — С. 44–48.
4. Вислобоков А.И. Мембранотропное действие фармакологических средств / А.И. Вислобоков, Ю.Д. Игнатов, П.А. Галенко-Ярошевский, П.Д. Шабанов — СПб.; Краснодар: Просвещение-Юг, 2010. — 528 с.
5. Галенко-Ярошевский П.А. Методы поиска и доклинического исследования специфической активности потенциальных сердечно-сосудистых средств / П.А. Галенко-Ярошевский, В.В. Гацура. — Краснодар: Просвещение-Юг, 2005. — 249 с.
6. Каверина Н. В. Методические указания по изучению антиаритмической активности фармакологических веществ / Н.В. Каверина, Ю.С. Бердяев, Е.П. Кищук, О.Е. Пасхина: руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — М., 2005. — С. 421–437.
7. Камкин А. Г. Физиология и молекулярная биология мембран клеток / А.Г. Камкин, И.С. Киселева // М.: Академия. — 2008, 586 с.
8. Камкин А. Г. Физиология: руководство к экспериментальным работам / А.Г. Камкин, И.С. Киселева. — М.: Гэотар-Мед, 2011. — 384 с.
9. Мороз В.В. Моделирование гипополяризационных аритмий сердца и определение степени гипополяризации мембран кардиомиоцитов у экспериментальных животных / В.В. Мороз, Т.Н. Липницкий // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2006. — Т. 142. — № 12. — С. 704–706.
10. Резник А.В. Ионные каналы и токи в кардиомиоцитах / А.В. Резник, В.В. Федоров, Л.В. Розенштраух // Кардиология. — 2006. — № 2. — С. 4–18.

11. Розенштраух Л.В. Сравнение интенсивности действия этмозина и его диэтилового аналога на эктопические очаги возбуждения в поздней стадии экспериментального инфаркта миокарда / Розенштраух Л.В., Ануховский В.П., Белошапко Г.Г. и др. // Кардиология. — 1981. — Т. 21. — № 10. — С. 75–79.
12. Сутягин П. В. Основные закономерности взаиморасположения разных типов клеток-водителей ритма в синусно-предсердном узле сердца крыс / П.В. Сутягин, А.Г. Камкин, О.Ю. Гурина // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2009. — Т. 148. — № 9. — С. 343–346.
13. Фифков Е., Маршал Дж. Стереотаксические атласы мозга колки, кролика и крысы // В кн.: Электрофизиологические методы исследования. — М., 1962. — С. 384–426.
14. Шейх-Заде Ю. Р. Фибрилляция предсердий: новое объяснение старого явления / Ю.Р. Шейх-Заде, П.А. Галенко-Ярошевский, И.Л. Чередник // Бюл. эксперим. биологии и медицины. — 2002. — Т. 134. — № 7. — С. 4–8.
15. Alles G.F. Comparative actions of certain compounds like alpha-fagorine / G.F. Alles, C.H. Ellis // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1948. — Vol. 94. — P. 416–425.
16. Chidlow G, Melena J, Osborne N. Betaxolol, a beta(1)-adrenoceptor antagonist, reduces Na⁺ influx into cortical synaptosomes by direct interaction with Na⁺ channels: comparison with other beta-adrenoceptor antagonists. // Br J Pharmacol., 2000 Jun; 130 (4): 759–66.
17. Ciranna L. Serotonin as a modulator of glutamate- and GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. // Curr Neuropharmacol., 2006 Apr; 4 (2): 101–14.
18. Dunkley P.R., Jarvie P.E., Robinson P.J. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. // Nat Protoc. 2008; 3 (11): 1718–28.
19. Dunlop J. Ion channel screening / J. Dunlop [et al.] // Comb. Chem. High Throughput Screen. — 2008. — V. 11. - № 7. — P. 514–522.
20. Engblom A.C., Akerman K.E. Determination of the intracellular free chloride concentration in rat brain synaptoneuroosomes using a chloride-sensitive fluorescent indicator. // Biochim Biophys Acta, 1993 Dec 12; 1153 (2): 262–6.
21. Galván E, Sitges M. Characterization of the participation of sodium channels on the rise in Na⁺ induced by 4-aminopyridine (4-AP) in synaptosomes. // Neurochem Res., 2004 Feb; 29 (2): 347–55.
22. Gerard R.W. Electrical activity of the cat's brain / R.W.Gerard [et al.] // Arch. Neurol. Psychiat. — 1936. — Vol. 36. — № 4. — P. 675–738.
23. Griffin H.D., Hawthorne J.N. Calcium-activated hydrolysis of phosphatidyl-myo-inositol 4-phosphate and phosphatidyl-myo-inositol 4,5-bisphosphate in guinea-pig synaptosomes. // Biochem J., 1978 Nov 15; 176 (2): 541–52.
24. Harris A.S Delayed development of ventricular ectopic rhythms following experimental coronary occlusion // Circulation. — 1950. — Vol. 1, № 6. — P. 1318.
25. Harrison D. C. Antiarrhythmic drug classification: new science and practical applications // Am. J. Cardiology, 1985. — V.50. — P. 185–187.
26. Jasper H. A stereotaxic atlas of the diencephalon of the cat / H. Jasper, C. Ajmole-Marsan — Ottawa, — 1954. — 324 p.
27. Johnson B. E. Pressure-polishing pipettes for improves patch-clamp recording / B.E. Johnson, A.L. Brown, M.B. Goodman // J. Vis. Exp., 2008. — V. 20. — P. 964.
28. Kalia L.V., Kalia S.K., Salter M.W. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. // Lancet Neurol., 2008 Aug; 7(8): 742–55.
29. Kauffmann A. J. Prevention of ventricular fibrillation induced by coronary artery ligation / A.J. Kauffmann, P. Aramendia // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1968. — V. 164. — № 2. — P. 326–332.
30. Lodge D. The history of the pharmacology and cloning of ionotropic glutamate receptors and the development of idiosyncratic nomenclature // Neuropharmacology, 2009 Jan; 56(1): 6–21.
31. Minta A., Kao J.P.Y., Tsien R.Y. // J. Biol. Chem., 1989. — Vol. 264. — P. 8171–8178.
32. Monassier L. s₁-Receptor ligand-mediated inhibition of inwardly rectifying K⁺ channels in the heart / L. Monassier [et al.] // J. Pharmacol. Exp. Therap. — 2007. — V. 322. — № 1. — P. 341–350.
33. Moulton P.R. Neuronal glutamate and GABA receptor function in health and disease // Biochem. Soc. Trans., 2009 Dec; 37(Pt 6): 1317–22.
34. Ohno Y. New insight into the therapeutic role of 5-HT1A receptors in central nervous system disorders // Cent. Nerv. Syst. Agents. Med. Chem., 2010 Jun 1; 10 (2): 148–57.

35. Pankratov Y, Lalo U, Krishtal O.A., Verkhatsky A. P₂X receptors and synaptic plasticity // *Neuroscience*, 2009 Jan 12; 158 (1): 137–48.
36. Rosenblueth A. Studies of flutter and of fibrillation. The influence of artificial obstacles on experimental auricular flutter / A. Rosenblueth, G. Ramos // *A. M. Heart. J.* — 1947. — Vol. 33, № 5. — P. 677–682.
37. Smith T.L. Regulation of intrasynaptosomal free calcium concentrations: studies with the fluorescent indicator, fluo-3. // *Neurochem. Int.*, 1990; 16 (1): 89–94.
38. Tominaga A. Activation and regulation of nociceptive transient receptor potential (TRP) channels, TRPV1 and TRPA1 // *Yakugaku Zasshi.* — 2010. — V. 130. — № 3. — P. 289–294.
39. Vaughan Williams E. M. *Pharmacology of Antiarrhythmic Agents* ed. L.Szekeres. — Oxford, 1981. — P. 125–150.
40. Witchel H.J. Emerging trends in ion channel-based assays for predicting the cardiac safety of drugs // *Drugs.* — 2010. — V. 13. — № 2. — P. 90–96.

ГЛАВА 24

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВОИШЕМИЧЕСКОГО (АНТИАНГИНАЛЬНОГО) ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: д. м. н., проф. Г.Г. Чичканов; д. б. н. И.Б. Цорин

Введение

На протяжении длительного времени исследователи, занимающиеся созданием новых средств для лечения больных ишемической болезнью сердца (ИБС), обращали основное внимание на поиск веществ, способных устранять или предупреждать приступы стенокардии. Однако ИБС, которая возникает вследствие несоответствия между потребностью миокарда в кислороде и возможностями кровоснабжения (следовательно, и снабжения кислородом) его отдельных областей, не обязательно сопровождается приступами стенокардии, а может проявляться в виде безболевых («немых») эпизодов ишемии миокарда. Такие эпизоды по данным суточного мониторирования наблюдаются более чем у половины больных с типичной стенокардией напряжения. При этом они имеют место чаще у больных с поражениями нескольких ветвей коронарной артерии. По данным клиницистов у больных с подтвержденным диагнозом ИБС из всех регистрируемых у них эпизодов ишемии миокарда в течение суток около 3/4 могут носить безболевой характер, а у 4–5% больных ИБС заболевание может вообще протекать бессимптомно [11].

Вот почему для лечения больных ИБС необходимы не только и даже не столько вещества с антиангинальными свойствами, т.е. купирующие болевой приступ, сколько препараты, улучшающие функциональное состояние самого очага ишемии сердечной мышцы, т.е. обладающие выраженным противоишемическим действием.

Перед специалистами, занимающимися поиском такого рода средств, стоят большие трудности. В самом деле на современном этапе наших знаний о патогенезе ИБС, клинике и терапии этого заболевания, учитывая разнообразие форм ИБС, стадии ее развития, речь не может идти о создании какого-либо одного «идеального» антиангинального препарата. И если еще в 70-х–начале 80-х годов прошлого века пытались найти идеальное вещество типа амидарона (кордарона), которое было бы способно уменьшать потребление сердцем кислорода, значительно увеличивать коронарный кровоток и при этом не угнетать функцию сердца, обладать антиадренергическим действием [19], то позднее от таких попыток отказались. Сегодня в клинике ИБС находят применение вещества с самым разнообразным механизмом действия.

Выделяют 3 основных группы противоишемических (антиангинальных) средств: органические нитраты, β -адреноблокаторы, антагонисты кальция. Каждая из названных групп неоднородна и ее можно разделить на подгруппы, имеющие особенности в механизме антиангинального (противоишемического) действия. Помимо этих основных групп, важное место в терапии больных ИБС могут занимать вещества с иными фармакологическими свойствами, в частности, активаторы K^+ АТФ-чувствительных каналов, антигипоксанты, антиоксиданты, ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента, препараты, влияющие на равновесие в системе простаглицлин-тромбоксан, блокаторы I_f -каналов, ингибиторы Na^+/H^+ обмена и др. Обладая различными механизмами действия все эти

препараты приводят в соответствие потребность сердца в кислороде и его доставку или за счет улучшения коронарного кровообращения, или воздействуя на метаболизм миокарда, уменьшая его потребность в кислороде, или действуя на то и другое.

В связи со сказанным становится очевидным, что поиск новых веществ с противоишемическими (антиангинальными) свойствами уже на ранних стадиях следует проводить, учитывая возможные механизмы их действия

Таким образом, целью исследования является поиск, изучение специфической активности и механизмов действия фармакологических веществ, защищающих миокард от ишемического повреждения (замедляющих переход обратимых изменений в необратимые).

Современную программу поиска и доклинического изучения такого рода средств можно представить следующим образом.

1. Первичная оценка фармакологического вещества

Прежде всего, на этом этапе необходимо определить острую токсичность изучаемых веществ, так как интерес могут представлять только те вещества, у которых эффективные дозы не превышают $0,1 \text{ LD}_{50}$. С этой целью на мышах или крысах, используя один из общепринятых методов, изучают острую токсичность веществ, рассчитывают LD_{16} , LD_{50} и LD_{84} (см.: Методические рекомендации по изучению общетоксического действия ЛС).

Уже на этом этапе можно выявить способность веществ оказывать вазодилатирующее (коронарорасширяющее) действие и/или влиять на энергетический метаболизм миокарда, уменьшая его потребность в кислороде. Однако на сегодняшний день не существует какого-либо одного простого, легко воспроизводимого метода, который бы дал определенный ответ на вопрос о перспективности вещества в качестве противоишемического (антиангинального) средства. Как ни привлекательно было бы упростить систему первичного отбора такого рода средств, сделать это не представляется возможным. По сути дела, на сегодня при первичной оценке вещества остается незаменимым общепринятый метод регистрации коронарного кровотока на целом животном (кошки, собаки) по оттоку крови из коронарного синуса, который дает наиболее полный ответ на вопрос о влиянии препарата на такие важные показатели состояния ССС, как артериальное давление, тонус коронарных артерий, величину тотального коронарного кровотока и поглощения сердцем кислорода (которое прямопропорционально произведению артерио-венозной разницы оксигемоглобина или напряжения кислорода и коронарного кровотока), т.е. именно те показатели, которые и определяют соответствие потребности сердца в кислороде и его доставки.

Перспективным будет считаться вещество, которое увеличивает содержание оксигемоглобина (напряжение кислорода) в крови коронарного синуса. При этом объемная скорость коронарного кровотока может, как увеличиваться, так и уменьшаться. Важно, чтобы при увеличении коронарного кровотока поглощение сердцем кислорода уменьшалось или не изменялось. Оно может также увеличиваться, но в значительно меньшей степени, чем увеличивается при этом коронарный кровоток. При уменьшении коронарного кровотока под влиянием исследуемого вещества, поглощение сердцем кислорода должно уменьшаться в значительно большей степени, чем коронарный кровоток [6].

Эксперименты проводят на наркотизированных (этаминал-натрий 40 мг/кг или уретан+хлоралоза 600+40 мг/кг) кошках массой тела 2,5–4 кг в условиях открытой грудной клетки и искусственного дыхания. Венечный синус катеризируют и шунтируют с яремной веной, пропуская кровь через специальную капельницу. Объемную скорость оттока крови из коронарного синуса регистрируют с помощью интервалографа. Системное артериальное давление регистрируют электроманометром в сонной или бедренной артерии. Для предотвращения свертывания крови животным вводят гепарин в дозе 1000 ЕД/кг. При регистрации оттока крови из коронарного синуса измеряют содержание оксигемоглобина в коронарной венозной крови. Для этого может быть применен фотоэлектрический метод с использованием оксигемографа. Кровь, оттекающая из коронарного синуса, прежде, чем пройти через капельницу интервалографа, проходит через кювету оксигемографа.

Используя процентное содержание оксигемоглобина в коронарной венозной крови, рассчитывают количество O_2 , поглощаемого сердцем по следующей формуле:

$$A = 0,0134 (C_1 - C_2) \times V \times H,$$

где A — количество O_2 в мл/мин, C_1 — содержание оксигемоглобина в артериальной крови, в % (в среднем (95%), C_2 — содержание оксигемоглобина в крови, оттекающей из коронарного синуса, в %, V — объемная скорость оттока крови из коронарного синуса, в мл/мин, H — количество оксигемоглобина в 1 мл крови, в граммах, определяемое любым из общепринятых методов.

Среднее АД рассчитывают по Карпману [7]: $AD_{\text{ср}} = AD_{\text{диаст.}} + 0,43 \times (AD_{\text{сист.}} - AD_{\text{диаст.}})$.

Вместо определения содержания оксигемоглобина можно измерять напряжения кислорода в артериальной и коронарной венозной крови полярографическим методом с помощью электрода Кларка.

В случае невозможности использования вышеописанного метода может быть проведено исследование влияния веществ на двойное произведение (систолическое АД \times ЧСС), которое является косвенным показателем потребности миокарда в кислороде [38]. Перспективное противоишемическое средство должно уменьшать этот показатель. Для его измерения проводят эксперименты на наркотизированных (уретан 1000–1300 мг/кг или этаминал-натрий 60 мг/кг, в/б) крысах массой 250–300 г. Регистрируют ЭКГ во II стандартном отведении (любой электрокардиограф с разверткой не менее 100 мм/сек и усилением не менее 20 мм/мВ), АД измеряют в сонной или бедренной артерии электроманометром. Рассчитывают частоту сокращений сердца, среднее АД, двойное произведение.

Исследуемые вещества вводят внутривенно или внутрибрюшинно. Наблюдения проводят в течение 30–60 мин. В ходе экспериментов отбирают 2–3 наиболее активных вещества, для которых определяют диапазон эффективных доз.

Полученные данные обрабатывают статистически. Нормальность распределения проверяют с помощью критерия Шапиро-Уилкса. Если распределение нормальное и дисперсии выборок приблизительно равны (проверка при помощи распределения Фишера), то дальнейшую обработку проводят с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений и одного из методов множественных сравнений (Стьюдента с поправкой Бонферони, Даннета и др.). В том случае, если отклонения от условий применения дисперсионного анализа велики, следует использовать непараметрический дисперсионный анализ по Фридману с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету или с помощью ранговых сумм Фридмана [15, 4].

Для дальнейших исследований подбирается препарат сравнения, в качестве которого используется ЛС, обладающее антиангинальными (противоишемическими) свойствами и имеющее механизм действия, близкий к тому, который предполагается у изучаемого ряда веществ.

Отбор противоишемических (антиангинальных) средств на «более простых» моделях (изолированные сосуды сердца, изолированные перфузируемые сердца различных видов животных) по трудоемкости, прогнозируемости, точности оценки, стоимости работы не может в полной мере заменить вышеназванные методы исследования.

2. Изучение противоишемического действия отобранного вещества на различных моделях острой и хронической ишемии миокарда

2.1. Модель острой ишемии миокарда, вызванной временной полной окклюзией передней нисходящей ветви левой коронарной артерии в течение 5 минут с последующей реперфузией

Исследования проводят на наркотизированных (этаминал-натрий 40 мг/кг, в/в) кошках или собаках в условиях открытой грудной клетки и искусственного дыхания. Груд-

ную клетку вскрывают в 4–5 межреберье слева. После рассечения перикарда выделяют небольшой (1,0–1,5 мм) участок передней нисходящей ветви левой коронарной артерии или ее веточки, на который помещают специальный зажим, позволяющий атравматично и полностью закрывать просвет артерии. В зоне ишемии помещают 3–4 эпикардиальных электродов. Окклюзия венечного сосуда в течение 5 мин сопровождается выраженным подъемом сегмента ST на эпикардиальной электрограмме, для регистрации которой можно использовать любой многоканальный электрокардиограф. Реперфузия приводит к быстрому и полному восстановлению электрограммы. Как показали исследования, 2-я-6-я окклюзии коронарной артерии (с интервалами между окклюзиями в 15 мин, когда проводится реперфузия), как правило, приводят к стабильному по величине подъему сегмента ST на эпикардиальной электрограмме. Поэтому в каждом эксперименте проводят 3-кратную пятиминутную контрольную окклюзию венечного сосуда. Реперфузия после каждой окклюзии продолжается 15 мин.

Препараты вводят внутривенно или внутривентриально. Окклюзии венечного сосуда проводят через 5, 25, 45 и 65 мин после введения препарата.

О противоишемическом действии фармакологического вещества судят по снижению средней величины подъема сегмента ST на множественных отведениях эпикардиальной электрограммы. Вещество с возможным противоишемическим (антиангинальным) действием будет снижать среднюю величину подъема сегмента ST на электрограмме [18, 37]. Оценку противоишемического действия можно также проводить, регистрируя региональную сократительную функцию миокарда во время окклюзии и реперфузии коронарной артерии, с помощью тензорезисторов или ультразвуковых кристаллов [24, 27]. Вещество с противоишемическим действием будет уменьшать угнетение сократимости, вызываемое ишемией, и/или улучшать ее восстановление во время реперфузии. В этих же экспериментах можно изучать влияние веществ на увеличение содержания лактата в крови коронарного синуса, вызываемое ишемией [37]. Пробы крови (1,5–2) мл забирают из коронарного синуса через катетер до и в конце 5 минуты окклюзии, депротеинизируют, содержание лактата определяют ферментативным (лактатдегидрогеназным) методом [10]. Рассчитывают прирост лактата за время окклюзии. Пробы после депротеинизации можно хранить при –20 С.

Полученные данные обрабатывают статистически. Значимость различий определяют при помощи непараметрического дисперсионного анализа по Фридману с последующей обработкой с помощью критерия Даннета или с использованием множественных сравнений с помощью ранговых сумм Фридмана. Для обработки данных по приросту содержания лактата в коронарной венозной крови при соблюдении необходимых условий может быть применен обычный дисперсионный анализ для повторных измерений с дальнейшим использованием методов множественных сравнений (Стьюдента с поправкой Бонферони, Даннета, Дункана и др.) [4, 15, 9].

2.2. Модель острой ишемии миокарда, вызванной стенозом передней нисходящей ветви левой коронарной артерии и навязыванием сердцу высокого искусственного ритма

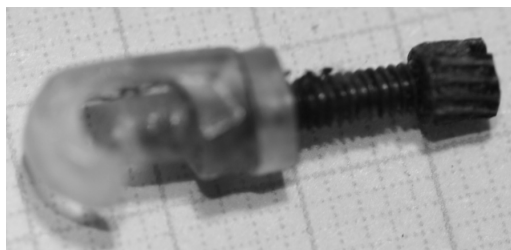


Рис.1. Винтовой зажим для создания стеноза коронарных артерий у собак

Исследования проводятся на наркотизированных (этаминал-натрий, 40 мг/кг, в/в) собаках массой 10–20 кг в условиях искусственного дыхания. Грудную клетку вскрывают в 4–5-м межреберье слева. Выделяют участок передней нисходящей ветви левой коронарной артерии, на который помещают специальный миниатюрный винтовой зажим, дающий возможность дозированно уменьшать просвет артерии (рис.1). Навязывание искусственного ритма

проводят с помощью электрической стимуляции правого ушка сердца (параметры: 1 мсек, 1–4 в). Эксперименты проводятся так, что очаг ишемии в сердце возникает при обязательном наличии двух факторов: определенной степени сужения просвета нисходящей ветви левой коронарной артерии и навязывания сердцу высокого искусственного ритма, превышающего фонный на 70–90 ударов. Отдельно каждый из названных факторов не приводит к возникновению ишемии. При стимуляции в течение 3–5 мин в миокарде образуется очаг ишемии, который регистрируется в нескольких отведениях эпикардиальной электрограммы в виде подъема сегмента ST. Одновременно возникает угнетение региональной (локальной) сократительной функции. Прекращение стимуляции нормализует электрограмму и региональную функцию миокарда. В этих же исследованиях можно брать образцы коронарной венозной крови для определения в них метаболитов (лактат, пируват, глюкоза).

Вещества вводят внутривенно или внутривентально. Интервалы между эпизодами ишемии составляют 15 мин. Ишемию вызывают трижды до введения препарата и через 5, 25, 45 и более мин после введения.

Вещество, обладающее противоишемическим действием, будет значительно уменьшать или даже полностью предупреждать подъем сегмента ST и/или угнетение региональной сократительной функции во время стимуляции сердца и нормализовать измененные показатели метаболизма.

Статистическую обработку данных при наличии необходимых условий проводят с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений, в случае невозможности его применения — с помощью непараметрического дисперсионного анализа по Фридману, с дальнейшим использованием описанных выше методов множественных сравнений. [15, 4, 9].

2.3. Модель на наркотизированных собаках, у которых одновременно со стенозом передней нисходящей ветви левой коронарной артерии воспроизводят окклюзию огибающей ветви левой коронарной артерии

Для изучения действия препаратов в условиях более тяжелой ишемии может быть использована модель на наркотизированных собаках, у которых одновременно со стенозом передней нисходящей ветви левой коронарной артерии воспроизводят окклюзию огибающей ветви левой коронарной артерии и в условиях навязывания высокого ритма сокращений сердца регистрируют эпикардиальную электрограмму и/или региональную сократительную функцию миокарда в бассейне, снабжаемом передней нисходящей ветвью левой коронарной артерии [41, 42]. Обработка и интерпретация результатов проводится так же, как при проведении исследований на предыдущей модели.

2.4. Модель на бодрствующих собаках или свиньях со стенозом коронарной артерии, у которых приступ ишемии вызван с помощью бега животных на третбане

Модификацией предыдущей модели являются эксперименты на бодрствующих собаках или свиньях со стенозом коронарной артерии, у которых приступ ишемии вызывают с помощью бега животных на третбане. О противоишемическом действии веществ судят по снижению подъема сегмента ST на ЭКГ и предотвращению угнетения региональной сократительной функции [28, 29, 30, 43]. Обработка и интерпретация результатов проводится так же, как описано для предыдущих моделей.

2.5. Модель на наркотизированных животных, у которых в условиях искусственного дыхания и открытой грудной клетки воспроизводят длительную окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии с последующей реперфузией

Одним из показателей успеха терапии больных ИБС служит поддержание на адекватном уровне показателей гемодинамики и деятельности сердца. В связи с этим значительный ин-

терес представляет модель на наркотизированных животных (кошки, собаки), у которых в условиях искусственного дыхания и открытой грудной клетки воспроизводят (как описано в модели 1) длительную (20–40 мин) окклюзию передней нисходящей ветви левой коронарной артерии с последующей реперфузией (30 – 60 мин). Противоишемическое действие вещества оценивают по поддержанию показателей гемодинамики и деятельности сердца в сравнении с контрольной серией экспериментов. Оценку гемодинамики и деятельности сердца осуществляют с помощью электромагнитного или ультразвукового измерителя потока крови, регистрируя фазовую кривую скорости кровотока в восходящей части дуги аорты. Рассчитывают следующие показатели: частоту сердечных сокращений, систолический и сердечный выбросы, среднее ускорение кровотока в аорте, по которому судят о сократительной функции сердца. Расчет показателей проводят следующим образом.

Измеряют время сердечного цикла ($T_{\text{цикла}}$) в сек., продолжительность систолы ($T_{\text{сист.}}$) и диастолы ($T_{\text{диаст.}}$) в сек., максимальный (пиковый) кровоток (ПК) в мл/мин, время нарастания пикового кровотока ($T_{\text{ПК}}$) в секундах. Рассчитывают показатели гемодинамики и деятельности сердца по следующим формулам:

$$\text{ЧСС} = 60/T_{\text{цикла}}$$

$$\text{Ударный (систолический) объем (УО)} = (\text{ПК}/60) \times T_{\text{сист.}} \times 0,64.$$

$$\text{Минутный объем крови (сердечный выброс)} = \text{УО} \times \text{ЧСС}.$$

Среднее ускорение кровотока в аорте = $\text{ПК}/60/S_{\text{аорты}}/T_{\text{ПК}}$,
 где $S_{\text{аорты}}$ — площадь внутреннего сечения аорты; $S_{\text{аорты}} = \pi \times (D - 0,08 \times D)^2/4$, где D — внутренний диаметр датчика, в см.

Артериальное давление измеряют в сонной или бедренной артериях с помощью электроманометра. Среднее давление рассчитывают по описанной выше формуле. В этих же исследованиях подсчитывают количество животных, у которых возникали аритмии. В конце периода реперфузии берут пробы ишемизированного и условно-интактного миокарда для изучения влияния вещества на истощение макроэргических фосфатов в очаге ишемии. С этой целью сердце останавливают холодным гипертоническим 3М раствором КСI, разделяют ишемизированную и условно-интактные зоны левого желудочка, пробы замораживают и хранят в жидком азоте. Содержание АТФ в миокарде определяют одним из общепринятых методов, например гексокиназным. Проводят как минимум две серии экспериментов (контроль и исследуемые серии в соответствии с количеством изучаемых веществ и доз) по 10–12 животных в каждой. Вещества вводят внутривенно струйно или капельно, внутрибрюшинно, внутримышечно. В контрольной серии вводят эквивалентный объем изотонического раствора натрия хлорида.

Статистическую обработку проводят следующим образом. По временным точкам рассчитывают уменьшение показателей гемодинамики и деятельности сердца по отношению к исходному уровню. Если проводится сравнение контрольной и 1 получающей ЛС группы, значимость различий по временным точкам определяют с помощью критерия Стьюдента для независимых выборок (при соблюдении необходимых условий) или критерия Манна-Уитни. В случае сравнения более 2 выборок используют одномерный дисперсионный анализ и методы множественных сравнений (критерии Стьюдента с поправкой Бонферони, Даннета и др.). Если классический дисперсионный анализ не может быть применен, используют непараметрический дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису с дальнейшим использованием критерия множественных сравнений по Данну. Для выявления статистической значимости истощения АТФ в ишемизированном миокарде по сравнению с условно-интактным используют критерий Стьюдента для зависимых выборок или критерий Уилкоксона для этих же выборок. Для выявления различий между группами в содержании АТФ используют те же статистические методы, что при обработке гемодинамических показателей. Статистическую обработку данных о количестве аритмий проводят с помощью метода точной вероятности Фишера, при этом, если количество групп более 2, полученные вероятности умножают на количество сравнений [4, 9].

2.6. Модель на наркотизированных животных, у которых в условиях искусственного дыхания и открытой грудной клетки в течение 60-минутной окклюзии передней нисходящей ветви левой коронарной артерии через определенные промежутки времени берут пробы крови из венечного синуса или из вены, непосредственно дренирующей очаг ишемии

Хорошо известно, что ишемия вызывает значительное увеличение соотношения лактат/пируват в коронарной венозной крови, при этом в течение 1-го часа этот процесс имеет линейный характер. В связи с этим для оценки противоишемического действия может быть использована модель на наркотизированных животных (кошки, собаки), у которых в условиях искусственного дыхания и открытой грудной клетки в течение 60-минутной окклюзии передней нисходящей ветви левой коронарной артерии через определенные промежутки времени (до окклюзии, через 10, 20, 30, 45 и 60 мин после нее) берут пробы крови из венечного синуса или из вены, непосредственно дренирующей очаг ишемии. Для предотвращения свертывания крови животным внутривенно вводят гепарин в дозе 1000 ЕД/кг. В крови, как правило, энзиматическим методом, определяют лактат и пируват и вычисляют их соотношение. Пробы после депротеинизации можно хранить в холодильнике при -20 C .

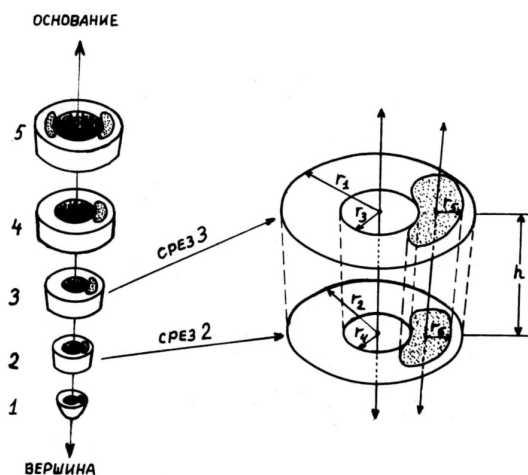
Проводят не менее 2 серий экспериментов (контроль и исследуемые серии в соответствии с количеством изучаемых веществ и доз) по 6–8 особей в каждой. Животным контрольной серии вводят эквивалентный объем изотонического раствора натрия хлорида.

О противоишемическом действии веществ судят по скорости прироста соотношения лактат/пируват, определяемой с помощью регрессионного анализа. Коэффициент линейной регрессии в случае подтверждения нормальности распределения рассчитывают с помощью метода наименьших квадратов, в противном случае используют непараметрический метод Тейла. Статистическую значимость различий между углами наклона регрессионных прямых определяют с помощью критерия Стьюдента или непараметрического критерия Холлендера [15,4]. Вещество, защищающее миокард от ишемического повреждения, будет уменьшать коэффициент линейной регрессии по сравнению с контрольной серией экспериментов.

2.7. Изучение влияния веществ на размер инфаркта миокарда у различных видов животных в условиях как постоянной, так и временной окклюзии с последующей реперфузией

Широкое распространение для оценки противоишемического действия веществ получили эксперименты по изучению их влияния на размер инфаркта миокарда у различных видов животных (собаки, свиньи, крысы, мыши). Эксперименты проводятся как в условиях постоянной, так и временной окклюзии с последующей реперфузией. Некроз выявляют окрашиванием с помощью трифенилтетразолия хлорида, зону риска — с помощью синьки Эванса (в исследованиях на мышцах зона риска не определяется). Рассчитывают отношения объема некроза к объему миокарда всего левого желудочка и к величине зоны риска. Основным показателем противоишемического действия вещества является уменьшение отношения объема некроза к объему зоны риска по сравнению с контрольной серией экспериментов [3, 26, 39]. В качестве примера более подробно опишем проведение одного из вариантов экспериментов на крысах.

Экспериментальный инфаркт миокарда создают по Selye [40]. У крысы массой 180–200 г, находящейся под легким ингаляционным наркозом (эфир, галотан), регистрируют ЭКГ в 3-х стандартных отведениях (можно использовать любой электрокардиограф с разверткой не менее 100 мм/сек и усилением не менее 20 мм/мВ), в 4–5 межреберье слева вскрывают грудную клетку, сердце выдавливают легким нажатием на грудную клетку, с максимальной быстротой перевязывают левую коронарную артерию в 3–4 мм от ее начала, грудную клетку закрывают, рану зашивают. Для воспроизведения окклюзии коронарной артерии используют атравматические круглые изогнутые



$$(a) V_{\text{миокарда}} = \pi \frac{h}{3} [(r_1^2 + r_1 r_2 + r_2^2) - (r_4^2 + r_3 r_4 + r_4^2)];$$

$$(б) V_{\text{инфаркта}} = \pi \frac{h}{3} (r_5^2 + r_5 r_6 + r_6^2);$$

$$(в) V_{\text{полости}} = \pi \frac{h}{3} (r_3^2 + r_3 r_4 + r_4^2).$$

Рис. 2. Математическая модель и формула Воог и Рейнолдса (1977) для вычисления объемов некротической массы, полости и миокарда левого желудочка сердца: 1, 2, 3, 4, 5 — сегменты левого желудочка сердца (от верхушки до основания); r — радиус основания усеченного конуса; r_1 — базальный радиус сегмента; r_2 — апикальный радиус сегмента; r_3 — базальный радиус полости; r_4 — апикальный радиус полости; r_5 — базальный радиус некротического очага; r_6 — апикальный радиус некротического очага; h — высота сегмента (2 мм); (а) — объем всего миокарда левого желудочка; (б) — объем некротизированного миокарда левого желудочка (объем зоны риска рассчитывается сходным образом); (в) — объем полости левого желудочка

этой модели, миокард левого желудочка, его полость и некротизированный участок, зона риска имеют конусообразную форму. Исходя из этого, рассчитывают объемы миокарда левого желудочка, его полости, зоны риска и некротизированного миокарда, принимая сегменты 2-миллиметровой высоты за усеченные конусы (рис. 2). Радиусы оснований усеченных конусов находят, исходя из площадей сечений, по формуле $r = \sqrt{(S/\pi)}$, где S — площадь сечения. Отдельные объемы усеченных конусов суммируют. Размер инфаркта выражают в процентах объема некротической массы к объему зоны риска или объему миокарда всего левого желудочка. Одновременно с указанными параметрами измеряют толщину миокардиальной стенки в условно-интактной зоне. Измерения проводят с помощью специальных программ, предварительно создавая цифровые копии срезов сердец. В случае отсутствия соответствующей техники используют сетку Автандилова, окуляр микрометр, метод взвешивания бумажных копий срезов.

Рассчитывают относительную массу сердец (масса сердца \times 100/масса тела).

При обработке ЭКГ особое внимание обращают на глубину зубца Q и наличие комплекса QS.

Проводят не менее 3 серий экспериментов (ложно-оперированные животные, контроль с инфарктом миокарда, группы животных с инфарктом миокарда, получающих изучаемые

иглы длиной 15–17 мм с лавсановой нитью 3/0. Рану обрабатывают спиртовым р-ром йода. Крыс подвергают эвтаназии через 72 ч после операции. Животных наркотируют уретаном (1000–1300 мг/кг, в/б). Записывают ЭКГ. Перед забором сердец в яремную вену вводят 2 мл 2% раствора синьки Эванса (можно метиленовый синий), нагретого до $+37^\circ\text{C}$. После того, как введен 1 мл красителя, в/а вводят 3М р-р KCl, продолжая вводить краситель. Сердца извлекают, взвешивают и режут в криостате (пробы можно хранить -20°C 1 мес.). На криостате изготавливают пять срезов толщиной 25 мкм, которые делают через каждые 2 мм, начиная от верхушки левого желудочка. Срезы окрашивают с помощью трифенилтетразолия хлорида (5% р-р в фосфатном буфере, pH = 7,4, $t=+37^\circ\text{C}$) в течение 4–5 мин, выявляя таким образом активность сукцинатдегидрогеназы, окраску останавливают формалином (10% р-р в фосфатном буфере). При использовании этого метода окраски зона некроза остается бесцветной, а нормальный миокард окрашивается в красный цвет.

Для расчета размеров инфаркта миокарда можно использовать математическую модель, предложенную Воог и Рейнолдс [22]. Согласно

вещества) по 8–12 крыс в каждой. У ложнооперированных животных нитка, подведенная под артерию, не завязывается. Изучаемые вещества вводят внутрибрюшинно или per os 1–2 раза в сутки. Первую инъекцию осуществляют сразу после операции. В контрольных сериях вводят эквивалентный объем изотонического раствора натрия хлорида.

Проводится статистическая обработка данных. Так как у ложно-оперированных крыс зубец Q на ЭКГ и сколько-нибудь значимые некрозы отсутствуют, для анализа этих показателей указанную серию можно не учитывать. В связи этим при изучении 1 вещества в одной дозе статистическую значимость изменений определяют с помощью критерия Стьюдента для независимых выборок (при выполнении необходимых условий) или критерия Манна-Уитни (можно применить критерий Уилкоксона для несвязанных выборок). В противном случае используют одномерный дисперсионный анализ (при выполнении необходимых условий) с дальнейшей обработкой одним из методов множественных сравнений (критерии Дункана, Стьюдента с поправкой Бонферрони, Даннета и др.) или непараметрический критерий Краскела-Уоллиса с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Данну. Для обработки данных об объеме полости, толщине стенки левого желудочка и относительной массе сердца необходимо учитывать группу ложно-оперированных животных, поэтому используют те же методы, что и для обработки результатов измерения размера инфаркта при изучении более чем 1 вещества. При подсчете количества животных с комплексом QS на ЭКГ статистическую значимость изменений определяют с помощью метода точной вероятности Фишера, учитывая при необходимости множественность сравнений [4, 15, 9].

Сходным образом проводятся исследования на других видах животных. Однако операции проводят только на искусственном дыхании, а у мышей операции проводят под операционным микроскопом.

Модификацией предыдущего метода является изучение влияния веществ на течение экспериментального инфаркта миокарда при их длительном введении в течение 21–28 дней. К этому времени у животных развивается застойная сердечная недостаточность. Исследования проводятся на крысах первоначальной массой 180–200 г. Операция проводится точно так же, как описано выше.

Препараты вводят внутрибрюшинно 1 раз в сутки в течение 21–28 дней. Первую инъекцию осуществляют сразу после операции. В контрольных сериях экспериментов вводят эквивалентные объемы изотонического раствора натрия хлорида.

Через 21–28 дней у крыс, анестезированных внутрибрюшинно уретаном (1000–1300 мг/кг) регистрируют ЭКГ, в условиях искусственного дыхания вскрывают грудную клетку и с помощью электромагнитного или ультразвукового измерителя потока крови регистрируют фазовую кривую кровотока в восходящей части дуги аорты (датчик диаметром 2–3 мм). Рассчитывают следующие показатели: частоту сердечных сокращений, систолический и сердечный выбросы, среднее ускорение кровотока в аорте. Артериальное давление измеряют в бедренной или сонной артерии с помощью электроманометра. Расчеты проводят так, как описано в пункте 5 данного этапа.

Для изучения компенсаторных возможностей миокарда в условиях перегрузки, животным в бедренную вену одномоментно вводят 1 мл изотонического раствора натрия хлорида. Запись показателей производят сразу и через 1 мин после введения. Рассчитывают величину реакции систолического и сердечного выбросов, среднего ускорения кровотока в аорте на нагрузку объемом.

Сердца вырезают, взвешивают, проводят морфологическое изучение проб, как описано выше.

Распределение крыс по сериям исследований и статистическая обработка такая же, как в пункте 7 данного этапа (обработку гемодинамических данных проводят так же, как и размеров полости левого желудочка).

2.8. Изучение влияния веществ на течение экспериментального инфаркта миокарда, вызванного окклюзией с последующей реперфузией коронарной артерии

Модификацией двух предыдущих моделей является изучение влияния веществ на течение экспериментального инфаркта миокарда, вызванного окклюзией с последующей реперфузией коронарной артерии. В этом случае крыс наркотизируют каким-либо неингаляционным препаратом (например, хлорал гидрат 350 мг/кг, в/б или этаминал-натрий 45 мг/кг, в/б), интубируют, переводят на искусственное дыхание. Грудную клетку вскрывают в 4–5 межреберье слева, вскрывают перикард, коронарную артерию пережимают специальным окклюдером, через 20–30–60 мин проводят реперфузию. Грудную клетку зашивают, интубационную трубку убирают [34, 25]. Исследования и обработку их результатов проводят так же, как в двух предыдущих моделях.

2.9. Модель стеноза коронарной артерии у крыс

Большой интерес представляет модель стеноза коронарной артерии у крыс. Животных массой 180–200 г, находящихся под неингаляционным наркозом (хлорал гидрат 350 мг/кг, в/б или этаминал-натрий 50 мг/кг, в/б), интубируют и переводят на искусственное дыхание. Грудную клетку вскрывают в 4 межреберье, вскрывают перикард, ушко левого предсердия отводят в сторону, над левой нисходящей коронарной артерией помещают зонд (можно медную проволоку) диаметром 275–300 мкм, под артерию в 3–4 мм от ее начала с помощью атравматической иглы подводят лигатуру, которую завязывают вокруг артерии и зонда, который затем убирают. Грудную клетку зашивают, рану обрабатывают антисептиками. У крыс записывают ЭКГ до операции и сразу после нее. Препараты вводят внутривентрально или перорально, первое введение делают сразу после операции. Через 21–28 дней крыс наркотизируют (уретан 1000–1300 мг/кг, в/б) [23].

2.10. Модель коронарного спазма у животных

Определенный интерес представляет модель коронарного спазма у животных (крысы, кошки). Особенно важное значение имеет эта модель для изучения веществ, в механизме действия которых предполагается наличие вазодилатирующего компонента. Для создания ишемии животным внутрикоронарно или внутривенно вводят вещество, вызывающее спазм коронарных артерий: метахолин (3–8 мкг, внутрикоронарно, крысы), вазопрессин (в/в, 1 ЕД/кг, крысы), дигидроэрготамин (в/в, 0,4 мг/кг, кошки). Исследования проводят на наркотизированных животных в условиях закрытой грудной клетки. Для внутрикоронарного введения крысам используют специальный катетер с жестким концом, который изогнут под углом 120°. Катетер через правую сонную артерию проводят в аорту, в область, где открываются правое и левое коронарные устья. Таким образом, достигается более избирательное введение в коронарную систему. В этих условиях на стандартных отведениях ЭКГ или эпикардиальной электрограмме (кошки) возникает значительный подъем или депрессия сегмента ST. Вещество, обладающее противоишемическим действием, будет уменьшать или предотвращать эти изменения ЭКГ [5, 21, 35]. Изучаемые вещества вводят внутривенно или внутривентрально. В каждую серию экспериментов включают 6–8 животных. Перед проведением тестирования изучаемого вещества следует определить продолжительность вызываемого спазма в контрольной серии экспериментов.

При обработке полученных данных рассчитывают суммарное смещение сегмента ST на ЭКГ или эпикардиальной электрограмме по всем отведениям, вызванное провоцирующим веществом, до и после введения изучаемого соединения. Для статистического анализа результатов исследования используют дисперсионный анализ для повторных измерений (при соблюдении необходимых условий) с дальнейшей обработкой методом множественных сравнений по Даннету или непараметрический дисперсионный анализ по Фридману с последующей обработкой методом множественных сравнений по Даннету или с помощью ранговых сумм Фридмана [15, 4, 9].

2.11. Модель коронарного микротромбоза у наркотизированных кошек

Для изучения противоишемического действия вещества может быть применена модель коронарного микротромбоза у наркотизированных кошек. Эта модель особенно адекватна в случае изучения противоишемических эффектов веществ, обладающих антиагрегационным и антикоагуляционным действием. Эксперименты проводятся на наркотизированных кошках (этаминал-натрий, 40 мг/кг, в/в) в условиях искусственного дыхания и открытой грудной клетки. Для создания тромбоза животным через катетер, введенный в ушко левого предсердия, осуществляют постоянную инфузию 1 мМ раствора АДФ со скоростью 60 капель/мин или 3 мл/мин. Тромбоз вызывает подъем сегмента ST на эпикардиальной электрограмме. Вещество, обладающее противоишемическим действием, будет уменьшать или предотвращать эти изменения эпикардиальной электрограммы [5]. Изучаемые соединения вводят внутривенно или внутривентриально. Введение тестируемого препарата осуществляют через 10 мин после начала инфузии раствора АДФ. В каждую серию исследований включают 6–7 животных.

Обработку и статистический анализ полученных данных осуществляют также как в пункте 2.11. данного этапа.

Из предложенного комплекса различных моделей ишемии при изучении противоишемического действия вещества в каждом конкретном случае необходимо отобрать не менее 2–3 доступных для исследователя моделей ишемии.

3. Исследование основных механизмов противоишемического действия препарата

3.1. Исследование влияния отобранного вещества на системную гемодинамику и функцию сердца в исследованиях на различных видах наркотизированных или бодрствующих животных (крысы, кошки, собаки) с открытой и закрытой грудной клеткой

Регистрируют фазовую кривую аортального кровотока в восходящей части дуги аорты с помощью электромагнитного или ультразвукового измерителя потока крови с определением следующих показателей: частоты сокращений сердца, времени систолического выброса и диастолического расслабления, систолического и сердечного выбросов, среднего ускорения кровотока в аорте (показатель сократимости сердечной мышцы), работы сердца. Метод расчета этих показателей описан выше. Одновременно производят измерение аортального давления, центрального венозного давления с помощью электроманометра. Для более точного суждения о сократительной функции сердца регистрируют давление в левом желудочке и его первую и вторую производные, которые получают с помощью электронного дифференциатора. С этой целью вводят катетер в левый желудочек через верхушку, закрепляя кисетным швом, или через бедренную (правую сонную) артерию проводят катетер в аорту и далее между полулунными клапанами в желудочек. Вещество вводят внутривенно, внутривентриально или per os. В каждую серию экспериментов включают по 6–8 животных.

Статистическую обработку проводят с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений (при соблюдении необходимых допущений) или непараметрического анализа по Фридману с последующим использованием методов множественных сравнений [15, 4, 9].

3.2. Изучение влияния вещества на перераспределение кровотока между ишемизированной и условно-интактными зонами сердечной мышцы

3.2.1. Метод попеременной регистрации объемной скорости ретроградного коронарного кровотока

Исследования проводят на наркотизированных собаках (этаминал-натрий 40 мг/кг, в/в) массой 10–20 кг в условиях искусственного дыхания и открытой грудной клетки. Используют метод попеременной регистрации объемной скорости ретроградного коро-

нарного кровотока и ретроградного перфузионного давления в дистальном отрезке окклюзированной в средней трети передней нисходящей ветви левой коронарной артерии. Измерение ретроградного кровотока производят с помощью интервалографа, ретроградного давления — электроманометром. Для предотвращения свертывания крови животным внутривенно вводят гепарин в дозе 1000 ЕД/кг. Одновременно с помощью электромагнитного или ультразвукового измерителя потока крови регистрируют объемную скорость коронарного кровотока в огибающей ветви левой коронарной артерии, снабжающей кровью условно-интактные зоны миокарда левого желудочка. По соотношению ретроградного коронарного кровотока и кровотока в огибающей ветви левой коронарной артерии можно судить о перераспределении кровоснабжения под влиянием вещества между очагом ишемии и условно-интактными зонами миокарда [17, 36]. Аортальное давление измеряют электроманометром. Катетер в аорту проводят через правую сонную артерию.

Объемную скорость истинного коллатерального коронарного кровотока рассчитывают по формуле:

$$\text{ККК} = \text{РК}(1 - \text{РД}/0,8\text{АоД}),$$

где: ККК — коллатеральный коронарный кровоток;

РК — ретроградный кровоток;

РД — ретроградное давление в бассейне перевязанной венечной артерии;

АоД — аортальное давление.

Исследуемые препараты вводят внутривенно или внутривентриально. Первое введение препаратов осуществляют через 30 мин после окклюзии коронарной артерии, когда кровоснабжение очага ишемии стабилизируется и остается практически неизменным в течение нескольких часов.

В каждую серию экспериментов включают по 5–7 животных.

Статистическую обработку результатов исследований проводят с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений (при соблюдении необходимых условий) или непараметрического дисперсионного анализа по Фридману.

3.2.2. Метод оценки перераспределения кровотока в миокарде

Исследования проводят на наркотизированных собаках (этаминал-натрия, 40 мг/кг, в/в) массой 10–25 кг в условиях искусственного дыхания и открытой грудной клетки. Выделяют отрезок передней нисходящей ветви левой коронарной артерии в средней ее трети, на который помещают окклюдер. Передняя нисходящая ветвь левой коронарной артерии почти всегда сопровождается двумя прилегающими венами. На 2–3 мм выше места слияния этих вен выделяют небольшой участок венозного сосуда и на нем помещают ультразвуковой датчик кровотока, второй такой же датчик помещают на большую сердечную вену. Регистрируют фазовый и интегральный кровоток в коронарной артерии и вене. Артериальное давление в передней нисходящей ветви левой коронарной артерии измеряют с помощью микроманометра, катетеризируя веточку второго порядка, расположенную дистальнее места окклюзии. Оценка перераспределения кровотока в миокарде производится по соотношению первого и второго кровотока, соответственно [14, 17].

Исследования можно проводить по двум схемам:

1. После установки датчиков кровотока на сосуды и 30-минутной паузы (для стабилизации фона) производят пробную одноминутную окклюзию коронарной артерии с последующей 30-минутной реперфузией. Через 2 мин после внутривенного введения изотонического раствора натрия хлорида (3,0–5,0 мл в течение 3-х мин) следует контрольная 3–5-минутная окклюзия венечного сосуда с последующей 30-минутной реперфузией. Затем с такой же скоростью и в таком же объеме внутривенно вводят изучаемые вещества. После введения препаратов через 2 мин вновь производят окклюзию и реперфузию венечного сосуда, через 30 мин окклюзию повторяют.

2. Производят окклюзию коронарной артерии и после 30-минутной стабилизации регистрируют объемную скорость кровотока в обеих венах, на которых установлены дат-

чки, затем вводят изучаемый препарат (в/в, в течение 3–5 мин, или в/б) и согласно выбранным временным интервалам снова измеряют показатели.

В каждую серию экспериментов включают по 6–7 животных.

Статистическую обработку результатов исследований проводят с помощью дисперсионного анализа для повторных измерений (при соблюдении необходимых условий) или непараметрического дисперсионного анализа по Фридману.

3.3. Изучение влияния вещества на коллатеральную гемодинамику и перераспределение кровотока в сердечной мышце в условиях хронической ишемии

Эксперименты проводятся в два этапа. На первом — у наркотизированных собак (этаминал-натрий, в/в, 40 мг/кг) производится постепенная (в течение 1 ч) полная окклюзия передней нисходящей ветви левой коронарной артерии в средней ее трети. Спустя 6–8 недель собак берут в острое исследование. О хорошо развитом коллатеральном кровообращении в сердце в этих исследованиях свидетельствуют высокое ретроградное перфузионное давление, которое составляет около 65% от среднего аортального, и значительно большая по сравнению с экспериментом при острой ишемии абсолютная величина объемной скорости ретроградного кровотока. Оценку кровоснабжения очага ишемии можно проводить одним из двух методов, описанных выше: по соотношению ретроградного коронарного кровотока (или расчетного коллатерального кровотока) и кровотока в огибающей ветви левой коронарной артерии или по соотношению кровотока в венах, дренирующих кровь непосредственно из очага ишемии и всего левого желудочка (*v. magna*). Статистическая обработка проводится так же, как в пункте 3.2 данного этапа.

3.4. Изучение воздействия вещества на различные стороны метаболизма миокарда

3.4.1. Изучение влияния соединения на содержание в ишемизированном миокарде экспериментальных животных (кошки, собаки, свиньи) *in situ* макроэргических фосфатов, неорганического фосфора, энергетического заряда, НАД, НАД*Н, окислительно-восстановительного потенциала, лактата, пирувата, глюкозы, гликогена, фосфолипидов, активности фосфофруктокиназы, гексокиназы и др.

Определение содержания метаболитов ткани проводят стандартными общепринятыми методами [2, 10]. В экспериментах используют модели ишемии разного типа: постоянная окклюзия коронарной артерии различной длительности, временная окклюзия с последующей реперфузией, стеноз венечного сосуда, создаваемый винтовым окклюдером (см. рис.1), пневматической манжеткой и др. приспособлениями.

Пробы тканей замораживают и хранят в жидком азоте.

Проводят не менее двух серий экспериментов: контрольная группа и группы животных, которым вводили изучаемые вещества. По 6–7 экспериментов в каждой серии. Для выявления статистической разницы между биохимическими показателями в ишемизированном и условно-интактном миокарде используют критерий Стьюдента для попарно-связанных вариантов (при соблюдении необходимых допущений) или критерий знаковых рангов Уилкоксона. Для определения значимости различий между экспериментальными группами, если сравниваются только 2 серии, используют критерий Стьюдента для независимых выборок или критерий Манна-Уитни (можно критерий Уилкоксона для независимых выборок); если сравнивают более 2 групп, используют одномерный дисперсионный анализ (при соблюдении необходимых допущений) с последующей обработкой методами множественных сравнений (Стьюдента с поправкой Бонферони, Даннета, Дункана и др.) или непараметрический дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису с последующим использованием критерия Дана [15, 4, 9].

3.4.2. Изучение влияния веществ на показатели насосной и сократительной функции

В исследованиях на изолированных сердцах экспериментальных животных (крысы, морские свинки, кролики) изучают влияние веществ на показатели насосной и сократительной функции, содержание некоторых метаболитов (лактат, пируват, глюкоза, свободные жирные кислоты) в перфузате в условиях нормоксии, гипоксии, глобальной и очаговой ишемии. Изучают влияние соединений на эти показатели в нормальных условиях и в условиях блокады некоторых путей метаболизма, например, гликолиза, восстановления цитохромов и др. [12, 13]. Эти эксперименты, как правило, проводят на препарате изолированного сердца по Лангендорфу.

Пробы перфузата хранят в жидком азоте или в холодильнике при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Статистическую обработку проводят в зависимости от типа протокола эксперимента. Если сравнение эффектов препарата производится по отношению к исходному уровню, то используют либо дисперсионный анализ для повторных измерений (при соблюдении необходимых допущений), либо непараметрический дисперсионный анализ по Фридману с дальнейшей обработкой методами множественных сравнений. Если сравниваются различные серии, то при 1 сравнении применяют критерий Стьюдента для независимых выборок (при выполнении необходимых допущений) или критерий Манна-Уитни, при проведении более 1 сравнения — одномерный дисперсионный анализ (при выполнении необходимых допущений) с дальнейшим применением одного из методов множественных сравнений или непараметрический дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису с последующим использованием критерия Данна [15, 4, 9].

3.5. Изучение действия вещества в исследованиях на изолированных коронарных артериях, аорте, воротной вене

Сосуд выделяют из организма, очищают и вырезают кольцеобразный сегмент или спиралеобразную полоску шириной 2–3 мм, которые помещают в камеру (объем 10, 20 или 50 мл) с питательным раствором Кребса-Хензелейта ($\text{NaCl} - 118\text{ мМ}$; $\text{KCl} - 4,70\text{ мМ}$; $\text{CaCl}_2 - 2,52\text{ мМ}$; $\text{MgSO}_4 - 1,64\text{ мМ}$; $\text{NaHCO}_3 - 24,88\text{ мМ}$; $\text{KH}_2\text{PO}_4 - 1,18\text{ мМ}$; глюкоза — $5,55\text{ мМ}$; пируват натрия — $2,00\text{ мМ}$) при $t -37^{\circ}\text{C}$ и $\text{pH}=7,4$. Раствор аэрируют карбогеном — смесью, состоящей из 95% O_2 и 5% CO_2 . С одной стороны сосуд крепится к крючку в камере, с другой к специальному датчику или стержню механотрона. На сосуд создают нагрузку от 0,5 до 2 г, в зависимости от типа сосуда. Изготовленный препарат отстаивают в течение 1 ч, затем тестируют действие веществ, которые вводят в нарастающих концентрациях. Объем вводимого раствора должен составлять 0,01 объема камеры. Для регистрации используют любой самописец с широкой записью (типа КСП-4) или компьютер.

Одним из тестов является изучение влияния соединений на контрактуру гладкой мышцы сосуда, вызываемую 60–80 мМ раствором хлорида калия. При достижении максимального сокращения и выхода кривой на плато в инкубируемый раствор добавляют последовательно возрастающие дозы исследуемого вещества (используют кумулятивный эффект). Такой подход дает возможность выявить у веществ свойства антагонистов кальция.

Сходным образом изучается наличие у веществ способности стимулировать различные рецепторы. С этой целью вначале проводят тестирующую реакцию на изучаемое соединение, внося его в камеру в нарастающих концентрациях. После отмывания сосуда от соединения и возвращения его тонуса к исходному состоянию в камеру в средне-эффективной концентрации вносят блокатор тех или иных рецепторов и на его фоне вновь тестируют действие изучаемого вещества. Если реакция на вещество уменьшается или не возникает, то можно полагать, что изучаемое соединение обладает агонизмом к заблокированным рецепторам.

Для изучения антагонизма вещества к каким-либо рецепторам на препарат сосуда вначале воздействуют известным агонистом данного рецептора в средне-эффективной концентрации. Затем после отмывания препарата сосуда от агониста и стабилизации в

камеру вносят тестируемое вещество в нарастающих концентрациях, на фоне которых воздействуют агонистом-анализатором. Если изучаемое вещество предотвращает или уменьшает эффекты агониста, можно полагать, что оно блокирует данные рецепторы.

Блокируя в сосуде синтез тех или иных метаболитов (например, простагландинов с помощью ацетилсалициловой кислоты в концентрации 10^{-4} М, время инкубации 40 мин), можно изучить их роль в действии веществ на сосудистый тонус. В тех случаях, когда имеет место необратимая блокада, необходимо использовать контрольную и опытные серии экспериментов.

Разрушая механическим способом эндотелий стенки сосудов перед помещением их инкубационную камеру, можно изучить его роль в реакции на вещество. Целостность эндотелия проверяют путем внесения в раствор на фоне К — контрактуры ацетилхолина (10^{-4} М), при разрушенном эндотелиальном слое реакция должна отсутствовать. Препарат отмывают и дают стабилизироваться в течение 1 ч. Затем проводят тестирование вещества.

Во всех сериях экспериментов рассчитывают показатель 50% эффекта препарата $pA_2 = -\lg(C)$ [1].

Так как полученные в подобных опытах данные, как правило, не имеют нормального распределения, то для статистической обработки следует использовать непараметрические методы. Если сравниваются попарно-связанные выборки, то при 1 сравнении наиболее удобен метод знаковых рангов Уилкоксона, при 2 и более сравнениях используют непараметрический дисперсионный анализ по Фридману с дальнейшим применением множественных сравнений с помощью критерия Даннета или ранговых сумм Фридмана. В случае альтернативного учета данных (по типу возникла реакция — не возникла) следует использовать метод Мак-Нимара, учитывая при необходимости множественность сравнений. Если выборки независимые, то при 1 сравнении можно использовать критерий Манна-Уитни (или критерий Вилкоксона для независимых выборок), при 2 и более сравнениях следует использовать непараметрический дисперсионный анализ по Краскелу-Уоллису с последующей обработкой методом множественных сравнений по Данну. В случае альтернативного учета данных следует использовать метод точной вероятности Фишера, учитывая при необходимости множественность сравнений [15, 4, 9].

3.6. Исследование влияния вещества на адренореактивные структуры сердца

Для этой цели наиболее адекватным является использование препарата изолированного сердца лягушки по Штрабу. Этот метод дает возможность изучать действие веществ непосредственно на миокард, исключая нервные и гуморальные влияния со стороны организма, в то же время он достаточно прост и, в отличие от изолированных сердец теплокровных животных, не требует термостатирования и аэрации питательного раствора.

Препарат готовится следующим образом. Лягушку обездвигивают разрушением головного и спинного мозга с минимальными кровопотерями. Фиксируют брюшной стороной вверх. Обнажают сердце. Укрепляют на верхушке желудочка серфин (проволочный зажим). Далее производят следующие действия: 1) перевязывают правую дугу аорты; 2) под левую дугу аорты и луковицу аорты подводят лигатуры, не завязывая их; 3) сердце приподнимают за верхушку, закрепляют в подвешенном состоянии; 3) отдельно перевязывают правую и левую верхние полые вены, нижнюю полую вену; 4) одной лигатурой перевязывают легочные вены; 5) возвращают сердце в лежачее положение и завязывают одну из лигатур на левой дуге аорты как можно выше; 6) делают надрез в стенке луковицы аорты, вставляют заполненную раствором Рингера канюлю в левую дугу аорты, так чтобы ее носик проник в желудочек, закрепляют лигатурой. Сразу после закрепления канюли сердце промывают раствором Рингера. Затем, приподнимая сердце за канюлю, дистальнее лигатур перерезают сосуды и все ткани, связывающее сердце с организмом. Канюлю закрепляют в штативе, нитку серфина соединяют с тензорезисторным датчиком или рычаж-

ком Энгельмана (если запись будет производиться на ленте кимографа). Сердце еще раз промывают до полного обесцвечивания жидкости. Уровень жидкости в канюле должен быть постоянным в течение эксперимента ($1/3-1/4$ объема канюли) [6, 20].

В экспериментах используют раствор Рингера для холоднокровных следующего состава: NaCl — 102,6 мМ, KCl — 1,01 мМ, CaCl₂ — 0,91 мМ, NaHCO₃ — 1,19 мМ.

В исследованиях регистрируют амплитуду и частоту сокращений сердца. Протокол эксперимента выглядит следующим образом: проводят тестовую реакцию на адреналин (2–3 капли раствора в концентрации $10^{-6}-10^{-5}$ г/мл), затем препарат отмывают и после восстановления показателей до исходного уровня вносят в раствор изучаемое соединение и на его фоне снова тестируют адреналином. Таким образом, выявляется наличие у вещества адrenoблолирующих свойств. Если вещество оказывает прямой стимулирующий эффект на миокард, следует проверить наличие у него адrenomиметического действия, с этой целью его вносят в перфузат на фоне β -адrenoблокатора (например пропранолола), предварительно определив эффективные концентрации последнего с помощью тестирования адреналином. Проводят 6–8 исследований на серию.

Полученные результаты обрабатывают статистически, так же как описано в предыдущем пункте.

3.7. Изучение возможных антиаритмических свойств нового препарата

Используются аконитиновая, хлоридкальциевая, адреналиновая модели аритмий, модель фибрилляции желудочков у крыс, модель аритмий у бодрствующих собак по Harris (см. Методические рекомендации по доклиническому изучению кардиотонической активности лекарственных средств).

Заключение

Приведенная программа поиска и доклинического изучения новых препаратов с предполагаемым противоишемическим действием включает большой комплекс исследований. В зависимости от результатов, полученных при первичной оценке препарата, исследователь уделяет более пристальное внимание отдельным методам исследований, наиболее важным для определения спектра и механизма действия препарата. При этом совсем не обязательно проводить все описанные исследования (особенно это относится к третьему этапу), следует отобрать наиболее информативные для данного конкретного случая. Так, если вещество практически не влияет на коронарный кровоток, скорее всего нет необходимости изучать его эффекты на препаратах изолированных сосудов. Чем тщательнее проведено доклиническое изучение, тем легче сформулировать показания к клиническому применению препарата. Информация, полученная в условиях эксперимента, дает возможность сделать правильный подбор больных, обеспечить оптимальные условия для выявления особенностей действия препарата, наметить меры профилактики осложнений, подобрать оптимальные дозы, способ применения и определить длительность курса лечения.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Блаттнер Р., Классен Х., Денерт Х., Деринг Х. // Эксперименты на изолированных препаратах гладких мышц. — М., Мир, 1983. — 206 с.
2. Вилкинсон Д. // Принципы и методы диагностической энзимологии.
3. Гацура В.В. // Фармакологическая коррекция энергетического обмена ишемизированного миокарда. — М.: Антекс, 1993. — 252 с.
4. Гланц С. // Медико-биологическая статистика. — М.: Практика, 1999. — 459 с.

5. Гурбанов К.Г., Ковалев Г.В., Паперно А.А. // Фармакол. и токсикол. — 1991а. — Т. 54, №4. — С. 21–23.
6. Каверина Н.В., Розонов Ю.Б., Чичканов Г.Г. // Современные аспекты антиангинальных средств. — М.: Медицина, 1980. — 240 с.
7. Карпман В.Л. // В кн.: Современные методы исследования функций сердечно-сосудистой системы, ред. Е.Б. Бабский, В.В. Парин. — М.: Медгиз, 1963. — С.125–141.
8. Келарева Н.А., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е. и соавт. // Большой практикум по физиологии человека и животных. — М.: Высшая школа, 1984. — С. 187–270.
9. Кобзарь А.И. // Прикладная математическая статистика. — М.: Физматлит, 2006. — 813 с.
10. Кочетов Г.А. // Практическое руководство по энзимологии. — М.: Высшая школа, 1980. — 272 с.
11. Метелица В.И. // Справочник по клинической фармакологии сердечно-сосудистых лекарственных средств. — М.: Медпрактика, 1996. — С. 54.
12. Нефедов В.П., Доррер Г.А., Ярыгина И.В. и соавт. // Параметры перфузии изолированных органов. — Новосибирск: Наука, 1983. — 229 с.
13. Сернов Л.Н., Соколова О.А., Бозиева Ж.Ч. // Бюл. Всес. науч. центра по безопас. биол. актив. веществ. — 1991. — №2. — С. 27–43.
14. Толмачева Е.А. // Новый антиаритмический препарат боннекор: некоторые аспекты фармакодинамики и фармакокинетики. — Дисс. ... канд. мед. наук. — М., 1988. — 144 с.
15. Холлендер М., Вулф Д.А. // Непараметрические методы статистики. — М.: Фининсы и статистика, 1983. — 518 с.
16. Цорин И.Б., Палка И.П., Чичканов Г.Г. // Эксперим. и клин. фармакол.. — 2009. — т. 72, №1. — С. 41–45.
17. Чичканов Г.Г., Боголепов А.К., Мацневский Д.Д. // Кардиология. — 1981. — т. 21, № 10. — С. 85–85.
18. Чичканов Г.Г., Цорин И.Б. // Фармакол. и токсикол. — 1985. — т. 48, № 2. — С. 49–54.
19. Шарлье Р. // В кн.: Результаты клинического изучения препарата кордарон: Материалы совместного советско-югославского симпозиума, посвященного клиническому изучению препарата «кордарон». — М., 1972. — С. 7–11.
20. Эндрю Б.Л. // Экспериментальная физиология. — М.: Мир, 1974. — 350 с.
21. Aono J., Akima M., Sakai K. // Jpn. J. Pharmacol. — 1981. — v. 31. — p. 823–830.
22. Boor B.J., Reynolds E.S. // Am. J. Clin. Pathol. — 1977. — v. 68. — p. 387–392.
23. Boudina S., Laclau M.N., Tariosse L. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. — 2002. — v. 282. — p. H821–H831.
24. Cosin J., Rivera M., Solaz J. et al. // Clin. Cardiol. — 1992. — v. 15. — p. 411–416.
25. Dai W., Hale S.L., Kay G.L. et al. // Cardiovasc. Thet.. — 2010. — v. 28. — p. 30–37.
26. Dorado D.G., Therous P., Elizaga L. et al. // Cardio. Res.. — 1987. — v. 21, № 7. — p. 537–544.
27. Espinoza A., Halvorsen P.S., Hoff L. et al. // Eur. J. Cardithorac. Surg. — 2010. — v. 37. — p. 119–126.
28. Fischer G. // Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. — 1989. — v. 339, Suppl. — p. 58.
29. Fischer G., Grohs J.G., Raberger G. // Cardio. Res. — 1990. — v. 24. — p. 115–120.
30. Gout B., Jean J., Bril A. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1992. — v. 262, №3. — p. 987–994.
31. Grover G.J., Schumacher W.A. // Basic Res. Cardiol. — 1989. — v. 84, № 1. — p.103–110.
32. Hamburger S.A., Barone F.C., Feuerstein G.Z. et al. // Pharmacology. — 1991. — v. 43, №3. — p. 113–120.
33. Igarashi Y., Aizawa Y., Tamura M. et al. // Amer. Heart J. — 1989. — v. 118, № 4. — p. 674–678.
34. Kanhei C.S., Sachin A., Goyal S. et al. // J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst. — 2009. — v. 10. — p. 201–209.
35. Karasawa A., Kubo K., Shuto K. et al. // Arzneim. — Forsch. — 1988. — v. 38, № 11A. — p. 1702–1707.
36. Lacrouix P., Linee Ph., Le Polles J.B. // J. Pharmacol. and Exp. Ther. — 1978. — v. 204, № 3. — p. 645–654.
37. Lamar J.C., Constantin M., Dureny G., Tisne-Versailles J. // Br. J. Pharmacol. — 1983. — v. 79, Suppl. — p. 381.
38. Laslett L.J., Paumer L., Amsterdam E. A. // Circulation. — 1985. — v. 71. — p. 958–962.
39. Michael L.H., Entman M.L., Hartley C.J. et al. // Amer. J. Physiol. — 1995. — v. 269, № 6. — p. H2147–H2154.
40. Selye A.I., Bajuz E., Crasse S. // Angiology. — 1960. — v. 11, № 5. — p. 398–407.
41. Szekeres L., Csik V., Udvary E. // J. Pharmacol. Exp. Ther. — 1976. — v. 196, № 1. — p. 15–28.
42. Vegh A., Szekeres L., Udvary E. // J. Mol. and Cell. Cardiol. — 1989. — v. 21, Suppl. № 2. — p.1.
43. White F.C., Roth D.M., Bloor C.M. // Basic Res. Cardiol. — 1989. — v. 84, № 1. — p. 42–54.

ГЛАВА 25

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ЭНДОТЕЛИЙ КРОВЕНОСНЫХ СОСУДОВ

Составители: д. м. н., проф. О.Н. Щегловитова; Н.Н. Склянкина; к. вет. н. Н.А. Болдырева; к. м. н. А.А. Бабаянц; к. м. н. Д.Л. Беляев; И.С. Фролова; академик РАМН, проф. Ф.И. Ершов

Введение

Организм объединяется в единое целое с помощью системы кровеносных сосудов. Эндотелий, выстилающий внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, контактирует с кровью и обладает способностью получать и передавать биохимическую и физическую информацию в двух направлениях: в кровяное русло и вне его. Эндотелиальные клетки (ЭК) сосудов впервые были описаны в XIX веке, в начале XX века было обосновано представление об их секреторной функции, но только к концу XX века сформировалось представление об ЭК как динамичном, гетерогенном, диссеминированном органе с полифункциональными регуляторными потенциями [6, 9].

Общее количество ЭК у взрослого человека составляет $1-6 \times 10^{13}$ клеток, при этом масса эндотелия составляет 1–2 кг и поверхность, занятая ЭК, — до 7 м². Эндотелий кровеносных сосудов является полупроницаемым барьером для крови, принимает участие в работе иммунной системы, контролирует тонус сосудов, обеспечивает ток крови, поддерживая антитромботический и фибринолитический фенотип [8, 9, 10, 12, 13, 14, 15, 16, 17]. Эти и другие функции эндотелия реализуются с помощью факторов, экспрессируемых и синтезируемых клетками эндотелия сосудов (ЭС). Факторы, являющиеся маркерами функциональной активности эндотелия, обладают плеiotропными свойствами: один и тот же фактор, кроме проявления основного эффекта, оказывает влияние и на экспрессию факторов, регулирующих другие функции ЭС. Это связано с тем, что внутриклеточные механизмы трансдукции разных факторов имеют общие пути [6, 9].

ЭС вовлекается в патогенез инфекционных и соматических заболеваний. Большое число патогенов инфицирует эндотелий сосудов: это — вирусы группы герпеса, гриппа, арборвирусы, вирусы группы клещевого энцефалита, бактерии, в том числе хламидии [4, 6, 7]. Патогены вызывают развитие как острой, так и хронической формы инфекционного процесса в ЭС, что приводит как к временной, так и хронической дисфункции эндотелия. Дисфункция эндотелия является основой и результатом развития патологических процессов: рецидивирующего острого и хронического воспаления, тромбоза, нарушения тонуса сосудов, атеросклероза, васкулитов, отторжения трансплантированных органов, что происходит при многочисленных заболеваниях: острых и хронических вирусных инфекциях, ишемической болезни сердца, инфаркте, инсульте, диабете, метастазировании опухолей, нарушении зрения [6, 7, 9].

Фармацевтические препараты в организме попадают в кровоток и контактируют с эндотелием сосудов. Под воздействием препаратов клетки эндотелия продуцируют факторы — растворимые медиаторы, которые воздействуют на многочисленные звенья патогенеза инфекционных и соматических заболеваний.

1. ЭС обладает способностью под воздействием индукторов интерферона продуцировать интерферон, который вызывает в интактных клетках, в том числе и эндотелиальных, разви-

тие антивирусного состояния, предохраняющего клетки от инфицирования вирусами. Кроме этого интерферон способствует элиминации уже инфицированных клеток [2, 4, 5].

2. ЭС спонтанно и под влиянием иммуномодуляторов продуцирует широкий спектр цитокинов, включаясь таким путем в цитокиновую сеть организма, оказывает иммуномодулирующее воздействие на иммунокомпетентные клетки и запускает каскад событий клеточного и гуморального иммунитета [3, 13].

3. ЭС принимает участие в развитии воспалительного процесса, направленного на элиминацию патогена из организма, путем обеспечения миграции иммунокомпетентных клеток крови в очаг воспаления. Эта функция ЭС реализуется под влиянием индукторов с помощью продукции цитокинов, активирующих на поверхности клеток эндотелия молекулы клеточной адгезии (МКА), которые соединяются с комплементарными молекулами на поверхности лейкоцитов крови, и хемокинов, способствующих трансэндотелиальной миграции лейкоцитов крови в очаг воспаления. Регуляция рекрутирования и миграции лейкоцитов осуществляется в том числе и с помощью растворимых МКА, отсоединяющихся в процессе развития воспаления с поверхности клеток эндотелия [8, 10, 11, 14, 16, 17].

4. Сосудистая гемодинамика в организме обеспечивается медиаторами, продуцируемыми ЭС: это медиаторы, регулирующие кровяное давление — вазодилататоры и вазоконстрикторы. Кроме этого, эти медиаторы принимают участие в развитии воспалительного процесса, при котором продукция вазодилататоров, с одной стороны, приводит к локальному расширению сосудов, но, с другой стороны, способствует локализации лейкоцитов и увеличению их миграции в очаг воспаления. Действие вазоконстрикторов оказывает противоположное действие на течение воспалительного процесса [4, 6, 9].

5. Сосудистая гемодинамика зависит от факторов, осуществляющих образование и рассасывание тромба. Клетки эндотелия сосудов в тельцах Вейбель-Паллада содержат фактор вон Виллебранда. Активированные клетки ЭС выделяют этот фактор, и его действие совместно с другими факторами крови приводит к образованию тромба в кровеносном сосуде [9].

6. ЭС обладает способностью синтезировать металлопротеиназу — фермент, действие которого направлено на разъединение клеток эндотелия в капиллярах, их размножение и образование новых сосудов. Ангиогенез является важным позитивным фактором при репаративных процессах. Однако ангиогенез при опухолевом процессе способствует росту опухоли и ее метастазированию [6, 9, 15].

В настоящих методических рекомендациях предлагается комплексное изучение фармпрепаратов, дающее возможность оценить их интерфероноиндуцирующие, иммуномодулирующие и антивирусные свойства на новой модели: первичной культуре эндотелия кровеносных сосудов, что адекватно отражает реальную ситуацию в организме. Кроме этого исследования дают возможность выявить корреляцию между вышеперечисленными свойствами препаратов и специфическими для эндотелия сосудов свойствами: про- и противовоспалительными, регулируемыми кровяное давление, влияющими на тромбообразование и ангиогенез.

1. Общие положения

1.1. Понятия и термины

Интерфероноиндуцирующая активность — способность препарата индуцировать в культуре клеток эндотелия продукцию интерферона: вещества, обладающего антивирусными свойствами.

Противовирусная активность — способность препарата ингибировать в культуре клеток эндотелия репродукцию вируса.

Имуномодулирующая активность — способность препарата активировать или ингибировать продукцию цитокинов культурой клеток эндотелия.

Про- и противовоспалительная активность — способность препарата активировать в культуре эндотелия продукцию провоспалительных цитокинов, которые активируют

экспрессию молекул клеточной адгезии (МКА) на эндотелии и запускают рекрутирование лейкоцитов крови при воспалении.

Регуляция кровяного давления — способность препарата активировать в культуре эндотелия продукцию вазодиллятора (оксида азота) и вазоконстриктора (эндотелина-1), которые также оказывают влияние на воспалительные процессы в стенке кровеносных сосудов: подавление и активацию соответственно.

Регуляция тромбообразования — способность препарата влиять на продукцию культурой эндотелия фактора вон Виллебранда, который также включается в процесс развития и завершения воспаления.

Регуляция ангиогенеза — способность препарата влиять на продукцию культурой эндотелия матриксной металлопротеиназы-1, которая также включается в репаративные процессы при воспалении.

2.2. Цели и задачи исследования

Целью исследования является изучение свойств фармпрепаратов, связанных с их воздействием на функциональное состояние эндотелия кровеносных сосудов.

Задачи исследования заключаются в оценке интерферониндуцирующего, иммуномодулирующего и противовирусного действия фармпрепаратов на новой модели первичной культуры эндотелия кровеносных сосудов и взаимосвязи этих активностей со специфическими для эндотелия сосудов свойствами: про- и противовоспалительными, регулирующими кровяное давление, влияющими на тромбообразование и ангиогенез.

2.3. Основные этапы исследования

1. Получение культуры эндотелия кровеносных сосудов и ее культивирование.
2. Засев культуры на 24 луночные планшеты и ее культивирование.
3. Внесение исследуемого препарата в свежей культуральной среде в лунки с моно-слоем клеток эндотелия для исследования:

А. интерферона, цитокинов, растворимых МКА, оксида азота, эндотелина-1, фактора вон Виллебранда, матриксной металлопротеиназы-1;

Б. противовирусного действия препарата.

В контрольных лунках разделов а) и б) необходимо только менять среду, не внося препарат.

4. А. Отбор культуральной среды в динамике: через 24, 48 и 72 ч и хранение образцов до проведения исследования при температуре -20°C .

Б. После 24 ч культивирования клеток с препаратом и без него внесение в свежую культуральную среду вируса простого герпеса 1 типа и отбор образцов в динамике — через 24, 48 и 72 ч, которые сохраняют до проведения исследования при температуре -20°C .

5. А. Тестирование в отобранных образцах вышеперечисленных факторов.

Б. Тестирование в образцах содержания инфекционного вируса.

2.4. Тесты и биологические модели

Все исследования выполняются в первичной культуре клеток эндотелия кровеносных сосудов человека. Наиболее доступной и удобной моделью для работы с эндотелием кровеносных сосудов является первичная клеточная культура, получаемая из вены пупочного канатика человека (ЭКПВЧ) [1, 11]. Культуру используют на уровне первого пассажа, так как только в этом случае сохраняется исходный фенотип клеток. Для тестирования растворимых медиаторов необходимо использовать тест-системы и выполнять дополнительное исследование содержания интерферона биологическим методом. Для тестирования инфекционной активности ВПГ-1 необходимо использовать культуру клеток почек зеленой мартишки VERO.

Все отобранные образцы культуральной среды тестируют методом иммуноферментного анализа (ИФА) в специфических тест-системах («Вектор-Бест», «Протеиновый

контур», «Biosource», «Bender Medsystems»). Уровень активности интерферона определяют в биотесте в культуре диплоидных фибробластов человека. Инфекционный титр вируса определяют в культуре почек зеленых мартышек VERO по развитию цитопатического действия.

2.5. Условия проведения исследования

Эндотелиальные клетки выделяют с помощью фермента диспазы (Sigma) из вен пупочных канатиков, полученных от здоровых женщин после нормальных родов, и культивируют в инкубаторе при температуре 37 °С с 5% CO₂ на пластиковой посуде в ростовой среде, состоящей из среды 199 (Gibco), 2 мМ L-глутамина, гепарина (5 ед/мл), 10% сыворотки эмбрионов коров (HyClone), гентамицина (50 мкг/мл), фактора роста эндотелия (100 мкг/мл). После образования монослоя клетки диспергируют раствором Трипсин-ЭДТА (GIBCO) и засевают на 24 луночные платы из расчета 120000 клеток в 1 мл на лунку. На 4 день после образования монослоя в лунки в свежей среде роста вносят исследуемый препарат в разных концентрациях. В контрольных лунках только меняют среду роста. В динамике культивирования отслеживают токсический эффект препарата на клетки и отбирают пробы культуральной среды, которые хранят при температуре –20 °С до тестирования. Для исследования развития антивирусного состояния на 4-й день после образования монослоя в лунки в свежей среде роста вносят исследуемый препарат в разных концентрациях, в контрольные лунки вносят только свежую среду без препарата. После 24 ч культивирования клеток среду декантируют и в свежей среде роста вносят вирус простого герпеса 1 типа (ВПГ-1) с множественностью инфицирования 0,001 инфекционных единиц на клетку (ТЦД₅₀) — в лунки, в которые был внесен препарат и в контрольные без препарата. В динамике культивирования оценивается развитие цитопатического действия вируса и отбирают пробы культуральной среды, которые хранят при температуре –20 °С для исследования на содержание инфекционного вируса. Все исследования выполняются на не менее чем 4 культурах эндотелия, полученных от разных доноров.

На этой модели была определена способность ряда препаратов индуцировать интерферон, цитокины, растворимые медиаторы — маркеры, характеризующие основные проявления функциональной активности эндотелия сосудов, а также вызывать развитие антивирусного состояния.

1. Маркер антивирусной активности — интерферон.
2. Маркеры иммуномодулирующей активности — цитокины.
3. Маркеры воспалительного процесса:
 - а) цитокины, б) молекулы клеточной адгезии.
4. Маркеры регуляции тонуса сосудов — оксид азота и эндотелин-1.
5. Маркер коагулянтной активности — фактор вон Виллебранда.
6. Маркер ангиогенеза — матриксная металлопротеиназа 1 типа.
7. Развитие антивирусного состояния — подавление репродукции вируса простого герпеса 1 типа.

2.6. Оборудование, инструменты и реактивы

1. Оборудование:
 - CO₂ инкубатор;
 - центрифуга низкоскоростная;
 - мультискан;
 - шейкер с терморегуляцией;
 - вошер;
 - водяная баня.
2. Инструменты:
 - конюли стеклянные диаметром 6 мм;
 - соединительные силиконовые трубки диаметром 8 мм;

- пипетки автоматические с постоянным или переменным объемом;
- шприцы 10 мл;
- ножницы;
- пинцеты;
- корнцанги;
- марлевые салфетки;
- шпагат;
- флаконы пластиковые стерильные для выращивания клеток;
- пробирки пластиковые стерильные объемом 10 мл и 50 мл;
- планшеты пластиковые культуральные стерильные 24-луночные;
- планшеты пластиковые культуральные стерильные 96-луночные;
- чашки Петри пластиковые, диаметром 10 см;
- парафильм;
- флаконы стерильные 0,5 л;
- наконечники к автоматическим пипеткам стерильные.

3. Реактивы:

- среда 199 (Gibco);
- физиологический раствор;
- среда RPMI-1640;
- L-глутамин 2 mM;
- гепарин;
- сыворотка эмбрионов коров (HyClone);
- гентамицин;
- фактор роста;
- диспаза (Sigma);
- трипсин-ЕДТА (GIBCO).

2.7. Растворители и разбавители

Для растворения исследуемого образца необходимо использовать растворители, заявленные создателями препарата. В качестве разбавителя необходимо использовать как растворители, заявленные создателями препарата, так и среду роста клеток эндотелия.

2.8. Дозы, пути и режимы введения

При исследовании активности препарата доза вводимого в культуру препарата определяется токсичностью препарата и должна быть меньше токсической для культуры дозы. Препарат вводится в среде роста за 24 ч до введения вируса при исследовании интерферониндуцирующего и антивирусного действия препарата и за 24 ч до отбора материала для выполнения остальных исследований.

2.9. Продолжительность исследования

Исследование выполняется в течение 3 недель.

2.10. Рекомендации по выбору препарата сравнения

В качестве препарата сравнения для характеристики интерферониндуцирующих и антивирусных свойств препарата может быть использован препарат эрбисол, для характеристики остальных свойств препарата может быть использован рекомбинантный интерферон гамма человека.

3. Исследование интерферониндуцирующей активности

лекарственных средств, влияющих на эндотелий кровеносных сосудов

Цель эксперимента заключается в выявлении способности препарата индуцировать в культуре ЭКПВЧ продукцию интерферона. Задача эксперимента заключается в опреде-

лении дозы препарата, индуцирующей максимальную продукцию интерферона ЭКПВЧ. Культуру ЭКПВЧ засевают в 6 лунок 24-луночного планшета из расчета 120 тыс. клеток в мл в одну лунку. Засевают сразу четыре культуры, полученные от разных доноров. На 4 день после образования монослоя среду из лунок удаляют и вносят в 4 лунки каждого типа клеток последовательные разведения исследуемого вещества в среде роста. В одну лунку каждого типа клеток вносят ВБН в среде роста (контроль индукции интерферона — ИФН) и в одну лунку каждого типа клеток вносят только среду роста (контроль). После 24 ч культивирования клеток в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C с 5% CO_2 отбирают пробы культуральной среды, которые хранят до тестирования при температуре -20°C .

Отобранные образцы культуральной среды тестируют на содержание ИФН общепринятым методом в культуре диплоидных фибробластов человека (ДФЧ), засеянных на 96 луночные планшеты, по торможению развития цитопатического действия 100 ТЦД₅₀ инфекционных доз вируса энцефаломиокардита мышей (ВЭММ). Эксперимент продолжается в течение 3 недель. Уровень ИФН выражают в единицах, обратных последнему разведению образца, тормозящего на 50% развитие цитопатического действия ВЭММ. Результаты 4 экспериментов обрабатывают статистически по методу Стьюдента и представляют в ЕД/мл вместе с результатами, полученными при исследовании контроля индукции ИФН (ВБН).

Результаты, полученные в эксперименте, дают возможность оценивать интерферон-индуцирующую активность препарата в культуре ЭКПВЧ и в более широком смысле — в эндотелии кровеносных сосудов в организме и указывают на возможность защиты этим препаратом эндотелия сосудов и других клеточных систем организма от вирусного инфицирования.

4. Исследование противовирусной активности

лекарственных средств, влияющих на эндотелий кровеносных сосудов

Цель эксперимента заключается в выявлении способности препарата тормозить репродукцию ВПГ-1. Задача эксперимента заключается в выявлении оптимальной дозы препарата, ингибирующей репродукцию ВПГ-1. Каждую из четырех культур ЭКПВЧ, полученных от разных доноров, засевают в 6 лунок 24-луночного планшета из расчета 120 тыс. клеток в мл в среде роста в одну лунку. На 4 день после образования монослоя среду из лунок удаляют и вносят в 4 лунки каждого типа клеток последовательные разведения исследуемого вещества в среде роста. В две лунки каждого типа клеток вносят только среду роста (контроль). После 24 ч культивирования клеток в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C с 5% CO_2 среду из всех лунок удаляют и в лунки, инкубировавшиеся с препаратом, и в одну контрольную лунку каждого типа клеток вносят ВПГ-1 с множественностью инфицирования 0,001 ТЦД₅₀/клетку в среде роста; в контрольные лунки вносится только среда. В динамике культивирования клеток: через 24, 48 и 72 ч отбирают образцы культуральной среды и хранят до тестирования при температуре -20°C .

Для тестирования инфекционной активности вируса в 96-луночные планшеты засевают культуру клеток почек зеленой мартышки VERO из расчета 100 тыс. клеток/мл. После культивирования клеток в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C с 5% CO_2 среду из всех лунок удаляют и в лунки вносят последовательные десятикратные разведения образцов. Учет результатов осуществляется на 4 день культивирования клеток VERO. Эксперимент продолжается в течение 3 недель. Инфекционную активность вируса выражают в обратных десятичных логарифмах. Результаты 4 экспериментов обрабатывают статистически по методу Стьюдента. Антивирусную активность препарата представляют в виде разницы между титром вируса в контрольных, не обработанных препаратом ЭКПВЧ, и титром вируса в ЭКПВЧ, обработанных минимальной и максимальной дозой препарата.

Результаты, полученные в эксперименте, дают возможность оценивать антивирусную активность препарата в культуре ЭКПВЧ и в более широком смысле — в эндотелии кро-

веносных сосудов в организме — и указывают на возможность защиты этим препаратом эндотелия сосудов и других клеточных систем организма от вирусного инфицирования.

5. Исследование иммуномодулирующей активности лекарственных средств, влияющих на эндотелий кровеносных сосудов

Цель эксперимента заключается в выявлении способности препарата индуцировать или ингибировать в культуре ЭКПВЧ продукцию цитокинов. Задача эксперимента заключается в определении дозы препарата, оказывающей индуцирующий или ингибирующий эффект на продукцию цитокинов ЭКПВЧ. Культуру ЭКПВЧ засевают в 6 лунок 24-луночного планшета из расчета 120 тыс. клеток в мл в одну лунку. Засевают сразу четыре культуры, полученные от разных доноров. На 4 день после образования монослоя среду из лунок удаляют и вносят в 4 лунки каждого типа клеток последовательные разведения исследуемого вещества в среде роста. В одну лунку каждого типа клеток вносят ИФН гамма (1×10^4 МЕ/мл) в среде роста (контроль иммуномодулирующего действия) и в одну лунку каждого типа клеток вносят только среду роста (контроль). После 24 ч культивирования клеток в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C с 5% CO_2 отбирают пробы культуральной среды, которые хранят до тестирования при температуре -20°C .

Отобранные образцы культуральной среды тестируют на содержание цитокинов в тест-системах. Эксперимент продолжается в течение 3 недель. Уровень цитокинов в исследовании выражают в процентах относительно уровня цитокинов в контроле. Результаты 4 экспериментов обрабатывают статистически по методу Стьюдента и представляют в процентах вместе с результатами, полученными при использовании контроля индукции цитокинов (ИФН гамма).

Результаты, полученные в эксперименте, дают возможность оценивать иммуномодулирующую активность препарата в культуре ЭКПВЧ и в более широком смысле — в эндотелии кровеносных сосудов в организме и указывают на участие эндотелия сосудов в системе иммуномодуляции в организме.

6. Исследование про- и противовоспалительной активности лекарственных средств, влияющих на эндотелий кровеносных сосудов

Цель эксперимента заключается в выявлении способности препарата индуцировать в культуре ЭКПВЧ продукцию провоспалительных цитокинов, которые активируют экспрессию молекул клеточной адгезии (МКА) на эндотелии и запускают рекрутирование лейкоцитов крови при воспалении.

Задача эксперимента заключается в определении дозы препарата, индуцирующей максимальную и минимальную продукцию цитокинов ЭКПВЧ и максимальное и минимальное отщепление МКА. Культуру ЭКПВЧ засевают в 6 лунок 24-луночного планшета из расчета 120 тыс. клеток в мл в одну лунку. Засевают сразу четыре культуры, полученные от разных доноров. На 4 день после образования монослоя среду из лунок удаляют и вносят в 4 лунки каждого типа клеток последовательные разведения исследуемого вещества в среде роста. В одну лунку каждого типа клеток вносят ИФН гамма (1×10^4 МЕ/мл) в среде роста (контроль продукции цитокинов и отщепления МКА) и в одну лунку каждого типа клеток вносят только среду роста (контроль). После 24 ч культивирования клеток в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C с 5% CO_2 отбирают пробы культуральной среды, которые хранят до тестирования при температуре -20°C .

Отобранные образцы культуральной среды тестируют на содержание цитокинов и растворимых (отщепившихся) МКА в тест-системах. Эксперимент продолжается в течение 3 недель. Содержание всех показателей в исследовании выражают в процентах относительно уровня этих же показателей в контроле. Результаты 4 экспериментов обрабатывают статистически по методу Стьюдента и представляют в процентах вместе с результатами, полученными при использовании контроля индукции цитокинов и отщепления МКА (ИФН гамма).

Результаты, полученные в эксперименте, дают возможность оценивать про- и противовоспалительную активность препарата в культуре ЭКПВЧ и в более широком смысле — в эндотелии кровеносных сосудов в организме и указывают на возможность регулирования этим препаратом воспалительного процесса в организме.

7. Исследование способности лекарственных средств, влияющих на эндотелий кровеносных сосудов, активировать продукцию вазодиллятора и вазоконстриктора

Цель эксперимента заключается в выявлении способности препарата индуцировать в культуре ЭКПВЧ продукцию вазодиллятора и вазоконстриктора. Задача эксперимента заключается в определении дозы препарата, активирующую или ингибирующую продукцию ЭКПВЧ вазодиллятора оксида азота и вазоконстриктора эндотелина-1. Культуру ЭКПВЧ засевают в 6 лунок 24-луночного планшета из расчета 120 тыс. клеток в мл в одну лунку. Засевают сразу четыре культуры, полученные от разных доноров. На 4 день после образования монослоя среду из лунок удаляют и вносят в 4 лунки каждого типа клеток последовательные разведения исследуемого вещества в среде роста. В одну лунку каждого типа клеток вносят ИФН гамма (1×10^4 МЕ/мл) в среде роста (контроль продукции оксида азота и эндотелина-1) и в одну лунку каждого типа клеток вносят только среду роста (контроль). После 24 ч культивирования клеток в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C с 5 % CO_2 отбирают пробы культуральной среды, которые хранят до тестирования при температуре -20°C .

Отобранные образцы культуральной среды тестируют на содержание нитритов — стойких метаболитов оксида азота и эндотелина-1. Эксперимент продолжается в течение 3 недель. Содержание всех показателей в исследовании выражают в процентах относительно уровня этих же показателей в контроле. Результаты 4 экспериментов обрабатывают статистически по методу Стьюдента и представляют в процентах вместе с результатами, полученными при использовании контроля индукции оксида азота и вазоконстриктора эндотелина-1 (ИФН гамма).

Результаты, полученные в эксперименте, дают возможность оценивать способность препарата индуцировать в культуре ЭКПВЧ продукцию вазодиллятора и вазоконстриктора и в более широком смысле — в эндотелии кровеносных сосудов в организме и указывают на возможность влияния препарата как на тонус сосудов, так и на противовоспалительные события соответственно в организме.

8. Исследование способности препарата влиять на продукцию фактора коагулянтной активности — фактора вон Виллебранда

Цель эксперимента заключается в выявлении способности препарата активировать или ингибировать продукцию фактор вон Виллебранда культурой ЭКПВЧ. Задача эксперимента заключается в определении дозы препарата, активирующей или ингибирующей продукцию фактор вон Виллебранда культурой ЭКПВЧ. Культуру ЭКПВЧ засевают в 6 лунок 24 луночного планшета из расчета 120 тыс. клеток в мл в одну лунку. Засевают сразу четыре культуры, полученные от разных доноров. На 4 день после образования монослоя среду из лунок удаляют и вносят в 4 лунки каждого типа клеток последовательные разведения исследуемого вещества в среде роста. В одну лунку каждого типа клеток вносят ИФН гамма (1×10^4 МЕ/мл) в среде роста (контроль ингибиции продукции фактор вон Виллебранда) и в одну лунку каждого типа клеток вносят только среду роста (контроль). После 24 ч культивирования клеток в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C с 5 % CO_2 отбирают пробы культуральной среды, которые хранят до тестирования при температуре -20°C .

Отобранные образцы культуральной среды тестируют на содержание фактор вон Виллебранда. Эксперимент продолжается в течение 3 недель. Содержание всех показателей в исследовании выражают в процентах относительно уровня этих же показателей

в контроле. Результаты 4 экспериментов обрабатывают статистически по методу Стьюдента и представляют в процентах вместе с результатами, полученными при использовании контроля ингибиции продукции фактор вон Виллебранда (ИФН гамма).

Результаты, полученные в эксперименте, дают возможность оценивать способность препарата влиять на продукцию фактор вон Виллебранда культурой ЭКПВЧ и в более широком смысле — в эндотелии кровеносных сосудов в организме и указывают на возможность влияния препарата на тромбообразование и воспалительный процесс.

9. Исследование способности препарата влиять на продукцию фактора ангиогенеза матриксной металлопротеиназы-1

Цель эксперимента заключается в выявлении способности препарата активировать или ингибировать продукцию матриксной металлопротеиназы-1 культурой ЭКПВЧ. Задача эксперимента заключается в определении дозы препарата, активирующей или ингибирующей продукцию ЭКПВЧ матриксной металлопротеиназы-1 культурой. Культуру ЭКПВЧ засевают в 6 лунок 24-луночного планшета из расчета 120 тыс. клеток в мл в одну лунку. Засевают сразу четыре культуры, полученные от разных доноров. На 4 день после образования монослоя среду из лунок удаляют и вносят в 4 лунки каждого типа клеток последовательные разведения исследуемого вещества в среде роста. В одну лунку каждого типа клеток вносят ИФН гамма (1×10^4 МЕ/мл) в среде роста (контроль ингибиции продукции матриксной металлопротеиназы-1) и в одну лунку каждого типа клеток вносят только среду роста (контроль). После 24 ч культивирования клеток в CO_2 инкубаторе при температуре 37°C с 5% CO_2 отбирают пробы культуральной среды, которые хранят до тестирования при температуре -20°C .

Отобранные образцы культуральной среды тестируют на содержание матриксной металлопротеиназы-1. Эксперимент продолжается в течение 3 недель. Содержание всех показателей в исследовании выражают в процентах относительно уровня этих же показателей в контроле. Результаты 4 экспериментов обрабатывают статистически по методу Стьюдента и представляют в процентах вместе с результатами, полученными при использовании контроля ингибиции продукции матриксной металлопротеиназы-1 (ИФН гамма).

Результаты, полученные в эксперименте, дают возможность оценивать способность препарата влиять на продукцию матриксной металлопротеиназы-1 культурой ЭКПВЧ и в более широком смысле — в эндотелии кровеносных сосудов в организме и указывают на возможность влияния препарата на ангиогенез, воспалительный процесс, репарацию тканей организма, антиканцерогенез.

10. Интерпретация результатов

Выполнение методических рекомендаций в полном объеме дает комплексную характеристику исследуемого препарата.

Способность исследуемого препарата индуцировать продукцию интерферона в культуре эндотелия характеризует его противовирусные свойства, которые в организме могут реализоваться как местно — в эндотелии сосудов, предотвращая его инфицирование, так и на системном уровне. Подавление репродукции вируса простого герпеса 1 типа под воздействием препарата указывает на специфический противовирусный потенциал препарата. Активация продукции цитокинов характеризует иммуномодулирующий потенциал препарата, т. е. влияние на процессы сначала клеточного, а затем и гуморального иммунитета. Активация продукции провоспалительных цитокинов под воздействием препарата является показателем того, что под их влиянием произойдет активация экспрессии МКА на эндотелии и начнется процесс миграции лейкоцитов — первого этапа воспаления, цель которого заключается в элиминации патогена. Увеличение уровня растворимых МКА указывает на регуляцию препаратом рекрутирования лейкоцитов и их миграции в очаг воспаления; значительная степень увеличения уровня растворимых МКА указывает на

возможность значительного уменьшения под воздействием препарата миграции лейкоцитов, т.е. этот факт отражает противовоспалительное действие препарата. Увеличение продукции вазодилататоров является показателем способности препарата снижать артериальное давление, тогда как увеличение продукции вазоконстрикторов приводит к увеличению артериального давления. Кроме этого, активация продукции вазодилатора оксида азота указывает на противовоспалительное действие препарата по принципу обратной связи, тогда как активация продукции вазоконстриктора приводит к активации воспаления. Увеличение уровня фактора вон Виллебранда является протромботической характеристикой препарата, тогда как уменьшение уровня фактора вон Виллебранда указывает на антитромботическое действие препарата. Увеличение уровня матриксной металлопротеиназы 1 типа характеризует препарат как ангиогенный, тогда как ее уменьшение указывает на антиангиогенные свойства препарата.

Заключение

Метод оценки действия фармпрепаратов и химических соединений на функциональное состояние эндотелия кровеносных сосудов, представленный в данных Методических рекомендациях, является достаточно простым и надежным. Этот метод оценки дает возможность наиболее полно и разносторонне охарактеризовать как вновь синтезируемые вещества при их скрининге, так и уже используемые фармпрепараты по результатам воздействия на основные показатели функциональной активности эндотелия сосудов: интерферониндуцирующую, противовирусную и иммуномодулирующую активности, анти- и провоспалительный процесс, тромбообразование, тонус сосудов, ангиогенез. Результатом такой оценки является выявление специфических свойств веществ, влияющих на функциональную активность эндотелия при скрининге и расширение показаний для использования уже известных фармпрепаратов и их комбинаций в клинической практике.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Велично Г.Н., Шуляк А.Ф., Склянкина Н.Н., Щегловитова О.Н. Культура клеток эндотелия кровеносных сосудов — модельная система для оценки лекарственных препаратов // Цитология, 2009. — 151, 757.
2. Ершов Ф.И., Система интерферона в норме и при патологии. — М.: Медицина, 1996.
3. Кеглинский С.А., Симбирцев А.С. Цитокины. — СПб.: Фолиант, 2008. — 3.
4. Щегловитова О.Н., Куроптева З.В., Наглер Л.Г., Склянкина Н.Н., Болдырева Н.А., Байдер Л.М., Молдашев Ж.Т. Влияние интерферона α на продукцию оксида азота клетками эндотелия сосудов человека, инфицированными вирусом простого герпеса 1 типа // Иммунология, 2009. — 30, 5, 279–282.
5. Соловьев В.Д., Бектемиров Т.А. Интерфероны в теории и практике медицины. — М.: Медицина, 1981.
6. Щегловитова О.Н. Межклеточные взаимодействия в сосудистой стенке — первые шаги в регуляции гомеостаза и в патогенезе заболеваний. Интерферону — 50 лет. — М., 2007.
7. Beilke M.A. Vascular endothelium in immunology and infectious diseases. Rev. Infect. Dis. 1989, 41, 273–283.
8. Biederman B.C. Vascular endothelium: checkpoint for inflammation and immunity. New Physiol Sci 2001; 16: 84–88;
9. Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., et al. Endothelial cells in the physiology of Vascular Disorders. J of Amer Soc Hemathol 1998; 91: 3527–3561.
10. Garton K.J., Gough P.J., Raines E.W. Emerging role for ectodomain shedding in the regulation of inflammatory responses. J Leukemic Biol 2006; 79: 1105–1116.

11. Jaffe E.A., Nachman R.L., Becker C.G., Minick C.R. Culture of human endothelial cells derived from umbilical vein-identification by morphologic and immunologic criteria. *J. Clin Invest* 1979; 52: 2745–2756.
12. Pober J.S., Cotran R.S. Cytokines and Endothelial cell Biology. *Physiol. Rev.* 1990, 70, 2, 427–451.
13. Tedgui A, Mallat Z. Anti-inflammatory Mechanisms in the Vascular Wall. *Circ Res* 2001; 88: 877–887.
14. Smith C.W., Adhesion molecules and receptors. *J. Allergy Clin Immunol* 2008; 121: 8375–8379.
15. Vestweber D. Endothelial cell contacts in inflammation and angiogenesis. *International Congress Series* 2007; 1302: 17–25.
16. Witkowska A.M., Borawska M.H.. Soluble intercellular adhesion molecule-1 (sICAM-1): an overview. *Eur Cytok Netw* 2004; 15: 91–98.
17. Wong D., Prameya R., Dorovini-Zis K. Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differently regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *J Neuroimmunology* 2007; 184: 136–148.

ГЛАВА 26

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ГИПОЛИПИДЕМИЧЕСКОГО И АНТИСКЛЕРОТИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. В.Е. Рыженков; д. м. н., проф. В.Г. Макаров;
д. м. н. О.В. Ремезова; к. б. н. М.Н. Макарова*

Введение

До настоящего времени основной причиной большой инвалидизации и смертности населения в экономически развитых странах, в том числе в России, являются сердечно-сосудистые заболевания, в основе которых лежит атеросклероз.

Многочисленные экспериментальные, клинические и эпидемиологические исследования позволили выделить факторы риска (ФР) развития атеросклероза и его осложнений — ишемической болезни сердца (ИБС), поражений артерий головного мозга и нижних конечностей. Среди них — нарушение липидного и липопротеинового (ЛП) обменов (дислиппротеинемии атерогенного характера). При этом наиболее существенным является увеличение в крови атерогенных липопротеинов: а) ЛП низкой плотности (ЛПНП или бета-ЛП), отражающееся в нарастании общего холестерина (ХС) в крови и в этом классе ЛП; б) липопротеины очень низкой плотности (ЛПОНП или пребета-ЛП), отражающееся в увеличении триацилглицеридов (ТГ) в крови; в) особого липопротеина (ЛПа), липидный состав которого близок ЛПНП, но его апобелок представляет собой гликопротеин, напоминающий плазминоген, что способствует атеротромботическому поражению артерий. Второй важной причиной, способствующей атерогенезу, является снижение в крови антиатерогенных липопротеинов высокой плотности (ЛПВП или альфа-ЛП), отражающееся в уменьшении содержания ХС этого класса ЛП (альфа-ХС). Кроме того, установлено, что высокая атерогенность ЛПНП связана с возможностью их окисления, при этом атерогенез запускают именно окисленные ЛПНП (ок-ЛПНП).

Развитие дислиппротеинемии атерогенного характера обусловлено действием многочисленных неблагоприятных факторов среды, сопутствующими заболеваниями, наследственной предрасположенностью. Одна из важных причин — нарушение функционального состояния печени, которая играет ключевую роль в обмене липидов и ЛП. В печени синтезируются ХС, ТГ, насцентные (до конца не сформированные) ЛПВП, ЛПОНП, желчные кислоты, а также аполиппротеины. В печени сосредоточено около 70% рецепторов, акцептирующих атерогенные ЛП (апо В, Е-рецепторы), и только в ней имеется ферментная система окисления ХС (7-альфа-холестерингидроксилаза).

На коррекцию названных нарушений направлено действие гиполипидемических средств. Особенно благоприятным считается эффект гиполипидемического препарата, если наряду со снижением повышенного уровня общего ХС и/или ХС ЛПНП наблюдается уменьшение окисления последних, увеличение сниженного содержания ХС ЛПВП (нарастание альфа-ХС), а также нормализация функции печени.

Применение гиполипидемических средств необходимо и при таких заболеваниях, как сахарный диабет и гипотиреоз, при метаболическом синдроме, а также при трансплантации органов и коронарном шунтировании, так как в этих случаях развивается дислиппротеинемия атерогенного характера, значительно утяжеляющая течение основного

заболевания и послеоперационного периода, а при сахарном диабете выступающая в качестве одной из причин большой смертности от осложнений атеросклероза.

Кроме названных ФР развития атеросклероза в последнее время большое значение придается раннему развитию дисфункции эндотелия артерий, что связано со снижением образования защитных факторов, преимущественно оксида азота (NO) из его предшественника L-аргинина в результате снижения активности эндотелиальной синтазы NO (e-NOS). Одной из причин может быть нарушение синтеза или восстановления ключевого кофермента тетрагидробиоптерина, что наряду со снижением синтеза NO приводит к избыточной продукции супероксид-анион радикала и образованию токсичного для клеток пероксинитрита.

Подобный дисбаланс функционирования eNOS наблюдается у пожилых людей, при развитии гипертонической болезни, ИБС, сахарного диабета. Избыточная продукция супероксиданион радикала и пероксинитрита активирует ядерный транскрипционный фактор каппа В (NF-κB), который инициирует образование провоспалительных цитокинов и медиаторов. В результате происходит увеличение проницаемости артериальной стенки для компонентов крови, в том числе и для атерогенных ЛП. Активированные макрофаги взаимодействуют с ок-ЛПНП как посредством неспецифических, ненасыщаемых сквенджер-рецепторов, так и специфических экспрессирующихся лектиноподобных рецепторов LOX-1, что способствует выработке молекул адгезии и последующей седиментации макрофагов на поверхности сосудов. Со временем макрофаги переполняются липидами и превращаются в пенистые клетки, формируя атеросклеротические бляшки на стенке сосудов.

Окончательное формирование атеросклеротической бляшки (в частности ее капсулы) происходит при экспрессии генов пролиферации интимы артерий, особенно гладкомышечных клеток с последующей их миграцией в места образования пенистых клеток.

Эти механизмы атерогенеза обуславливают поиск средств, препятствующих метаболическим нарушениям артериальной стенки и способных ингибировать ее воспаление, в том числе посредством влияния на названные рецепторные механизмы.

1. Экспериментальное изучение новых веществ гиполипидемического и/или антиатеросклеротического действия

Липидный и липопротеиновый спектры сыворотки крови экспериментальных животных разных видов различаются (у крыс много ХС содержится в антиатерогенных ЛПВП, у морских свинок почти полностью — в атерогенных ЛП, у кроликов ХС более равномерно распределен между фракциями ЛП). В этой связи для более объективной оценки гиполипидемического действия новых веществ исследования рекомендуется проводить на 2–3 видах животных.

Экспериментальное изучение новых веществ проводится в сравнении с референтными препаратами, применяемыми в качестве гиполипидемических средств. Выбор препарата сравнения связан с химическим строением нового соединения и с предполагаемым механизмом действия. Так, при изучении новых веществ с возможной способностью связывать желчные кислоты в кишечнике и выводить их из организма в качестве препарата сравнения широко используется желчный секвестрант холестирамин. Для новых соединений с возможным преимущественным действием на повышенное содержание ТГ и соответственно ЛПОНП наиболее широко используются фибраты, например, безафибрат, ципрофибрат или фенофибрат. Если же изучаемое соединение может ингибировать биосинтез ХС, то в качестве препарата сравнения применяют ловастатин (мевакор) или флувастатин.

В опытах *in vitro* на клетках млекопитающих или тест-системах данные ингибиторы применяются в виде субстанций и часто входят в состав тест-системы. Так, например, в состав тест-системы фирмы Sigma по исследованию активности НМГ-СоА редуктазы входит правастатин.

Предварительно определяется острая токсичность новых веществ и для исследования избирается одна и та же часть от ЛД₅₀ (но не более 1/10 части) как нового, так и референтного препарата.

Используются разные модели индуцирования гиперлипидемии и дислипидемии у животных разных видов. Исследуется способность нового соединения оказывать как профилактическое, так и лечебное действие.

Профилактическое действие связано со способностью изучаемого соединения снижать (или полностью предупреждать) развитие гиперлипидемии и дислипидемии, а также атеросклеротического повреждения артерий. В этих случаях изучаемое соединение вводится предварительно — в течение нескольких дней перед применением агента, индуцирующего развитие названных нарушений. Кроме того, считаются профилактическим действием результаты, полученные при одновременном применении изучаемого нового вещества с агентом, приводящим к развитию нарушений липидного обмена и/или атеросклероза (например, атерогенной диеты).

Лечебным действием изучаемого препарата является его способность снижать уже развившуюся гиперлипидемию или оказывать регрессию сформировавшегося атеросклеротического поражения артерий. В этом случае изучаемое новое соединение начинают вводить после развития названных патологий.

Особенностью изучения специфической гиполипидемической активности новых веществ является обязательное внутрижелудочное их введение животным, так как препараты этой группы применяются, как правило, перорально. В случае исследования активности готовой лекарственной формы нового соединения, например таблеток, учитывается содержание действующего начала, а также количество и состав вспомогательных веществ. Последние вводятся контрольной группе животных в количестве, соответствующем введению их получающей ЛС группе в составе таблеток.

Определение содержания основных липидов — общего ХС, а-ХС, ТГ в сыворотке крови, общего ХС и ТГ в печени, общего ХС в ткани аорты проводится после экстракции их органическими растворителями с помощью общепринятых, описанных в литературе методов. При возможности используются автоматизированные методы. Можно рекомендовать применение стандартизированных наборов, имеющихся в продаже, для определения общего ХС, а-ХС, ТГ. Изучение спектра ЛП сыворотки крови проводится описанными в литературе методами — электрофорезом сыворотки крови в полиакриламидном геле или на бумаге, ультрацентрифугированием ее в соответствующем градиенте плотности калия бромида. Ориентировочно можно использовать метод осаждения суммарной фракции ЛПНП + ЛПОНП из сыворотки крови гепарином в присутствии Mn^{2+} , причем после центрифугирования в супернатанте остаются ЛПВП. Определение в этих фракциях ХС позволяет дифференцировать его содержание в атерогенных (апо В-содержащих) ЛП и в антиатерогенных ЛПВП (а-ХС). Эта процедура позволяет определить и степень пероксидации атерогенных и антиатерогенных ЛП путем изучения содержания окисленных продуктов в соответствующих фракциях. Последнее имеет значение для дополнительной характеристики спектра действия нового препарата.

1.1. Изучение гиполипидемической активности новых веществ в исследованиях на крысах

Для индуцирования гиперлипидемии у крыс применяют несколько способов:

1). С целью скрининга гиполипидемической активности новых соединений применяют поверхностно-активные вещества (например, внутрибрюшинное введение Твина-80 в дозе 200 мг/100 г веса), что приводит к быстрому (через 8–10 ч) увеличению уровня липидов в крови (особенно ТГ) и снижению а-ХС. Масса тела животных должна быть 350–400 г (14–18 недель), так как у молодых животных гиперлипидемия трудно воспроизводится этим способом. Исследуемые вещества вводят перорально, одновременно с твином или предварительно, в течение 6–10 дней. Кровь получают у голодавших животных. В сыворотке крови определяют содержание общего ХС, а-ХС, ТГ, в печени — ХС и ТГ.

2). Одним из широко применяемых способов индуцирования гиперлипидемии у крыс является длительное (2–3 недели) применение диеты, содержащей ХС (3%), хо-

левую кислоту (0,5%) и растительное масло, предварительно прогретое при высокой температуре в течение 5 ч и охлажденное. Иногда в диету добавляют витамин D₂, способствующий липидозу аорты. Сроки применения гиперлипидемической диеты могут варьировать в зависимости от изменений состава ингредиентов. Животных подвергают эвтаназии через 14–18 ч голодания. Этот срок необходим для исключения возможности влияния диеты на содержание липидов (особенно ТГ) в крови. Данная модель гиперлипидемии варьирует как по соотношению ингредиентов в диете, так и по длительности ее применения. Изучают содержание липидов и ЛП в сыворотке крови и липидов в печени, ХС в ткани аорты, степень пероксидации ЛПНП. Поскольку в основе патогенеза атеросклероза и желчекаменной болезни лежат одни и те же алиментарные факторы риска, то применение такой диеты позволяет изучать не только развитие атеросклероза, но и нарушения в системе гепатоэнтеральной циркуляции желчи и токсическое повреждение печени, что является предпосылками для развития желчекаменной болезни. Основными критериями для такой оценки являются скорость экскреции и состав желчи.

1.2. Оценка эффективности новых веществ в исследованиях на морских свинках

В исследовании используются самцы животных с массой тела 300–400 г, которым вводят 2 мл смеси ХС (0,5 г/кг) с жирами (свиной жир и предварительно прогретое подсолнечное масло, в соотношении 4:1) через зонд в ротовую полость. Продолжительность исследований 16–18 дней. После 12–14 часового голодания животных помещают в СО₂ камеру до потери сознания и эвтаназируют путем стерильного забора крови из полостей сердца. Содержание липидов определяют в сыворотке крови и печени, ЛП — в сыворотке крови. Кроме того, определяют степень пероксидации ЛПНП. У морских свинок в отличие от крыс и кроликов содержание а-ХС в сыворотке крови очень низкое и его трудно определить существующими методами.

1.3. Исследование гиполлипидемического и антиатеросклеротического действия новых веществ в исследованиях на кроликах

Для изучения влияния новых соединений на липидный и ЛП состав крови в условиях гиперлипидемии, а также антиатеросклеротического их действие необходимо проведение исследований на кроликах с исходной массой тела 2,8–3 кг, которым длительно (2–3 мес.) вводится ХС (0,3 г/кг) с пищей или в виде раствора в подсолнечном масле через зонд в желудок.

Спустя 1 месяц введения холестерина для усиления липидоза аорты в диету животных добавляют витамин D₂ (эргокальциферол), раствор в масле 0,0625% в дозе 0,256 мл/кг на протяжении 30 дней.

С целью усиления склеротических изменений в аорте и снижения времени индукции атеросклероза, спустя 1 месяц от начала введения холестерина и на протяжении последующих 30 дней, каждые 5 дней животным вводят адреналин в дозе 0,04 мг/кг веса внутривенно (т.е. 6 инъекций).

В этих условиях, кроме выраженной гиперхолестеринемии и накопления атерогенных ЛП в крови, снижается содержание антиатерогенных ЛПВП. Происходит также увеличение содержания ХС и ТГ в печени и ХС в артериях (в частности в аорте). Кроме того, развивается атеросклеротическое поражение аорты (методом планиметрии регистрируется до 40–50% площади аорты, пораженной атеросклеротическими бляшками).

Данная модель гиперлипидемии и атеросклероза у кроликов, разработанная и описанная впервые академиком Н.И. Аничковым и сотр., широко применяется до настоящего времени при изучении гиполлипидемического и антиатеросклеротического действия новых фармакологических веществ. Эти вещества вводятся на протяжении того же пе-

риода времени, что и ХС. Выясняется их влияние на содержание общего ХС, а-ХС, ТГ в сыворотке крови животных; на содержание ХС в аорте, липидов в печени и оценивается степень атеросклеротического поражения аорты.

При исследовании фармакологического вещества на кроликах количество животных в контрольной и получающих ЛС группах должно быть не менее 6. Это объясняется значительным индивидуальным разбросом липидных показателей у этих животных, а также наличием среди них особей, устойчивых к развитию экспериментальной гиперлипидемии и атеросклероза. Последние по мере выявления должны из исследования исключаться. Для сравнительного изучения активности нового соединения с известным выделяется дополнительная группа кроликов. Кроме того, необходимо выделить контрольную группу (интактные кролики). Желательно изучить действие нового препарата на липиды крови у интактных кроликов, то есть ввести еще одну группу животных. Кровь для исследования берется у кроликов через 12–18 ч голодания.

В случае если под влиянием изучаемого вещества будет установлена та или иная степень снижения атеросклеротического поражения аорты кроликов без существенного влияния на выраженность гиперлипидемии, то данное вещество, вероятно, может снижать ее проницаемость для атерогенных ЛП, т.е. быть похожим по механизму действия на перидинолкарбамат (продектин, пармидин). В зависимости от структурных особенностей исследуемого вещества уменьшение проницаемости аорты для атерогенных ЛП может быть обусловлено или его взаимодействием с атерогенными ЛП (образование комплекса, как это установлено при введении гепарина и структурно близких ему сульфатированных полисахаридов), или влиянием на метаболизм артериальной стенки. Отсюда вытекает необходимость изучения механизма действия подобных соединений с применением соответствующих методик, сравнение их гиполипидемической и антиатеросклеротической активности с известными препаратами.

Изучение механизмов действия новых эффективных веществ, оказывающих нормализующее влияние на нарушенный липидный и ЛП обмены и на развитие атеросклероза, способствует выяснению причин и условий этих нарушений, а также расширению показаний к их применению и созданию соединений с дифференцированным действием.

1.4. Изучение механизма действия новых веществ с гиполипидемическим и антиатеросклеротическим действием

Для этих целей требуется проведение исследований *in vitro* и *in vivo*. Известно, что липолиз и липогенез в жировой ткани играют важную роль в липидном обмене, и угнетение липолиза является существенным в механизме гиполипидемического действия некоторых известных препаратов (например, никотиновой кислоты). В этой связи необходимо изучение липолиза в жировой ткани.

1.4.1. Изучение действия исследуемого вещества на липолиз в жировой ткани в опытах *in vitro* (желательное исследование)

В этих опытах используется жировая ткань или жировые клетки придатка яичника взрослых крыс-самцов, которые инкубируются в специальной среде. Исследуемые вещества добавляются в среду инкубации в разных концентрациях, в зависимости от их химического строения. По интенсивности выделения в среду инкубации неэстерифицированных жирных кислот (НЭЖК) или глицерина оценивается влияние нового вещества на липолиз. В качестве препарата сравнения применяется никотиновая кислота.

1.4.2. Изучение влияния нового вещества на концентрацию НЭЖК в крови

Концентрация НЭЖК в крови может служить отражением интенсивности липолиза в жировой ткани. В исследование берутся крысы-самцы (170–200 г), которым для стиму-

ляции липолиза в жировой ткани вводится внутривенно адреналин (1,0–1,5 мг/кг). Через 30 мин после инъекции адреналина определяется уровень НЭЖК в плазме (сыворотке) крови. Испытуемые вещества вводятся перорально однократно за 1–2 ч до инъекции адреналина или предварительно в течение 3–5 дней (последнее введение — за 1–2 ч до инъекции адреналина). Учитывая дифференцированный характер аденилициклазных систем в жировой ткани желательнее дополнительно исследовать влияние новых веществ на липолиз, вызванный введением адренокортикотропного гормона (АКТГ) и теофиллина.

1.4.3. Изучение связывания желчных кислот

Известно, что гипополипидемическое действие желчных секвестрантов осуществляется путем связывания в кишечнике желчных кислот (продуктов деградации ХС в печени) и выведения их из организма. Для определения способности нового соединения связывать желчные кислоты проводятся исследования *in vitro*.

К 2 мл 4%-ного водного раствора соли желчной кислоты (холата, гликохолата или таурохолата натрия) добавляется 100 мг испытуемого вещества, растворенного или суспендированного в 1 мл дистиллированной воды. После встряхивания в течение 15 мин и центрифугирования в супернатанте определяют количество соли желчной кислоты, не связанной изучаемым соединением.

1.4.4. Изучение связывания нового вещества с атерогенными липопротеидами

Известно, что гепарин и некоторые полярные полисахариды обладают способностью образовывать с атерогенными ЛП растворимые и нерастворимые комплексы, не проникающие в артериальную стенку. Если в процессе исследования специфической активности нового вещества возникает предположение о наличии у него способности связывать атерогенные ЛП, то желательнее проведение соответствующих опытов *in vitro*. Для этих целей используется сыворотка крови гиперлипидемических животных или человека. К 0,2 мл сыворотки добавляется 2 мл 0,025 М раствора кальция хлорида. Исследуемое вещество (и для сравнения гепарин) вводится в равных концентрациях (до 1%). Кроме того, как желательное исследование рекомендуется проведение исследований с применением выделенных ультрацентрифугированием ЛПНП (человека или животных). Раствор последних насыщают аммониевой солью 8-анилино-1-нафтолсульфонатом, обладающей способностью к флуоресценции. К раствору добавляют изучаемое вещество и по степени уменьшения флуоресценции судят об интенсивности связывания его с ЛПНП. В качестве сравниваемого соединения используется гепарин.

1.4.5. Изучение влияния новых веществ на показатели ПОЛ

Ускорению развития атеросклероза способствует накопление перекисных продуктов как в крови, так и особенно в атерогенных (апо-В-содержащих) ЛП, в основном в ЛПНП. Антиатеросклеротическое действие ряда препаратов во многом объясняется их антиоксидантными свойствами. В этой связи можно рекомендовать изучение влияния новых веществ на показатели ПОЛ (диеновые конъюгаты, малоновый диальдегид) как в сыворотке крови, так и в атерогенных ЛП. Содержание продуктов ПОЛ увеличивается в условиях экспериментальной гиперлипидемии и дислипидемии. Выделение апо-В-содержащих ЛП проводится с помощью описанных в литературе методов — ультрацентрифугированием или путем связывания и осаждения их из сыворотки крови гепарином в присутствии Mn^{2+} .

1.4.6. Изучение влияния новых соединений на активность постгепариновой липолитической активности крови (липопротеинлипазы)

Если при исследовании нового вещества будет обнаружено выраженное снижение ТГ и ЛПОНП в крови животных, то для выяснения механизма его действия желательнее

изучить влияние препарата на липолитическую активность (липопротеинлипазу) крови, поскольку последняя стимулирует гидролиз ЛП, богатых ТГ. Для этих целей используются крысы-самцы (200–250 г) или кролики-самцы (2,5–3 кг), которым предварительно перорально вводится изучаемое соединение (однократно или в течение недели), затем внутривенно гепарин (20–50 ед/кг массы тела). Берут исходную пробу крови и пробу через 10 мин после введения гепарина. В этих пробах крови определяют активность липопротеинлипазы (постгепариновую липолитическую активность крови). В контрольных исследованиях вводится равный объем растворителя изучаемого вещества.

1.4.7. Характеристики механизма гиполипидемического действия

Для характеристики механизма гиполипидемического действия нового соединения исследуется по возможности его влияние на ключевой фермент биосинтеза ХС β -гидрокси- β -метилглутарил-коэнзим-А-редуктазу, а также на 7- α -холестерингидроксилазу, с использованием соответствующих методик, описанных в литературе и тест-систем.

1.4.8. Изучение влияния нового соединения на экскрецию желчных кислот и холестерина

При исследовании механизма гиполипидемического действия нового вещества о способностью к связыванию желчных кислот в кишечнике (как это наблюдается при применении официальных желчных секвестрантов) необходимо проведение исследований на крысах, морских свинках или кроликах.

С этой целью животные помещаются на диету (на 2–3 недели), содержащую ХС (3%), холевую кислоту (0,5%) и растительное масло, предварительно прогретое при высокой температуре в течение 5 ч и охлажденное, как описано выше. В конце исследования, после 14–18 ч голодания, животным под наркозом катетеризируют желчный проток, осуществляют забор желчи в течение 15 мин, рассчитывают скорость экскреции желчи. В полученной желчи анализируют содержание холевой, дезоксихолевой, хенодезоксихолевой кислот, холестерина, рассчитывают индекс литогенности.

1.4.9. Исследование действия новых веществ, не обладающих гиполипидемическим действием, но оказывающих антиатеросклеротический эффект

В исследованиях на кроликах, получавших ХС и исследуемое вещество, определяется проницаемость аорты. Для этих целей за 1–2 ч до эвтаназии животных им внутривенно вводится краситель (синяя краска Эванса 0,5% раствор, 2 мл) и после извлечения аорты планиметрически определяется площадь окрашивания эндотелия. В контрольных исследованиях вводится растворитель изучаемого вещества.

1.4.10. Изучение сосудистого действия

Пролиферация и миграция активированных гладкомышечных клеток артерий в метаболически и морфологически нарушенные участки артериальной стенки — как следствие влияния факторов риска развития атеросклероза, является завершающим этапом образования атеросклеротической бляшки. Поэтому для выяснения возможного сосудистого действия изучаемого соединения проводят иммуногистохимическое исследование маркеров пролиферации (Ki67), ангиогенеза (CD31(PECAM-1)), про- и антиапоптотических факторов (p53 и Mcl-1) и др. Гистологически оценивают соотношение числа эндотелиоцитов и перицитов в сосудистой стенке.

1.4.11. Исследование противовоспалительной активности

Учитывая существенную роль в атерогенезе воспалительного процесса артериальной стенки, для характеристики нового вещества с выявленной антиатеросклеротической

активностью желателно исследовать его противовоспалительную активность. Для этих целей используют методы иммуноферментного анализа для оценки в гомогенатах сосудов провоспалительных цитокинов (например, TNF- α), а также гистологический и иммуногистохимический анализ сосудистой стенки.

Заключение

Таким образом, перечисленный комплекс методов позволяет выявить специфическую активность нового соединения, в определенной степени выяснить механизм его действия и рекомендовать для клинического изучения в качестве гиполипидемического и/или антиатеросклеротического средства. В то же время в ходе КИ может возникнуть необходимость дополнительных исследований, направленных на выяснение других сторон действия препарата, важных для оптимизации его применения.

Относительно требований, характеризующих общую фармакологическую активность и токсичность новых гиполипидемических и антиатеросклеротических веществ, то изучение их влияния на функциональное состояние ряда органов и систем, определение острой и хронической токсичности проводится по программе, предусмотренной официальными документами Минздравсоцразвития России для всех новых веществ, представляемых для получения разрешения на клиническое изучение.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Андрианова И.П., Рыженков В.Е., Лапук Я.И. и др. Специфическое связывание холестерина энтеросорбентами // *Вопр. мед. химии*, 1986, 2: 80–89.
2. Богданов В.Л., Викторова Е.Н., Веселова Т.В. и др. Флуоресцентный метод регистрации продуктов перекисидации в плазме крови и липопротеидах низкой плотности // *Оптический журнал*, 1995, 11: 89–90.
3. Куфлина С.А., Павлова Т.Н. Эвтанизация экспериментальных животных: Методические рекомендации МЗ СССР. М., 1985.
4. Лопухин Ю.М., Андрианова И.П., Рыженков В.Е. и др. Энтеросорбент с иммобилизованным хлоридом триметиламиноэтанола. I. Гиполипидемические свойства // *Вопр. мед. химии*, 1994, 4(1): 18–20.
5. Макаров В.Г., Рыженков В.Е., Северцева О.В. и др. Гиполипидемическое и антиоксидантное действие концентрата облепихового масла в эксперименте // *Вопр. биол., мед. и фармац. химии*, М., 1998, 3: 42–44.
6. Рыженков В.Е., Соловьева М.А., Ремезова О.В., Окуневич И.В. Гиполипидемическое действие сульфатированных полисахаридов // *Вопр. мед. химии*, 1996, 42(2): 115–119.
7. Фрешни Р. (ред.) *Культура животных клеток. Методы*, М.: Мир, 1989: 332.
8. Esterbauer H., Striegl H., Puhl M. Rotheder Continuous monitoring of *in vitro* oxidation of human low density lipoproteins. *Free Rad. Res. Commun.*, 1989, 6(1): 67–75.
9. Gorren A.C., Sorlie M., Andersen N. et al. Tetrahydrobiopterin as combined electron protein donor in nitric oxide biosynthesis. *Methods Enzymol.*, 2005, 396: 456–460.
10. Hodgin J.B., Maeda N. Minireview: Estrogen and Mouse Models of Atherosclerosis. *Endocrinology*, 2002, 143(12): 4495–4501.
11. Kuron G.W., Grier N., Huff J.W. The bile acid binding and hypocholesterolemic action of two water – soluble polymers. *Atherosclerosis*, 1980, 37(3): 253–360.
12. Lingren F.T., Jensen L.C., Flatch F.T. Blood lipid and lipoproteins quantitation, composition and metabolism. N-Y-London-Sydney, 1972: 181–274.
13. Ross R. Atherosclerosis an inflammatory disease. *New Engl. J. Med.*, 1999, 340(2): 115–126.

ГЛАВА 27

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ВЛИЯЮЩИХ НА ГЕМОСТАЗ

Составители: проф. В.А. Макаров; академик РАМН, проф. А.А. Спасов; д. б. н., проф. М.Б. Плотников; д. м. н. Г.Г. Белозерская; к. б. н. Т.М. Васильева; к. б. н. Н.Н. Дрозд; д. м. н., проф. А.А. Свистунов; к. м. н. А.Ф. Кучерявенко; к. б. н. Л.С. Малыхина; к. м. н. Л.В. Науменко; к. б. н. О.Е. Невердова; д. м. н. Н. Петрухина; д. м. н. О.И. Алиев; д. б. н., проф. Т.М. Плотникова

Введение

Оценку специфической фармакологической активности лекарственных регуляторов функции гемостаза проводят, как правило, в несколько этапов. Первым этапом является изучение действия вещества *in vitro* в плазме. Однако в силу различных причин (биотрансформация препарата в активную форму в организме, непрямой характер действия и др.) отрицательный результат на первом этапе не является причиной «отстранения» вещества от исследования на следующих этапах. Не всегда также положительный результат на первом этапе (в силу быстрой биотрансформации в организме, наличия выраженных побочных эффектов и др.) является залогом возможности успешного использования его эффекта при введении в организм. Второй этап — исследование действия в условиях введения интактному животному. Этот этап позволяет определить время начала, максимума и окончания действия, степень выраженности эффекта под влиянием разных доз, выявить предпочтительные пути введения потенциального ЛС, апробировать способы снятия эффекта исследуемого вещества под влиянием специфических антагонистов или неспецифических мероприятий. В этом случае целесообразно также оценить эффект вещества или лекарственной формы на свертывающую систему крови и фибринолиз, помимо параметров, предназначенных для оценки специфической фармакологической активности. Третий этап — оценка эффекта изучаемой субстанции или лекарственной формы на фоне экспериментальной модели тромбоза или геморрагии (в зависимости от характера активности изучаемого средства).

Для характеристики особенностей действия исследуемых веществ и их активности вызываемые ими эффекты должны быть сравнены с эталонными препаратами. Желательно, чтобы препарат сравнения был близок по химической структуре и механизму действия к изучаемому средству.

Средства, влияющие на функцию гемостаза, делятся на две большие группы — противотромботические и гемостатические средства. Противотромботические средства можно разделить на ингибиторы агрегации тромбоцитов (антиагреганты), антикоагулянты, тромболитические (фибринолитические) средства и средства, влияющие на реологические свойства крови. В соответствии с этой рубрикацией далее описаны методики оценки специфической фармакологической активности исследуемых средств.

1. Исследование специфической фармакологической активности антиагрегантов

Одним из важных факторов в системе гемостаза являются тромбоциты, которым принадлежит ключевая роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Данный факт стимулировал разработку большого количества ЛП. Однако, несмотря на существование широкого спектра антиагрегантных средств, для профилактики и лечения тромботиче-

ских состояний, необходимо создание новых более совершенных препаратов, которые будут угнетать функциональную активность тромбоцитов более эффективно и безопасно, чем это выполняют известные ингибиторы агрегации.

В связи с этим проблема поиска фармакологических ингибиторов агрегации тромбоцитов в настоящее время является весьма актуальной задачей, тем более что расшифровка ключевой роли кровяных пластинок в тромбообразовании позволяет различать антиагрегантные препараты по основным механизмам действия в различных точках прилипания, что способствует прекращению образования тромба на стадии формирования тромбоцитарных агрегатов.

Основной целью исследования специфической фармакологической активности потенциальных антиагрегантов является изучение их действия на склеивание тромбоцитов. Помимо этого в некоторых случаях представляется необходимым определить влияние веществ на изменение количества тромбоцитов и ряд параметров плазменного гемостаза: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), протромбиновое и тромбиновое время, концентрацию фибриногена и т.п. Последнее позволяет оценить риск развития побочных эффектов (таких как кровотечения) при применении исследуемых соединений.

Оценку специфической фармакологической активности потенциальных антиагрегантов необходимо проводить в три этапа:

- 1) оценка антиагрегационных свойств *in vitro*;
- 2) оценка специфической фармакологической активности *in vivo* на интактных животных;
- 3) оценка специфической фармакологической активности *in vivo* с использованием модельных состояний, сопровождающихся повышением агрегации и адгезии тромбоцитов.

Основными путями экспериментального изучения соединений и препаратами, воздействующими на них, являются:

воздействие на баланс тромбоспандина и простаглицлина в организме (ацетилсалициловая кислота, дазоксифен, эпопростенол);

блокирование рецепторов для эндогенных агонистов кровяных пластинок (тиклопидин, клопидогрель);

воздействие на трансмембранный транспорт кальция и перераспределение данных ионов внутри клетки (антагонисты кальция и др.);

повышение уровня цАМФ в тромбоцитах (дипиридамол, теофиллин);

воздействие на мембрану тромбоцитов (ингибиторы гликопротеиновых рецепторов: абциксимаб, эптифибатид, тирофибан).

В последние годы за счет внедрения протеомных и геномных технологий выявлены новые мишени действия антиагрегантных препаратов и прогнозируются новые белковые молекулы, которые участвуют в процессе активации и инактивации тромбоцитов. Однако, несмотря на столь высокотехнологичные методы, потенциальные антиагрегантные средства обязательно должны быть исследованы на животных, с использованием общепринятых и воспроизводимых методов и моделей, для дальнейшего изучения их механизмов действия.

Необходимо отметить, что проведение исследований *«in vitro»* не всегда возможно, так как, например, вещества могут иметь плохую растворимость, оказывать влияние на рН, иметь высокую оптическую плотность и т.д.

Кроме того, такие антиагрегантные средства, как клопидогрель и тиклопидин оказывают свой эффект за счет метаболитов и соответственно действуют только *«in vivo»*. Таким же эффектом обладают некоторые ингибиторы гликопротеиновых рецепторов IIb/IIIa. Однако большинство известных антиагрегантных средств оказывают ингибирующее воздействие на тромбоциты в условиях *«in vitro»*.

1.1. Оценка антиагрегационных свойств *in vitro*

Изучение специфической фармакологической активности потенциальных антиагрегантов предпочтительно проводить с использованием крови здоровых доноров, которые

не принимали ЛП хотя бы в течение месяца, так как очень многие средства могут изменять функциональную активность тромбоцитов (оральные контрацептивы, анальгетики, антибиотики и др.). Также для исследования используют кровь лабораторных животных: кроликов, крыс, собак. Взятие крови должно быть приурочено ко времени исследования, чтобы свести до минимума время хранения проб.

Забор крови должен производиться в специальные пластиковые или силиконированные пробирки, так как в случае использования стеклянных пробирок происходит налипание тромбоцитов на стекло и возникает контактная активация свертывания. Кровь у здоровых доноров забирается утром натощак методом пункции локтевой вены силиконированной иглой с широким просветом (внутренний диаметр 1,0–0,8–0,6 мм) без шприца (самотеком) и без наложения жгута. Первые капли крови не используются, так как в них содержится тканевой тромбопластин. После забора кровь смешивается с антикоагулянтом в соотношении 9:1. В качестве антикоагулянтов могут использоваться цитрат натрия, оксалат натрия или калия, этилендиаминтетраацетат (ЭДТА). Однако трехзамещенный цитрат натрия обладает специфической способностью стабилизировать лабильные факторы свертывания (V и VIII). И именно цитратная плазма, обогащенная тромбоцитами, используется для изучения их агрегации. Использование консервированной крови недопустимо. Взятие крови следует проводить непосредственно перед исследованием, используя стабилизаторы-антикоагулянты: цитрат натрия, двухнатриевую соль этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), гепарин, гирудин и др. Наиболее часто в качестве стабилизатора применяют цитрат натрия (3,8%-ный водный раствор), т.к. он имеет ряд преимуществ перед другими способами стабилизации крови. Для перемешивания крови с цитратом необходимо немедленное 3–4-кратное аккуратное переворачивание закрытой пробирки после ее заполнения до требуемого объема. При этом не допускается образование пены. Нельзя трясти пробу, так как это может вызвать денатурацию белков и активацию тромбоцитов. Раствор цитрата натрия легко подвергается бактериальному загрязнению, ослабляющему его антикоагулянтное действие, в связи с чем его необходимо обновлять не реже одного раза в неделю и хранить в холодильнике во флаконе с плотно притертой пробкой. При заборе кровь смешивается с цитратом натрия в соотношении 9:1.

При исследовании агрегации тромбоцитов наиболее часто используется богатая тромбоцитами плазма. Для приготовления богатой тромбоцитами плазмы кровь сразу после получения (во всяком случае, не позднее чем через 30 мин) центрифугируют в течение 10 мин при 1000 об/мин, после чего верхний слой плазмы переносят в другую пробирку, а остаток центрифугируют в течение 20 мин при 3000 об/мин для получения бестромбоцитарной плазмы. Бедную тромбоцитами плазму используют в качестве оптического контроля при исследовании тромбоцитарной агрегации по методу G. Born [1].

Полученную богатую тромбоцитами плазму или суспензию тромбоцитов необходимо стандартизировать по количеству тромбоцитов, которое должно быть примерно одинаковым во всех пробах и составлять около 250–300 тыс/мкл. В качестве разводящей жидкости используют или бедную тромбоцитами плазму (при работе с богатой тромбоцитами плазмой), или буферный раствор для суспензирования клеток. Подсчет тромбоцитов может осуществляться разными способами: подсчет в камере Горяева, с использованием обычного или фазово-контрастного микроскопа или на гематологическом анализаторе.

При исследовании воздействия антиагрегантов на тромбин-индуцированную агрегацию тромбоцитов необходимо освободить эти клеточные элементы от присутствия плазмы, что можно осуществить двумя способами: отмывкой тромбоцитов в буфере, содержащем 0,14 М NaCl, 11,9 мМ NaHCO₃, 5,4 мМ KCl, 1,0 мМ MgCl₂, 0,1% глюкозы и 0,5% бычьего сывороточного альбумина (рН=7,35), путем повторного центрифугирования с последующим ресуспензированием или гель-фильтрацией. При изучении антиагрегационного эффекта веществ, влияющих на активность эндогенного тромбина (таких как гирудин, гирулог, гепарин и т.п.), можно воспользоваться методом E.F. Plow

и соавторов [2] где возможность оценки агрегации тромбоцитов в плазме под действием эндогенно генерируемого тромбина достигается использованием ингибитора полимеризации фибриногена, представляющего собой тетрапептид Gly-Pro-Arg-Pro.

Необходимо помнить, что любые манипуляции с тромбоцитами можно проводить только в посуде, сделанной из тромборезистентного материала (пластик, специально подготовленное стекло). Исследование агрегационной активности тромбоцитов должно проводиться в течение трех часов после забора крови. В течение всего периода исследования кровь и богатая тромбоцитами плазма должны находиться при комнатной температуре, а запись агрегации тромбоцитов и преагрегационную инкубацию с изучаемыми веществами следует осуществлять при 37°C.

Вне зависимости от используемого проагреганта полученную богатую тромбоцитами плазму или суспензию тромбоцитов необходимо стандартизировать по количеству клеточных элементов, которое должно быть примерно одинаковым во всех сравниваемых исследованиях и составлять около 250 тыс/мкл. В качестве разводящей жидкости следует использовать аутологичную бестромбоцитарную плазму (при работе с богатой тромбоцитами плазмой), или буферный раствор, в котором было проведено ресуспензирование клеток. В случае низкого содержания тромбоцитов (менее 100 тыс/мкл) результат исследования не является достоверным.

Перед началом проведения эксперимента необходимо оценить растворимость изучаемого вещества. Наиболее предпочтительными растворителями являются физиологический раствор, буферы с нейтральным значением pH, дистиллированная вода. При использовании в качестве растворителя спирта или ДМСО следует помнить о том, что количество вводимого раствора не должно превышать 1–2% от общего объема реакционной смеси. Во всех случаях вне зависимости от природы растворителя следует проводить контрольное изучение его возможного влияния на агрегацию тромбоцитов.

Для исключения возможного изменения чувствительности тромбоцитов к проагреганту, растворителю или исследуемому веществу под влиянием времени, прошедшего с момента приготовления плазмы, контрольные записи агрегатограммы необходимо осуществлять до начала эксперимента, через равные промежутки времени в ходе исследования (например, каждая 3-я агрегатограмма должна быть контрольной), а также по завершении исследования.

Тромбоцитарную агрегацию исследуют с помощью специальных приборов — агрегометров. В настоящее время существует множество фирм-производителей, наиболее известными из которых являются Chrono-Log Corporation (США), Biola (Россия), Helena Laboratories Corporation (Великобритания) и др.

Для исследования агрегации тромбоцитов используют следующие методы:

1. Оптический метод, предложенный G. Born [1].

Данный метод является самым распространенным как в клинической, так и в научно-исследовательской практике. О степени агрегации чаще всего судят по максимальной величине падения оптической плотности после окончания реакции по сравнению с исходной величиной. В качестве оптического контроля используют плазму, не содержащую тромбоцитов. Исследуемое вещество добавляют в кювету. Объемы вводимой в кювету агрегометра плазмы и проагреганта зависят от технических характеристик прибора.

Объем исследуемого антиагреганта не должен быть большим, так как излишнее разведение плазмы или суспензии тромбоцитов может привести к заметному изменению оптических свойств реакционной смеси и повлиять на результаты эксперимента. Обычно раствор изучаемого вещества при использовании растворителей, не влияющих на физиологическую активность тромбоцитов (физиологический раствор, буферы для работы с клетками крови, аутологичная бестромбоцитарная плазма), не превышает 10% от общего объема реакционной смеси.

2. Импедансный метод, разработанный The Wellcome Research Laboratories, Beckenham, England [3] и позволяющий исследовать тромбоцитарную агрегацию в цельной крови.

В данном методе регистрируется изменение сопротивления между электродами, погруженными в исследуемый образец крови, которое происходит при агрегации тромбоцитов.

Следует отметить, что некоторые модели агрегометров снабжены специальными люминесцентными каналами, позволяют также исследовать выброс АТФ и ионов Ca^{2+} из тромбоцитарных гранул.

Выбор проагреганта зависит от предполагаемого механизма действия изучаемого вещества. Во всех случаях целесообразно использовать такие проагреганты, как аденозиндифосфорную кислоту (АДФ), коллаген и адреналин, стимулирующие различные пути активации тромбоцитов. В схему оценки антиагрегационного эффекта веществ — антагонистов тромбоксановых рецепторов следует включить исследование их влияния на агрегацию тромбоцитов, индуцированную арахидоновой кислотой, а в схему исследования потенциальных блокаторов PAR-рецепторов — тромбин.

Чаще всего АДФ используют в конечных концентрациях $2-1 \times 10^{-5}$ М (для записи одноволновой агрегатограммы) и $0,5 \times 10^{-5}$ М (для индукции двухволновой агрегации тромбоцитов, часто используемой при исследовании реакции высвобождения тромбоцитарных гранул), коллаген — 50,0 мкг/мл. Адреналин используют в конечных концентрациях 2,5–1,0 мкг/мл (для индукции одноволновой агрегации) и 0,5 мкг/мл (для индукции двухволновой агрегации), тромбин — 0,3 ЕД/мл и арахидоновую кислоту — 10^{-3} – 10^{-4} М.

Оценку антиагрегационного эффекта потенциальных ингибиторов функциональной активности тромбоцитов наиболее корректно проводить с использованием величины IC_{50} , то есть следует рассчитать, какое количество антиагреганта (в молярном выражении) необходимо для снижения величины максимальной амплитуды агрегации на 50%. Следует отметить, что снижение агрегационной способности на 50% и более является терапевтическим уровнем действия антиагреганта.

Обязательным условием достоверной оценки эффективности исследуемой субстанции и возможности сравнения антиагрегационных свойств нескольких потенциальных ЛС является использование индуктора процесса межтромбоцитарного взаимодействия в одной и той же концентрации во всех исследованиях. Также необходимо проводить ряд повторных экспериментов на плазме нескольких (обычно 5–10 доноров), с целью исключения влияния индивидуальной чувствительности к исследуемому веществу.

Следует отметить, что проведение исследований *in vitro* не всегда возможно. Так, популярные в клинике антиагреганты тиклопидин и клопидогрель (ингибиторы АДФ-индуцированной агрегации) неактивны *in vitro*, но за счет эффекта своих метаболитов оказывают выраженное действие *in vivo*. Подобным же эффектом обладают и некоторые антагонисты фибриногеновых рецепторов тромбоцитов GPIIb/IIIa (например, фрадафибран). Проведение этого исследования не всегда возможно также в силу плохой растворимости вещества, его высокой оптической плотности, резкого влияния на pH и др.

Для изучения антиагрегантной активности исследуемые вещества используются в различных концентрациях. Все они должны хорошо растворяться в воде или при нагревании. В случае если изучаемые соединения нерастворимы в воде, можно воспользоваться другими растворителями. Однако при использовании в качестве растворителя спирта следует помнить о том, что количество вводимого спиртового раствора не должно превышать 1–2% от общего объема реакционной смеси. Другой растворитель, например, ДМСО, должен также использоваться в объемах, не вызывающих повышения функции кровяных пластинок. Таким образом, во всех случаях независимо от природы растворителя следует проводить контрольное изучение его возможного влияния на агрегацию тромбоцитов.

1.2. Оценка антиагрегационных свойств *in vivo*

Вторым этапом исследований является оценка специфической фармакологической активности *in vivo* на интактных животных. На данном этапе изучения антиагрегантной активности соединений очень важно правильно выбрать экспериментальных животных.

Необходимо прежде всего учитывать видоспецифичность действия изучаемых веществ, а также особенности системы свертывания крови и метаболизма у животных.

Чаще всего антиагрегантную активность «*in vivo*» изучают на кроликах, крысах, собаках, мышах.

Все животные должны содержаться в условиях вивария (температура 22–24 °С, относительная влажность воздуха 40–50%) с естественным световым режимом на стандартной диете (ГОСТ Р 50258-92), соблюдая правила лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ З 51000.3-96 и 1000.4-96), а также правила и Международные рекомендации Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997). Важным моментом, в существенной степени определяющим успех проведения данного этапа доклинического изучения потенциальных антиагрегантов, является правильный выбор вида экспериментальных животных. При этом прежде всего следует руководствоваться видоспецифичностью действия изучаемых препаратов, а также особенностями системы свертывания крови и метаболизма, имеющими место у животных — объектов эксперимента. Например, исследование отдельных групп препаратов (например, некоторых блокаторов GPIIb/IIIa-рецепторов) на кроликах невозможно вследствие видовых особенностей.

Кроме того, следует учитывать, что у мелких лабораторных животных (мыши, крысы, морские свинки) сложнее проводить многократное взятие крови и практически невозможно делать это в необходимом для исследования объеме. Если исследуемое вещество не обладает какими-либо особенностями, делающими невозможным изучение его фармакодинамики с использованием именно этого вида животного, наиболее доступными и удобными для проведения изучения антиагрегантов являются кролики.

Введение исследуемых веществ кроликам возможно различными способами; наиболее часто используют пероральный и внутривенный пути введения. В качестве растворителя необходимо использовать стерильный физиологический раствор или дистиллированную воду (при пероральном введении). При внутривенном введении вещества вводят в краевую вену уха, при пероральном введении — с помощью зонда непосредственно в желудок экспериментального животного.

Взятие крови у кроликов осуществляется из краевой вены уха методом свободного падения капель, приемы стабилизации крови, приготовления и хранения богатой тромбоцитами и бестромбоцитарной плазмы не отличаются от таковых при работе с кровью человека. Следует, однако, учитывать, что количество тромбоцитов у кроликов существенно выше, поэтому стандартизация плазмы по числу клеток часто требует более существенного ее разведения.

Общий объем крови, взятой у кролика в течение одного дня эксперимента, не должен превышать 20–25 мл. Если условия исследования предполагают использование крови в несколько больших количествах, то необходимо провести контрольное исследование влияния кровопотери, выполненной в режиме основного эксперимента, на функциональное состояние системы гемостаза у животных. Проведение контрольного эксперимента также предполагает и внутривенное введение исследуемого вещества в большом объеме растворителя (10 мл и более), т.к. оно может вызвать увеличение объема циркулирующей крови и таким образом повлиять на число и агрегационную активность тромбоцитов. В данном случае в контрольном эксперименте в краевую вену уха кролика вводят эквивалентное количество физиологического раствора.

Также необходимо определение агрегации тромбоцитов до момента введения исследуемого вещества. После введения кровь забирают через определенные промежутки времени, длительность которых определяется природой и свойствами изучаемого соединения. Так, при исследовании простагландинов (вследствие их быстрой инактивации в организме) забор крови необходимо осуществлять практически сразу же после введения, в то время как при использовании блокаторов АДФ-рецепторов необходимо некоторое

время для их превращения в активные метаболиты и появления антиагрегационного эффекта.

Для исследования влияния потенциального антиагреганта на функциональную активность тромбоцитов *in vivo* также наилучшим является метод регистрации агрегации тромбоцитов, предложенный G. Born. Так как чувствительность к проагрегантам тромбоцитов кроликов отличается от чувствительности человеческих тромбоцитов, наиболее информативными индукторами агрегации являются АДФ в конечной концентрации 10^{-5} М и коллаген.

Выбор методики определения числа тромбоцитов может быть достаточно свободным, но, учитывая, что количество тромбоцитов у кролика в 2–3 раза превышает этот показатель у человека и, следовательно, затрудняет и так непростую процедуру подсчета этих клеток в мазке или камере Горяева, мы рекомендуем воспользоваться фотометрическим методом B. Walkowiak и соавторов [4].

1.3. Оценка специфической фармакологической активности *in vivo* с использованием экспериментальных моделей повышенной агрегации и адгезии тромбоцитов

Основной задачей данного этапа доклинического изучения новых антиагрегантов *in vivo* с использованием модельных состояний, сопровождающихся повышением агрегации и адгезивности тромбоцитов, является оценка их противотромботической активности.

Моделью клеточного тромба, обусловленного преимущественно тромбоцитами, может служить следующая методика. Модель адгезивного тромбоза создается на микрососудах брыжейки крыс. К венулам диаметром 40–90 микрон подводится электрод с диаметром 5–8 микрон. Анодным током, напряжением 100 В и силой 4 мА вызывают образование тромбоцитарного тромба. Время нанесения раздражения 20 мсек. С помощью объект-микрометра определяют время возникновения тромба, время отрыва первого конгломерата от основной массы тромба и среднюю площадь тромба.

Для исследований эффективности антиагрегантов можно использовать экспериментальный тромбоз сосудов артериального русла (коронаротромбоз, тромбоз бедренной артерии и т.п.). В качестве критериев оценки влияния антиагрегантов на тромбогенез следует выбрать такие тесты, которые позволили бы прямо и желательно количественно оценить именно тромбообразование. Такими критериями могут быть размер или вес модельного тромба. Кроме того, в качестве модельного состояния можно использовать экспериментальное диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови. В этой ситуации критериями оценки противосвертывающего эффекта антиагрегантов могут быть число тромбоцитов, уровень продуктов паракоагуляции, степень потребления фибриногена или антитромбина III и другие показатели, отражающие тяжесть ДВС-синдрома.

Моделью клеточного тромбоза для тестирования потенциальных антитромботических агентов, первично действующих на агрегацию тромбоцитов, является модель DiMinno G [5]. Данная модель создается на мышах. В качестве тромботического агента используется смесь растворов коллагена (0,5 мг/кг) и адреналина (0,06 мг/кг), которая вводится в хвостовую вену животного. Исследуемые соединения и препараты сравнения вводятся животным в соответствии с предполагаемыми и используемыми путями введения в клинической практике. В качестве критерия образования тромбов фиксируется количество погибших животных и наличие тромбов в сосудах легких. Из данной литературы [5] известно, что в обсуждаемой методике непосредственная причина гибели животных — массивная окклюзия микрососудов легких тромбоцитарными агрегатами, поэтому при тестировании на данной модели потенциальных антиагрегантных средств желательно провести гистологический контроль сосудов легких животных.

Также часто используется модель артериального тромбоза, вызванного поверхностной аппликацией 50% раствора хлорида железа (III) (Kurz K.D., 1990) [6]. Моделирование можно проводить на сонной, брюшной аорте, сосудах брыжейки крыс. Принципы

метода состоит в том, что наложение ватного диска, смоченного хлоридом железа, на выбранный сосуд вызывает в данном месте образование тромбоцитарного тромба. Время нанесения ватного диска составляет от 3 до 10 мин, либо возможно постоянное воздействие. Оценка времени образования тромба может проводиться с использованием различных приборов, в том числе помощи доплерографических ультразвуковых исследований. Также можно прямо и количественно оценить тромбообразование путем оценки размера и массы модельного тромба и при помощи морфологических исследований.

Другая модель артериального тромбоза проводится согласно [7]. Отличие от предыдущей модели состоит в том, что в данном случае тромбоз индуцируется анодным током напряжением 100 В и силой 50 мА. Время нанесения раздражения может варьировать от 3 до 15 мин.

Исследования антитромбогенной активности веществ должно проводиться с определением $ЭК_{50}$.

Другой экспериментальной моделью для изучения антиагрегантной активности потенциальных ингибиторов агрегации тромбоцитов может являться модель экспериментального сахарного диабета. Хорошо известно, что в лечении сахарного диабета большое значение придается не только стабилизации углеводного обмена, но и профилактике ангиопатий.

Согласно клиническим рекомендациям зарубежных и российских стандартов лечения сахарного диабета, схемы назначения ЛС помимо сахароснижающей терапии включают использование для профилактики диабетических ангиопатий антиагрегантных препаратов. Поэтому использование данной модели для изучения потенциальных антиагрегантных средств может быть весьма актуальным. Исследования можно проводить на крысах или собаках с тяжелым (уровень глюкозы более 18 ммоль/л) экспериментальным стрептозотоцин- или аллоксан-индуцированным сахарным диабетом. Для комплексной оценки агрегатного состояния крови определяются различные параметры активации тромбоцитов, описанные выше. Материалом для исследования является плазма крови крыс с сахарным диабетом. Кроме того, на животных с экспериментальным сахарным диабетом возможно создание некоторых моделей тромбозов. В данном случае время возникновения тромбоза у животных с диабетом сравнивается с таковым у интактных крыс.

1.4. Препараты сравнения

В настоящее время известно более двадцати ЛП, которые способны снижать агрегационную способность тромбоцитов, влияя на различные пути активации этих клеток. Основными группами антиагрегантов являются следующие:

1. Ингибиторы циклооксигеназы-1 тромбоцитов. К ним относится ацетилсалициловая кислота (аспирин), индobufен.

2. Антагонисты тромбоцитарных рецепторов АДФ $P2Y_{12}$. В эту группу объединяют тиенопиридины — тиклопидин (тиклид), клопидогрель (плавикс) и празугрель, необратимо ингибирующие активность $P2Y_{12}$, а также обратимые антагонисты этого рецептора — AZD6140 (для перорального применения) и ARC69931MX (кангрелор) для внутривенного использования. Два последних вещества проходят третью фазу КИ.

3. Антагонисты рецепторов фибриногена — гликопротеинов IIb/IIIa (GP IIb/IIIa). В клинической практике широко применяются препараты для внутривенного введения — абциксимаб (РеоПро), эпифибатид (интегрилин), тирофибан (агростат). В России в 2007 году также начали выпуск первого отечественного антагониста GP IIb/IIIa — препарата монофрам, предназначенного для внутривенного введения и по своим свойствам сходного с препаратом абциксимаб. Высокая эффективность данной группы антиагрегантов подтверждена во многих КИ. Также разрабатываются GP IIb/IIIa-блокаторы для орального применения — ксемилофибан, орбофибан, сбрафибан, лотрафибан и другие.

4. Ингибиторы фосфодиэстеразы, повышающие уровень цАМФ в тромбоцитах: дипиридамол и трифлюзал (последний также ингибирует тромбоцитарную циклооксигеназу-1).

5. Стимуляторы аденилатциклазы — синтетические аналоги простаглицина, повышающие уровень цАМФ в тромбоцитах. В настоящее время известно несколько стабильных при введении в организм аналогов простаглицина — берапрост натрия, илопрост, ципростен и цикапрост.

6. Антагонисты тромбоксановых рецепторов тромбоцитов и ингибиторы тромбоксансинтетазы.

7. Антагонисты рецепторов тромбина (PAR-рецепторов) также являются перспективной группой антиагрегантов. Синтезирован ряд соединений, блокирующих PAR-рецепторы, в частности SCH5303484, который проявил высокую эффективность при КИ у пациентов, страдающих ишемической болезнью сердца, а также патологией сосудов мозга и нижних конечностей.

Однако в клинической практике широко используется лишь ограниченное число ЛП: ацетилсалициловая кислота, тиенопиридины (тиклопидин и клопидогрель), дипиридамол (часто в сочетании с ацетилсалициловой кислотой), а также антагонисты гликопротеинов IIb/IIIa для внутривенного применения. Именно их целесообразно использовать в качестве препаратов сравнения при изучении антиагрегационной активности новых потенциальных антиагрегантов.

2. Оценка специфической фармакологической активности средств, влияющих на тромборезистентность сосудистой стенки

Цель эксперимента — исследование влияния фармакологических веществ на показатели тромборезистентности сосудистой стенки.

Задачи эксперимента — изучить влияние фармакологического вещества на антиагрегационную активность интимы сосудов (см. табл.).

По степени ослабления агрегации тромбоцитов после инкубации с фрагментом сосудистой стенки аорты животного можно судить о возможности фармакологического вещества влиять на тромборезистентные свойства сосудистой стенки. Метод может быть использован для оценки наличия у фармакологического вещества способности повышать тромборезистентные свойства сосудистой стенки как на интактных животных, так и на животных, у которых воспроизводят модели, вызывающие нарушение функций эндотелия (ишемия головного мозга, сахарный диабет и т.п.).

Исследования проводятся на линейных или беспородных крысах. Во время проведения исследования животное должно находиться в состоянии стабильного наркоза и анестезии.

Эксперименты выполняют на трех группах животных. Первая — группа интактных животных (крысы-доноры), вторая — группа контрольных животных, получавших растворитель, третья — группа животных, получавших фармакологическое вещество.

У интактных наркотизированных крыс из отпрепарованной сонной артерии через тefлоновый катетер проводят забор крови для получения богатой и бедной тромбоцитами плазмы. Полученную богатую тромбоцитами плазму стандартизируют.

Таблица

Препарат	Показания	Рекомендованный режим (п/к введение 1 раз в день, за исключением особых отметок)
Далтепарин	Профилактика — умеренный риск	2500 ЕД*
	Профилактика — высокий риск	5000 ЕД
	Лечение ТГВ/ТЭЛА	200 ЕД/кг
	Лечение нестабильных коронарных заболеваний	120 ЕД/кг ежедневно в течение 12 ч

Препарат	Показания	Рекомендованный режим (п/к введение 1 раз в день, за исключением особых отметок)
эноксапарин	Профилактика — умеренный риск	20 мг (2000 ЕД)
	Профилактика — высокий риск	40 мг (4000 ЕД)
	Лечение ТГВ/ТЭЛА	1,5 мг (150 ЕД/кг)
	Лечение нестабильных коронарных заболеваний	1 мг (100 ЕД/кг) ежедневно в течение 12 ч
тинзапарин	Профилактика — умеренный риск	3500 ЕД
	Профилактика — высокий риск	50 ЕД/кг
	Лечение ТГВ/ТЭЛА	175 ЕД/кг
НФГ	Профилактика — умеренный риск	5000 ЕД ежедневно в течение 12 ч
	Профилактика — высокий риск	5000 ЕД ежедневно в течение 8 ч
	Лечение ТГВ/ТЭЛА	5000 ЕД в/в болюсно плюс 15-25 ЕД/кг/час в/в инфузия** или 15000 ЕД ежедневно в течение 12 ч при п/к введении**

ТГВ — тромбоз глубоких вен; ТЭЛА — тромбоэмболия легочной артерии; * — дозы в единицах аХа активности; ** — любой дневной лабораторный мониторинг

Для оценки *in vivo* АК активности соединений — аналогов НФГ следует ориентироваться на то, что в/в или п/к введение НФГ в клинической практике контролируют с помощью теста активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ; при достижении терапевтического эффекта время свертывания плазмы удлиняется в 1,5–2,5 раза, что соответствует 0,2–0,4 аПа ЕД/мл, в сравнении с контролем) и посредством измерения аХа активности плазмы (рекомендуемый диапазон аХа активности плазмы составляет 0,3 к 0,7 аХа ЕД/мл).

Для оценки *in vivo* АК активности соединений — аналогов НМГ и фондапаринукса измеряют аХа активность плазмы экспериментальных животных, с помощью коагулологического или амидолитического тестов (последний предпочтительнее [12]) и с использованием калибровочной кривой по Международному стандарту НМГ или по арикстре. Терапевтический диапазон аХа активности для НМГ составляет 0,4–1,1 ЕД/мл при п/к введении 2 раза в день; профилактический диапазон — 0,1–0,4 ЕД/мл. Дозы НМГ для взрослых людей — п/к: 750 аХа единиц 2 раза в сутки в течение 7–10 суток, первую дозу вводят за 1–4 ч до операции, вторую не ранее чем через 2 ч после операции. Доза для фондапаринукса — 2,5 мг п/к в сутки (продолжительность введения 5–9 суток).

Для оценки *in vivo* АК активности соединений — аналогов прямых ингибиторов тромбина используют экариновое время свертывания, тромбиновое время, активированное время свертывания. Терапевтический диапазон ПИТ при лечении тромбоза глубоких вен достигается при увеличении времени свертывания в тесте АЧТВ в 1,5–2,5 раза, в сравнении с показаниями «до введения АК». Рекомендуемая доза для в/в введения лепаирудина для ГИТ 0,15 мг/кг/ч; с или без начального болюсного введения 0,4 мг/кг. Десирудин для профилактики тромбозов вводят подкожно в дозе 15 мг два раза в день [11]. Бивалирудин вводят болюсно в дозе 0,7 мг/кг с последующей инфузией 1,75 мг/кг/ч при необходимости. Аргатробан вводят при непрерывной в/в инфузии в дозе 2 мг/кг/мин. Дозы для дабигатрана — 110–150 мг в день болюсно.

Для оценки *in vivo* АК активности соединений — аналогов прямых ингибиторов фактора Ха (ривароксабан, аписабан, бетриксабан, эдоксабан) определяют аХа активность плазмы экспериментальных животных. Ривароксабан (Bayer Healthcare AG, Wuppertal, Германия) применяют *per os* 1 раз в день в дозе 5–40 мг. В 2003 г. члены Комитета по

контролю за АК терапией на 49-й конференции Подкомитета по науке и стандартизации Международного общества по тромбозам и гемостазу предложили использовать в качестве контроля за ингибиторами фактора Ха определение аХа активности плазмы в гравиметрических единицах [13].

Тест протромбинового времени (ПВ), или протромбиновый тест, широко используют для оценки влияния на внешний путь свертывания крови, для определения активности фактора VIIa и для контроля за лечением антикоагулянтами непрямого действия. Методика выполнения протромбинового теста была предложена Quick AJ. и соавт. в 1935 г. и состоит в определении времени свертывания цитратной плазмы после добавления тромбопластина и Ca^{2+} . Для стандартизации протромбинового теста (ПВ) Международный комитет по стандартизации в гематологии и Международный комитет по тромбозу и гемостазу ввели, а ВОЗ в 1983 г. приняла расчет международного нормализованного отношения (МНО; INR — английская аббревиатура). По рекомендации ВОЗ определение Международного индекса чувствительности (МИЧ, ISI — английская аббревиатура) является обязанностью производителей тромбопластина, которые должны определять относительную чувствительность каждой серии выпускаемых ими тромбопластинов, сравнивая ее с эталоном тромбопластина, чувствительность которого принята за единицу [14]. В клинической практике контроль за лечением варфарином осуществляют посредством МНО, которое рассчитывают по отношению ПВ и индекса чувствительности используемого реагента: $\text{МНО} = (\text{ПВ}_{\text{плазма с АК}} / \text{ПВ}_{\text{плазма без АК}})^{\text{МИЧ}}$. В настоящее время при лечении тромбозов атриовентрикулярных клапанов (АВК) рекомендован диапазон МНО 2–3, при наличии разных типов сердечных механических клапанов — 2,5–3,5.

При увеличении времени свертывания плазмы в тесте ПВ вероятно влияние исследуемых соединений на образование комплекса тканевой фактор/фактор VIIa, ингибирование активности фактора VIIa, влияние на активность многомерных комплексов с участием факторов II, V, VII, X или нарушение полимеризации фибрина.

При разработке новых АК средств, следует ориентироваться на приведенные дозы и режимы введения современных антикоагулянтов прямого и непрямого действия.

Получая стабилизированную плазму для анализа, кровь млекопитающих (из локтевой вены человека, краевой вены уха кролика, яремной вены крысы или морской свинки, хвостовой вены мыши) отбирают в пластиковую пробирку с 3,8% (0,11 М) 3-замещенного 5,5-водного раствора цитрата натрия или с 3,2% раствором 2-водного цитрата натрия в соотношении 9:1. Стабилизированную кровь до центрифугирования при комнатной температуре можно хранить не более одного часа. Для приготовления бедной тромбоцитами плазмы стабилизированную кровь центрифугируют при 1200–1400 g 15–20 мин, как при комнатной температуре, так и при 0°C. Определения следует проводить не позднее, чем через час после получения бедной тромбоцитами плазмы. Плазму для исследования можно сохранить, заморозив (определения проводить не позднее, чем через 14–45 дней при замораживании в диапазоне от –20 до –70°C).

К началу комплексного анализа АК активности соединений необходимы:

- информация о структурных параметрах (молекулярная масса, степень замещения по функциональным группам и др.) и растворимости в физиологическом растворе;

- коагулометры, спектрофотометры, рН-метры, инструменты для проведения хирургического вмешательства (скальпели, пинцеты, шприцы, катетеры, шовный материал) при модельных экспериментах на лабораторных животных;

- наборы реактивов отечественных (НПО «Ренам», фирма «Технология-Стандарт», группа компаний «БиоХимМак») и зарубежных (Sigma, Trinity Biotech, Instrumentation Laboratory) фирм для определения фибриногенсвертывающей или амидолитической активности факторов свертывания крови;

- реактивы (сериновые протеазы, хромогенные субстраты, плазменные ингибиторы, активаторы плазменных ингибиторов, ингибиторы факторов свертывания) и Международные стандарты ингибиторов и факторов, рекомендованные ВОЗ;

— реактивы для приготовления буферных растворов, растворителей и разбавителей (физиологический раствор используют для растворения исследуемых соединений с последующим введением экспериментальным животным; буферные растворы и дистиллированную воду используют для определений в тестах и для разбавления реактивов до необходимой концентрации).

Для выбора препарата сравнения следует ориентироваться на механизм действия исследуемого соединения, который связан со структурными параметрами и источником сырья (для нативных и полусинтетических соединений). Так, при разработке активаторов антитромбина (парентеральные) гликозаминогликанов (ГАГ) животного происхождения с ММ более 5,4 кДа и сульфатированных полисахаридов (СП) растительного происхождения препаратом сравнения может быть НФГ; для ГАГ животного происхождения с ММ менее 5,4 кДа — НМГ (обращать внимание на способ гидролиза НФГ, при получении НМГ — ферментативный, кислотный или щелочной); для олигосахаридов и олигонуклеотидов — фондапаринукс (арикстра). Для ингибиторов тромбина (для парентерального введения) — гирудин или лепаирудин. Для ингибиторов тромбина или активированного фактора десять (*per os*) — варфарин.

Ниже приведены основные тесты, используемые для оценки АК активности соединений. В силу разной чувствительности реактивов коагулологических и амидолитических тестов к действию антикоагулянтов разной химической структуры вводимые объемы исследуемых соединений составляют 0,001–0,050 мл; ниже по тексту приведены конечные концентрации, с помощью которых можно рассчитать необходимый объем.

Протромбиновое время (ПВ) используют для оценки влияния исследуемых соединений на внешний и общий пути свертывания крови (от активации фактор VII до появления сгустка фибрина) [15]; для контроля за введением варфарина и разрабатываемых ингибиторов тромбина и активированного фактора десять для введения *per os*. Суть метода: смешивают испытуемую плазму с кальцием (нейтрализует антикоагулянтное действие цитрата натрия) и тромбопластином (тканевой экстракт из мозга, содержащий фосфолипиды и тканевой фактор) и измеряют время появления сгустка. Введение варфарина и потенциальных АК контролируют по МНО (должно быть 2–3).

Для оценки *in vitro* исследуемое соединение в конечных концентрациях 0,001–100 мкг/мл 0,05 М Трис-ЭДТА буфера с 0,0075 М Na_2 -ЭДТА и 0,175 М NaCl, pH 7,4 или буфер (в контроле) инкубируют в течение 1 мин при 37 °С с 0,1 мл плазмы человека или экспериментальных животных, затем добавляют 0,2 мл раствора Са-тромбопластина и фиксируют время появления сгустка на коагулометре; для оценки *ex vivo* — к плазме экспериментальных животных, полученной из образцов крови в разные интервалы времени после введения, добавляют 0,2 мл раствора Са-тромбопластина и фиксируют время появления сгустка на коагулометре. Диапазон нормы с плазмой человека составляет 10–14 с. Фармакологический эффект считается достаточным при увеличении времени свертывания в сравнении с нормой в 2–3 раза.

Активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ) — следующий общий коагулологический тест (после ПВ). Он характеризует время свертывания от активации фактора XII до формирования фибрина (то есть внутренний и общий пути); более чувствителен к ингибиторам факторов внутреннего пути [16]. Принцип проведения метода: смешать испытуемую плазму с избытком кальция (для снятия эффекта цитрата натрия) и фосфолипидом (названный частичным тромбопластином, так как нет тканевого фактора) и активатором внутреннего пути (кремнезем, каолин, целит или эллаговая кислота). Используют для контроля за терапией НФГ или прямыми ингибиторами тромбина (гирудин). Требуемое удлинение АЧТВ в 1,5–3,0 раза (в сравнении с показаниями в пробах без АК). Диапазон нормы с плазмой человека составляет 28–42 с, в зависимости от используемого набора.

Определение антитромбиновой активности или анти-IIa-активности (aIIa) исследуемых соединений с использованием теста активированного частичного тромбопластино-

вого времени проводят по [17]. К 0,1 мл плазмы человека или экспериментальных животных добавляют исследуемые соединения в конечных концентрациях 0,001–1,500 мкг/мл 0,05 М Трис-ЭДТА буфера с 0,0075 М Na₂-ЭДТА и 0,175 М NaCl, pH 7,4 или буфер и 0,1 мл смеси активатора свертывания и фосфолипидов. Через 3 мин инкубирования при 37 °С добавляют 0,1 мл 0,025 М раствора CaCl₂ и фиксируют на коагулометре время появления сгустка. Для расчета аПа активности в 3-х независимых сериях и 4–5 разведениях используют калибровочные кривые 5-го Международного стандарта НФГ в диапазоне 0,005–0,05 ЕД/мл.

Для оценки антитромбиновой активности *ex vivo* — к плазме экспериментальных животных, полученной из образцов крови в разные интервалы времени после введения, добавляют 0,1 мл смеси активатора свертывания и фосфолипидов. Через 3 мин инкубирования при 37 °С добавляют 0,1 мл 0,025 М раствора CaCl₂ и фиксируют на коагулометре время появления сгустка. Для расчета аПа активности используют калибровочные кривые 5-го Международного стандарта нефракционированного гепарина.

Анализировать образцы плазмы, полученной центрифугированием не позднее, чем через 1 ч после взятия крови, следует в течение 4 ч (время свертывания плазмы в тесте АЧТВ укорачивается в связи с нейтрализацией активности гепаринов фактором 4 тромбоцитов).

В тесте тромбиновое время (ТВ) измеряют скорость формирования сгустка фибрина после добавления стандартной концентрации тромбина к цитратной плазме; при расщеплении тромбином фибриногена, высвобождаются фибринопептиды А и В, а фибриноген преобразовывается в фибрин (общий путь свертывания). К 0,1 мл плазмы с испытуемыми соединениями в конечных концентрациях 0,001–31,00 мкг/мл 0,05 М Трис-НСl буфера с 0,0075 М Na₂-ЭДТА и 0,175 М NaCl, pH 7,4 или буфер добавляют 0,1 мл тромбина (1–2,5 ЕД/мл) и фиксируют время появления сгустка на коагулометре. Диапазон нормы с плазмой человека составляет 10–13 или 16–24 с в зависимости от условий реакции и концентрации тромбина. Удлинение наблюдается при незначительном количестве гепарина, гирудина или аргатробана и при ингибировании преобразования фибриногена в фибрин.

Для оценки *ex vivo* — к плазме экспериментальных животных, полученной из образцов крови в разные интервалы времени после введения, добавляют 0,1 мл тромбина (1–2,5 ЕД/мл) и фиксируют время появления сгустка на коагулометре.

Рептилазное время (батроксобинное время) — время свертывания плазмы с использованием яда змеи *Bothrops atrox* вместо тромбина. Измеряют скорость формирования фибрина после добавления рептилазы, атроксина или батроксобина к цитратной плазме. От фибриногена отщепляется только фибринопептид А, но сгусток появляется. Удлинение времени свидетельствует об ингибировании превращения фибриногена в фибрин. В отличие от ТВ не продлевается гепарином и гирудином, поэтому этот тест можно использовать для уточнения механизма действия исследуемых соединений. Вариант этого теста в Российской Федерации — анцистроновый тест [18]. Анцистрон (Технология-Стандарт) выделяют из яда щитомордника обыкновенного; представляет собой аналог коагулазы, получаемой из яда змеи *Bothrops atrox*. Исследуемую плазму (0,2 мл) инкубируют 1 мин при 37 °С, добавляют 0,2 мл раствора анцистрона (лиофильно высушенный анцистрон, с активностью эквивалентной 3 ЕД тромбина, развести 1 мл дистиллированной воды) и фиксируют время появления сгустка. Диапазон нормы с плазмой человека составляет 16–22 с.

Экариновое время свертывания используют для измерения активности гирудина в плазме. Яд змеи *Echis carinatus* катализирует превращение протромбина в мейзотромбин — активная форма белка, которая ингибируется гирудином, но не НФГ. Вариант этого теста — эхитоксовый тест с ядом эфы многочашуйчатой [19]. Исследуемую плазму (0,2 мл) инкубируют 1 мин при 37 °С, добавляют 0,2 мл рабочего раствора яда эфы (Технология-Стандарт; 0,002–0,02 мг/мл дистиллированной воды) и фиксируют время

появления сгустка. Диапазон нормы с плазмой человека составляет для экаринового времени 22,6–29,0 с, для эхитоксового — 23–27 с.

Определение аПа активности по ингибированию амидолитической активности тромбина осуществляют по [20,21]. Преинкубируют 3 мин при 37°С 0,2 мл раствор антитромбина человека [0,125 ЕД/мл в 0,05 М Трис-НСl буфера с 0,0075 М Na_2 -ЭДТА, 0,175 М NaCl, 0,1% полиэтиленгликолем 6000 и с 2 мг/мл альбумина (человека или быка), рН 8,4] с антикоагулянтами в конечной концентрации 0,001–0,723 мкг/мл. Добавляют 0,05 мл раствора тромбина человека (5 ЕД/мл Трис-ЭДТА буфера). Через 1 мин добавляют 0,1 мл раствора хромогенного субстрата для тромбина — S-2238 (0,00125 М в дистиллированной воде). По изменению оптической плотности раствора за минуту при длине волны 405 нм или по оптической плотности после остановки реакции 50% уксусной кислотой, добавленной через 1 мин после субстрата, судят об активности исследуемого соединения. Для расчета аПа активности в 3-х независимых сериях и 4–5 разведениях используют калибровочные кривые 5-го Международного стандарта НФГ в диапазоне 0,005–0,05 ЕД/мл. Эффективные концентрации (IC_{50}) рассчитывать по [22].

Определение анти-Ха-активности (аХа-активность) по ингибированию фибриногенсвертывающей активности фактора Ха осуществляют по [35]. Инкубируют 1 мин при 37 °С 0,1 мл плазмы с антикоагулянтами в конечной концентрации 0,001–3,222 мкг/мл 0,05 М Трис-НСl буфера с 0,0075 М Na_2 -ЭДТА, 0,175 М NaCl, 0,1% полиэтиленгликолем 6000 и с 2 мг/мл альбумина (человека или быка), рН 8,4. Затем добавляют 0,05 мл смеси фосфолипидов с фактором Ха, через 3 мин инкубации при 37 °С добавляют 0,05 мл 0,035 М раствора CaCl_2 и фиксируют время свертывания плазмы на коагулометре. Для расчета аХа активности в 3-х независимых сериях и 4–5 разведениях используют калибровочные кривые 1-го Международного стандарта НМГ в диапазоне 0,005–0,700 ЕД/мл.

Определение аХа активности по ингибированию амидолитической активности фактора Ха осуществляют по [23, 24]. Преинкубируют 2 мин при 37 °С 0,1 мл антитромбина человека (1 ЕД/мл 0,05 М Трис-НСl буфера с 0,0075 М Na_2 -ЭДТА, 0,175 М NaCl, 0,1% полиэтиленгликолем 6000 и с 2 мг/мл альбумина человека или быка, рН 8,4) с антикоагулянтами в конечной концентрации 0,0001–7,0000 мкг/мл. Добавляют 0,2 мл раствора бычьего фактора Ха (растворить буфером до получения концентрации в диапазоне оптической плотности 0,65–1,25) и инкубируют 2 мин, затем определяют остаточную активность фактора Ха, добавляя 0,2 мл хромогенного субстрата-S2222 (1мМ в дистиллированной воде). Активность определяют по изменению оптической плотности раствора при длине волны 405 нм за минуту или по оптической плотности после остановки реакции 50% уксусной кислотой, добавленной через 1 мин после субстрата. Для расчета аХа активности в 3-х независимых сериях и 4–5 разведениях используют калибровочные кривые 1-го Международного стандарта НФГ в диапазоне 0,007–0,070 ЕД/мл. Эффективные концентрации (IC_{50}) рассчитывают по [22].

Анализ ингибирования исследуемыми соединениями генерации тромбина (ГТ) проводят по Sollier B.D. и др. [25]. Дефибрирование 3–5 мл бедной тромбоцитами плазмы человека осуществляют, смешивая аликвоты плазмы с анкродом [Arvin, Knoll Pharma Inc, 1% (v/v) 50 ЕД/мл; яд змеи *Calloselasma rhodostoma*]. Фибриновый сгусток формируется через 10 мин инкубации при 37 °С. Через 10 мин инкубации при 0 °С сгусток фибрина удаляют центрифугированием 20 мин при 3000 g. Генерацию тромбина запускают, добавляя раствор каолина (конечная концентрация 5 мкг/мл 0,05 М Трис-НСl буфера рН 7,4 с 0,1 М NaCl и 0.05% овальбумин) в дефибрированную плазму человека, содержащую 2 мкМ кефалина и исследуемые соединения (АК) в конечной концентрации 0,001–0,500 мкг/мл. Каждые 15 с инкубации при 37 °С отбирают по 0,1 мл инкубационной смеси, добавляют к 0,1 мл раствора хромогенного субстрата S-2238 (2 мМ) и измеряют оптическую плотность при 405 нм. Концентрацию тромбина определяют по калибровочной кривой с 0–500 наноМ тромбина (Sigma) в буфере. Под кривой генерации

тромбина находят площадь (AUC) и рассчитывают процент ингибирования: $[AUC(ГТ) \text{ контроль} - AUC(ГТ) \text{ с АК}] / AUC(ГТ) \text{ контроль}$.

Оценку антикоагулянтной активности исследуемых соединений *in vivo* проводят на кроликах Шиншилла обоего пола или крысах-самцах Wistar, полученных из питомника РАМН «Столбовая», находившихся на стандартной диете в боксированных помещениях с соблюдением всех правил и международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных работах [Европейское соглашение по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях // Страсбург, 1986]. Разброс животных в группе по массе тела не превышает $\pm 10\%$. Животных контрольных и получающих ЛС групп одного пола, возраста, получают из питомника одновременно. Для анализа ФД параметров и активности АК в плазме сравнивают показания при введении испытуемого соединения, препарата сравнения и физиологического раствора. Количество экспериментальных животных на одну дозу составляет 8–12.

Фармакологическую активность исследуемых соединений определяют при в/в, п/к или *per os* введениях кроликам или крысам. Внутривенное введение АК кроликам осуществляют в краевую вену уха (дозы выбирают, ориентируясь на препарат сравнения и предварительные определения ФД параметров), крысам – в яремную вену. Подкожные введения экспериментальным животным проводят в кожную складку со стороны спины. Введение исследуемого соединения *per os* кроликам осуществляют при помещении лекарственной формы на корень языка. При необходимости можно проводить введение исследуемых соединений внутрь желудка (интрагастрально) с использованием зондов. В качестве контроля используют введение физиологического раствора. В качестве положительного контроля применяют растворы используемых в клинической практике АК. Кровь у кроликов отбирают методом капель из краевой вены противоположного уха, кровь у крыс забирают из противоположной яремной вены в пластиковую пробирку с 0,11 М раствором $C_6H_5O_7Na$ в соотношении 9:1. Для получения бедной тромбоцитами плазмы пробирку откручивают при 1400 g 20 мин. Анти-IIa и aXa активности плазмы экспериментальных животных оценивают в разные интервалы времени после введения. Кровь для исследования отбирают до введения и через 5, 15, 30, 60, 90, 120, 180, 240 и 300 мин после в/в введения, через 60, 120, 180, 240, 300 мин и 24, 48 ч после п/к введения, через 60, 120, 180, 240, 300 мин и 1, 2, 3, 4, 5, 6 суток после введения. Для расчета фармакокинетических параметров данные представляют в виде полулогарифмических графиков выведения исследуемого соединения [26] и используют электронный ресурс SummitPK.com. Фармакодинамические или фармакокинетические параметры оценивают, определяя АК активность плазмы в тестах времени свертывания крови (ВСК), времени рекальцификации (ВР), ТВ, АЧТВ, ПВ, РеаКлот-гепарин (НПО «Ренам») [27, 2]. Антитромбиновую активность исследуемых сульфатов полисахаридов животного происхождения в системе *ex vivo* рассчитывают на базе кривых выведения антикоагулянтов после внутривенного введения кроликам. В основу методики положено математическое описание действия НФГ, предложенное ранее [29]. При этом исходят из того, что кинетика элиминации образцов СХ при внутривенном введении нелинейна, подобно наблюдаемой у НФГ: $C_t = C_0 \exp(-K_{el} t)$, (1) где C – концентрация СХ в момент времени t ; C_0 – концентрация СХ в момент введения; K_{el} – константа элиминации.

Второе допущение, предполагающее экспериментальную проверку, состоит в линейном приближении зависимости АК эффекта от дозы СХ: $T = K_t C_t + T_b$ (2), где T – время образования сгустка в присутствии СХ; T_b – время образования сгустка в отсутствии СХ (до введения СХ); K_t – коэффициент пропорциональности. Значение T оцениваем в тестах АЧТВ и ВСК. Подставляя (2) в (1), получаем: $T - T_b = (T_0 - T_b) \exp(-K_{el} t)$, или в логарифмической форме: $\ln(T - T_b) = \ln(T_0 - T_b) - K_{el} t$, (3), где T_0 – значение T при $C = C_0$. Здесь (3) – уравнение прямолинейной регрессии, где K_{el} – коэффициент регрессии, а $\ln(T_0 - T_b)$ – свободный член. Обе константы рассчитывают стандартными статистиче-

скими методами по программе регрессионного анализа. Время полувыведения образцов рассчитыва как: $T_{1/2} = \ln 2 / K_{el}$ (4). Время действия: $t_a = (K_{el})^{-1} \ln [T_0 - T_b / (a - 1) T_b]$ (5), где a — заданное отношение T/T_b , характеризующее порог терапевтически значимой пролонгации T_b . При $a=2$: $t_2 = (K_{el})^{-1} \ln [T_0 - T_b / T_b]$ (6). Суммарный антикоагулянтный эффект (S) — площадь под фармакодинамической кривой рассчитываем по формуле: $S = (T_0 - T_b) / K_{el}$ (7). Величина вводимой дозы сульфата полисахарида связана с концентрацией антикоагулянта в плазме (C) через объем распределения препарата. Чтобы исключить из расчетов данный параметр, всюду, где речь шла о концентрации, подразумеваем дозу. Подобная замена переменных отражается только на K_t (см. (2)): $K_t \cdot (T_0 - T_b) V_d / DM$ (8), где D — вводимая доза; M — молекулярная масса образца АК; V_d — объем распределения. Здесь K_t характеризует крутизну наклона спрямленного графика зависимости реакции T от дозы, которая зависит от чувствительности свертывающей системы к антикоагулянтному воздействию и удельной активности препарата: $K_t = KA_2$ (9), где K — константа пропорциональности, имеющая размерность $\text{мин}^2/\text{мг}^2$, характеризующая чувствительность свертывающей системы крови; A_2 — антитромбиновая активность (ЕД/мг). Удельную антитромбиновую активность испытуемого образца СХ выражают по отношению к рабочему стандарту сульфата полисахарида, прокалиброванному в единицах активности Международного стандарта НФГ. Предполагая чувствительность свертывающей системы к сравниваемым препаратам одинаковой, расчет антитромбиновой активности одного образца относительно другого сводится к вычислению значений K_t : $A_2 = \{(T_{0t} - T_b) D_s\} / \{(T_{0s} - T_b) D_t\} A_1$ (10), где A_1 — значение удельной антитромбиновой активности сульфатов полисахаридов по Европейской Фармакопейной статье или по Фармакопейной статье Российской Федерации; T_{0t} — время образования сгустка в момент введения образца; T_{0s} — время образования сгустка в момент введения стандарта; D_t — доза образца; D_s — доза стандарта.

Исследование антитромботической активности проводят на модели венозного стаза у крыс-самцов линии Wistar массой 250–350 г по Wessler S. и др. [30]. Для наркоза внутрибрюшинно вводят нембутал в дозе 60 мг/кг по 1 мл на 200 г веса животного. Образцы АК в объеме до 1 мл в/в вводят в левую яремную вену, в эту же вену, с целью подавления защитной реакции противосвертывающей системы, вводят раствор атропина сульфата в дозе 5 мг/кг. Для моделирования тромбоза через 15 мин после введения АК активируют свертывающую систему крови крыс сывороткой человека. Затем перевязывают нитью участок вены (0,5–0,7 см), которая не используется для введения веществ. Эффективность антитромботической активности оценивают:

1. По форме тромба, извлеченного из перевязанного участка вены (0 и 1 балл — выраженный антитромботический эффект, в поле зрения сгустка либо нет, либо несколько микроскопических нитей; 2 балла — умеренный антитромботический эффект, в поле зрения несколько маленьких тромбиков; 3 и 4 балла — эффект отсутствует или незначителен, в поле зрения один большой или 2–3 тромба меньшего размера); пересчет системы баллов на процент предотвращения тромбоза проводят по следующей формуле: $[1 - (Sa/4n)] \times 100$, где a — антитромботический эффект в баллах, n — число экспериментов;

2. По весу влажного тромба на аналитических весах;

3. По концентрации белка в гомогенате тромба по Лоури; содержание белка в испытуемой пробе устанавливают по калибровочной кривой, построенной заранее по раствору фибриногена (Sigma Aldrich) в концентрациях от 10 до 400 мкг/мл.

4. По размеру изображения в пикселах при переводе фотографии тромба в формат JPG с обсчетом по программе PhotoM.

Геморрагическую активность антикоагулянтов определяют на крысах самцах Wistar массой 200–250 г [30]. Для внутрибрюшинного наркоза используют нембутал в дозе 50 мг/кг. В яремную вену вводят исследуемое соединение и через 30 с надрезают кожу со стороны спины. Под кожу на глубину 10 см вводят острые концы ножниц, раздвигают

бранши на 4 см и в таком положении извлекают ножницы, достигая отсепарирования кожи от подлежащих тканей. Под кожу помещают марлевую салфетку размером 14x14 см. Через 30 мин извлекают салфетку и проводят гемолиз эритроцитов, добавляя 10 мл дистиллированной воды. Через 2 ч после полного гемолиза эритроцитов определяют оптическую плотность на спектрофотометре при длине волны 540 нм. Содержание гемоглобина определяют по калибровочной кривой по гемоглобину кролика (Sigma).

Оценка значимости различий двух средних арифметических рядов экспериментальных данных проводят по t-критерию Стьюдента. Для определения связи между двумя признаками в рядах экспериментальных данных используют корреляционный анализ, для определения достоверности вывода о влиянии фактора на результативный признак F используют дисперсионный анализ [31]. Статистическую обработку результатов проводят с использованием программ Biostat, SSPS, StagraphicsPlus.

По результатам анализа активности *in vitro* наиболее перспективными антикоагулянтами считают активаторы антитромбина с активностью против тромбина или фактора Ха (рассчитанными по Международным стандартам НФГ или НМГ) не менее 70 ЕД/мл. В отношении к ингибиторам активности тромбина или фактора Ха следует ориентироваться по величине эффективной концентрации (IC_{50}) в том или ином тесте. Чем ниже эффективная концентрация, тем более активно соединение. Фармакологическая эффективность перспективных АК определяется по величине площади под фармакодинамической кривой, периоду полувыведения, продолжительности действия, в сравнении с используемыми в клинической практике антикоагулянтами.

Анализ антикоагулянтной активности перспективных антитромботических соединений разной химической структуры, включающий как оценку специфических активностей, так и использование модельных экспериментов с участием лабораторных животных, позволит получить ЛС с меньшим числом побочных эффектов. При анализе АК активности исследуемых соединений успех разработки зависит от использования тестов и стандартов, рекомендованных Всемирной организацией здравоохранения.

4. Исследование специфической фармакологической активности тромболитических средств

Действие препаратов этой группы связано с их способностью к деполимеризации фибрина в тромбе.

Используемые в настоящее время тромболитические средства можно разделить на препараты «старого» и «нового» поколения. Препараты «старого» поколения (фибринолизин, стрептокиназа, урокиназа и др.) обладают равным фибринолитическим действием как в зоне тромба, так и в общем кровотоке. Препараты «нового» поколения (эминаза, проурокиназа, тканевой активатор плазминогена и др.) в большей степени проявляют свой эффект в тромбе, чем в общем кровотоке.

Контроль действия фибринолитических препаратов при их разработке, а также при лечении тромбозов, тромбоземболий, инфарктов остается крайне актуальной проблемой. Это положение усугубляется тем, что в клинической практике многих лабораторий до сих пор применяются старые методики, многие из которых уже не используются в передовых странах. Между тем использование в клинической практике современных методов, например, амидолитических на основе хромогенных субстратов, привело бы к получению за короткое время точных результатов [32, 33, 34].

Синтетические хромогенные пептиды имеют последовательность аминокислот, аналогичную участкам естественных субстратов, расщепляемых плазмином. Отщепление от хромогенного субстрата окрашивающего фрагмента (p-нитроанилин (pNa)) позволяет по степени развивающейся окраски определить активность действующего фермента. Энзиматическое расщепление субстратов определяется с помощью спектрофотометра при длине волны 405 нм. Величина изменения поглощения прямо пропорциональна концентрации фермента [35]. Таким образом, хромогенные субстраты позволяют проводить

прямые измерения фармакологической активности ферментов. Амидолитические методы характеризуются простотой выполнения, высокой точностью, воспроизводимостью результатов, возможностью кинетических измерений и автоматизации. Неслучайно Н. Stormorken [1976] подчеркивал, что с началом промышленного производства хромогенных субстратов в лабораторной коагулологии начинается новая эра, которая знаменует переход от секундомера к спектрофотометру, от ручных методов исследования к автоматическим.

При получении положительных результатов в опытах *in vitro* при оценке фибринолитической активности потенциальных тромболитиков (т.е. при получении эффекта, соизмеримого с лучшими тромболитическими препаратами) проводится изучение специфической фармакологической активности на животных. Как правило, эксперименты проводятся на крысах линии Вистар, морских свинках, кроликах или собаках.

Исследование тромболитической активности на животных предполагает экспериментальное моделирование тромбоза и последующее определение степени тромболиза. В частности, А. Vernat и соавт. [36], D. Collen и соавт. [37] в экспериментах на кроликах-самцах предлагают вводить тромб стандартного размера, содержащий I^{125} -фибриноген. После введения тромболитического средства замеряют элиминацию I^{125} из зоны тромба, обращая внимание на ее скорость и уровень остаточной радиоактивности в области тромба.

В экспериментах *in vivo* также необходимо провести сравнительное исследование эффективности разрабатываемых тромболитиков с известными тромболитическими средствами.

Важное значение в экспериментах *in vivo* имеет также исследование действия изучаемого тромболитического средства на параметры гемостаза, отражающие наклонность к геморрагическим осложнениям. При исследовании новых тромболитиков необходимо изучить их влияние на уровень фибриногена, активность фибринолиза, уровень плазминогена. «Идеальный» тромболитический препарат не должен на фоне высокого тромболитического эффекта значительно снижать уровень фибриногена, выраженно активировать фибринолиз и истощать запасы плазминогена.

Цель данного раздела исследования — на основе методов с использованием хромогенных субстратов получить за короткое время точные и сопоставимые результаты. Принцип метода с использованием хромогенного субстрата заключается в том, что при добавлении потенциального активатора к образцу исследуемой плазмы происходит быстрое расщепление хромогенного субстрата. Скорость гидролиза нитроанилиновой связи хромогенного субстрата (оптическая плотность) прямо пропорциональна концентрации активатора [38].

Первичная оценка фибринолитических средств производится *in vitro* путем определения их амидолитической активности. Наиболее точная оценка амидолитической активности, т.е. способности разрывать связи аргинина, проводится с помощью методов с использованием хромогенных субстратов. В России наборы, содержащие хромогенный субстрат плазмина, производятся фирмой «Технология-Стандарт» (г. Барнаул).

Для проведения таких анализов потребуются центрифуга лабораторная, спектрофотометр СФ-26, СФ-46 или аналогичные фотометры с термостатом (используемая длина волны — 405 нм при ширине оптического пути кюветы не менее 1 см), секундомер, пипетки разного объема вместимости, пробирки, вода дистиллированная и резиновые перчатки.

Перед проведением эксперимента кровь для исследования забирают в пластиковую или силиконированную пробирку, содержащую 3,8% раствор цитрата натрия, соотношение объемов крови и цитрата натрия должно быть 9:1. Кровь центрифугируют при 3000 об/мин (1200 g) в течение 15 мин. В результате получают бедную тромбоцитами плазму, пригодную для исследования. Центрифугирование должно проводиться непосредственно после взятия крови, а отбор плазмы — сразу же после центрифугирования. Не допускается анализ плазмы крови, имеющей сгустки и полученной более 2 ч назад. Допускается замораживание образцов при $-12 \dots -18$ °С на срок около 1 месяца.

Использование хромогенного субстрата позволяет оценить эффект быстро, с использованием минимального количества исследуемого вещества. Измерения проводят следу-

ющим образом. В пробирке смешивают 0,02 мл исследуемого образца плазмы, 0,2 мл раствора потенциального активатора фибринолиза, например, стрептокиназы (300 единиц на 1 мг белка плазминогена) и 0,8 мл 0,05 М трис-НСl буфера, содержащего 0,15 М NaCl, рН 7,4. Смесь перемешивают и инкубируют при температуре +37 °С в течение 15 мин. Затем в пробирку добавляют 0,2 мл хромогенного субстрата (запасный раствор 2 мг/мл). Через 120 с в пробирку добавляют 1,0 мл 30%-ного раствора уксусной кислоты и в течение 5–10 мин определяют оптическую плотность при длине волны 405 нм исследуемого образца против физиологического раствора хлорида натрия.

В день проведения исследования выполняется анализ контрольной плазмы однократно вне зависимости от количества образцов исследуемой плазмы, который проводится следующим образом. В пробирке смешивают 0,02 мл контрольной плазмы (пул от 9 доноров) и 1,0 мл рабочего раствора буфера для измерения контроля (0,05 М трис-НСl буфер, содержащий 0,15 М NaCl, рН 7,4). В пробирку добавляют 0,2 мл хромогенного субстрата (запасный раствор 2 мг/мл). Через 120 с в пробирку добавляют 1,0 мл 30%-ного раствора уксусной кислоты и в течение 5–10 мин определяют оптическую плотность при длине волны 405 нм против физиологического раствора хлорида натрия.

Степень влияния разных концентраций активатора фибринолиза выражают в % и рассчитывают по формуле:

$$((A_1 - A_2) / A_2) \times 100\% ,$$

где: A_1 — оптическая плотность пробы, содержащей активатор; A_2 — оптическая плотность пробы, не содержащей активатор;

В каждом эксперименте перед добавлением хромогенного субстрата измеряют оптическую плотность растворов (фон), который вычитают из значения оптической плотности после добавления субстрата.

Приведенное выше описание исследования дано для работы на спектрофотометре, где кювета имеет вместимость 2,0–3,0 мл. При работе с кюветами вместимостью 1,0–2,0 мл объем смешиваемых реагентов следует уменьшить в 2 раза.

Раствор хромогенного субстрата можно хранить при комнатной температуре +18 ... +25 °С не более 5 дней, при температуре +2 ... +8 °С не более 2 недель, при температуре –12 ... –22 °С не более 1 месяца. Рабочий раствор буфера можно хранить при комнатной температуре не более 2 дней или при температуре +2 ... +8 °С не более 1 недели. Раствор активатора можно хранить при комнатной температуре не более 1 дня, при температуре +2 ... +8 °С не более 2 недель, при температуре –12 ... –22 °С не более 1 месяца. Образцы плазмы можно хранить при комнатной температуре не более 3 ч, при температуре +2...+8°С не более 1 суток, при температуре –12 ... –22 °С не более 1 месяца.

Тромболитическое действие фармакологических веществ *in vivo* изучают у крыс Вистар на модели внутрисосудистого тромбоза, который воспроизводят в сонной артерии [39]. Для этого у наркотизированных крыс в асептических условиях под местной анестезией выделяют общую сонную артерию, на сосуд накладывают датчик и регистрируют кровоток. На сосуд накладывают ватный тампон массой 1,5 мг, пропитанный тромбирующим раствором, содержащий 10% раствор FeCl₂ или 10% раствор FeSO₄ × 7H₂O и 50% аскорбиновой кислоты. Окружающие ткани изолируют прокладкой из полиэтиленовой пленки. Через 15 мин ватный тампон убирают и тщательно промывают операционное поле физиологическим раствором. Процесс тромбообразования с полной окклюзией сосуда протекает в течение первого часа после момента аппликации тромбирующего раствора. Затем рану послойно ушивают и обрабатывают антисептиками.

Фармакологическое вещество с предполагаемой тромболитической активностью вводят после тромбообразования однократно или курсом (в соответствии с протоколом исследования).

Через сутки животное повторно наркотизируют и измеряют кровоток в сонной артерии. Далее проводят эвтаназию и иссекают сегмент общей сонной артерии. Тромб извлекают, промывают в физиологическом растворе, удаляют избыток влаги фильтровальной бумагой, высушивая до постоянной массы при температуре 60 °С, и после этого взвешивают на аналитических весах.

Тромболитическую активность фармакологического вещества оценивают по следующим критериям: средней массе тромба в получающей ЛС группе по сравнению с контрольной группой, доли крыс с реканализацией общей сонной артерии (судя по данным кровотока), отношению уровня кровотока через 24 ч к исходному уровню.

Продолжительность эксперимента 3 дня.

Как правило, тромболитическая активность фармакологического вещества отчетливо выявляется, если в контрольной и получающей ЛС группах будет по 8–10 крыс. Межгрупповые различия показателей оценивают с использованием непараметрических критериев χ^2 (хи-квадрат) и Манна-Уитни U-тест.

5. Оценка специфической фармакологической активности гемостатических средств местного и системного действия

Существует большое количество гемостатических препаратов на основе субстанций различной природы, представленных различными лекарственными формами — растворы (адреналин, вазопресин, викасол, тромбин, collagen, капрофер, ϵ -аминокапроновая кислота, транексамовая кислота), порошки (авитен, статин, тромбин, фибриноген, желпластан, гидроксипатит, полисорб), губки (гентакол, тахокомб, комбутек, тромбокол, гемостатическая губка, стимул-осс, гемосепт, оксицелодекс, суржицель, спонгостан, жельфом, хитал-био, коллахит, гелевин, феракрил), аппликации на текстильных носителях (гемотекс, активтекс, колетекс-гем, фармитекс, экомед-био, гемостопан) и клеевые композиции (фибриновые клеи — тиссукол, берипласт, тромбостат, тиссель, тканевой латексный клей, сульфакрилат, биоклей-ЛАБ). Выбор конкретной формы местного гемостатика определяется силой кровотечения, местом и доступностью зоны поврежденных сосудов, и главное — задачами врача.

Целью и задачей исследования при изучении новых веществ является оценка их гемостатической активности в эксперименте на животных.

Для оценки местных гемостатических средств используют крыс, собак, свиней, но чаще всего кроликов, т.к. количество крови у них составляет по разным данным от 5,45% до 7,69% массы тела, что позволяет забирать кровь для коагулологических проб — до 40 мл крови без нарушения гемостазиологических показателей, а также в связи с тем, что реакция кролика на различные ЛС близка к таковой у человека. Принимая во внимание сезонные сдвиги системы гемостаза и ее зависимость от метеофакторов, в эксперимент всегда включают контрольную группу (группа здоровых животных, не подвергавшихся фармакологическим воздействиям, получавших стандартное питание, утвержденное нормативами содержания животных в виварии). Моделирование капиллярно-паренхиматозных кровотечений чаще всего производится на печени, селезенке, почках, т.к. определение времени остановки кровотечения на хвосте крысы, на ухе кролика и др. дает большой разброс результатов по сравнению с оценкой гемостатического эффекта на паренхиматозных органах.

Основными критериями эффективности гемостатического препарата местного действия являются время остановки кровотечения и объем кровопотери [40].

Эксперименты по оценке специфической фармакологической активности гемостатических средств местного действия проводят на кроликах под тиопенталовым наркозом (6–9 мл 1,0% раствора внутривенно, а затем 6–10 мл 1,5% раствора внутривентально из расчета на килограмм веса животного). Выполняют лапаротомию с использованием продольного разреза по белой линии живота. В рану выводят кишечник, ограничивая его салфетками, смоченными теплым физиологическим раствором, и переднюю поверхность

печени. С помощью специального приспособления — пластмассового ограничителя с круглым отверстием в центре, производят резекцию выступившей части печени лезвием. Срезанный сегмент в вертикальной проекции имеет вид круга или эллипса, его размеры и форма должны быть постоянны.

Образовавшаяся равномерно кровоточащая рана с ровными краями и равномерной кривизной должна иметь общую площадь около $1,5 \text{ см}^2$ и глубину около $0,3 \text{ см}$.

Для сравнительной оценки исследуемого гемостатического средства и контроля на доле печени одновременно производят два вышеописанных среза. Статистический анализ даже небольшого количества экспериментов позволяет нивелировать отклонения результатов, связанных с различной анатомической локализацией ран в контрольной и получавшей ЛС группе. С этой целью меняют локализацию контрольных и опытных участков геморрагии в разных исследованиях. В качестве контроля используют тампон из марлевых салфеток, в качестве препарата сравнения — известные гемостатические средства: в форме порошка — коллаген «Авитен», в форме губки «ТахоКомб», в форме текстильного покрытия «Гемотекс» и др. Остановку развившегося капиллярно-паренхиматозного кровотечения выполняют одновременно путем нанесения на одну рану известного гемостатического средства, а на другую — исследуемого. При этом гемостатические средства должны полностью покрывать всю раневую поверхность. Время остановки кровотечения определяют по секундомеру. У интактных кроликов время остановки кровотечения колеблется в интервале от 180 до 270 с. Критерием оценки момента остановки кровотечения является полное отсутствие проникновения крови через поверхность и края применяемого гемостатика.

В конце эксперимента необходимо измерить массу излившейся крови (кровопотерю). Если гемостатик представляет собой повязку, губку или пленку, то для этого следует знать вес применяемых гемостатиков в чистом виде и после пропитывания их кровью. Разница в весе является кровопотерей в данном эксперименте. Если же испытывается порошок или жидкость, то их надо нанести на марлевом тампоне, измерив его вес до и после пропитывания кровью.

Метод определения кровопотери основан на определении веса истеченной крови при экспериментальном моделировании кровоточащей раны [41].

Объем кровопотери определяют гравиметрическим методом, который основан на допущении, что 1 мл крови имеет массу 1 г. Марлевый тампон, предварительно взвешенный в бюксе на лабораторных весах общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 300 г, с погрешностью $\pm 10 \text{ мг}$, равномерно наносят на всю площадь поверхностной раны печени. После полной остановки кровотечения тампон, пропитанный кровью, снимают с раны и повторно взвешивают в том же бюксе.

Объем кровопотери P определяют по формуле:

$$P = M_a - M_0,$$

где M_0 — первоначальная масса марлевого тампона, мг; M_a — масса тампона с кровью, мг.

Объем кровопотери определяют для каждой опытной точки. У контрольной группы кроликов он составляет 3–5 г.

Среди гемостатических средств системного действия важное место занимают препараты, активирующие синтез факторов свертывания крови преимущественно в печени. Основным препаратом этой группы является витамин К1. Он активирует, в частности, синтез протромбина (фактор II), проконвертина (фактор VII), Кристмас-фактора (фактор X), фактора Стюарта-Прауера (фактор IX). Этот препарат выпускается зарубежными фирмами под названием «Мефитон», «Конакион».

Оценка специфической фармакологической активности препаратов этой группы проводится по измерению протромбинового индекса или международного нормализованного соотношения. Эффект витамин К1-подобных препаратов проводят на кроликах на фоне введения антикоагулянтов непрямого действия (варфарин, синкумар, фенилин), удли-

няющих протромбиновое время в 2–2,5 раза, сравнивая их эффект с вышеуказанными препаратами витамина К1. При моделировании варфарин-индуцированной коагулопатии у интактных кроликов осуществляют контрольный забор крови методом свободного падения капель для определения времени свертывания цельной крови и протромбинового времени. Затем в течение трех дней животным перорально вводят растворенный в физиологическом растворе порошок варфарина в дозе 0,15 мг/кг. На четвертые сутки у животных осуществляют повторный забор крови для определения времени свертывания цельной крови и протромбинового времени. Затем данные животные исследуются в остром эксперименте по методике определения времени остановки кровотечения и объема кровопотери. Для этого животных наркотизируют тиопенталом, выполняют лапаротомию, используя продольный разрез по белой линии живота. В рану выводят кишечник, ограничивая его салфетками, смоченными теплым физиологическим раствором, и переднюю поверхность печени. С помощью специального приспособления-ограничителя бритвой наносят поверхностную рану печени размером около 1,5 см² и глубиной около 0,3 см. Контрольную остановку развившегося капиллярно-паренхиматозного кровотечения выполняют путем равномерного наложения на всю площадь раневой поверхности марлевого тампона. Через определенные интервалы времени для сравнения с контролем наносят поверхностную рану печени и определяют время остановки кровотечения с помощью секундомера. На каждой экспериментальной точке определяют время остановки кровотечения, а также объем кровопотери [42].

Эффект антагонистов гепарина можно оценить *in vitro* и *in vivo* по степени инактивации гепарина в тестах времени свертывания цельной крови и АПТВ. При этом доза гепарина должна быть таковой, чтобы удлинить указанные параметры в 2–2,5 раза. Для создания коагулопатии посредством гепарина данный антикоагулянт вводят в дозе 500 МЕ/кг (разведенной в 2-х мл физиологического раствора), включают секундомер и отбирают кровь методом свободного падения капель для определения активированного парциального тромбoplastивного времени (АПТВ) и время свертывания цельной крови (ВСЦК) через определенные интервалы времени. Производят центрифугирование в течение 20 мин при 2800 g (Eppendorf 5702), отбирают плазму для исследования АПТВ на коагулометрах «Юнимед 701 М» (Россия), используя реактивы фирмы «Ренам» (Россия); измерение АПТВ для каждой точки проводят 5–7 раз.

Эффект новых антагонистов гепарина необходимо сравнить с таковым у протаминсульфата и полибрана. Эксперименты с внутривенным введением веществ целесообразно проводить на кроликах или собаках.

Оценка препаратов факторов VIII и IX проводится в соответствии с существующими фармстатьями в системе АПТВ на плазмах, дефицитных по указанным факторам. При этом исследуемое средство следует сравнить с эффектом PPSB (фактор IX) или криобулином (фактор VIII). Эксперимент *in vivo* возможен лишь на линиях животных, дефицитных по указанным факторам.

Наряду с соединениями, способствующими синтезу факторов свертывания крови, описаны вещества, активирующие различные факторы гемостаза в кровотоке, в частности, известны активаторы фактора XIII. Подобным свойством обладает эллаговая кислота. Она сокращает время свертывания цельной крови, кефалиновое время, не оказывает влияния на протромбиновое время, тромбиновое время, АПТВ, эуглобулиновый лизис, агрегацию тромбоцитов.

Наиболее сильным гемостатическим средством системного действия в настоящее время является препарат активированного фактора VII «NovoSeven» (фирма NovoNordisk), с действием которого желателно сравнить эффект предлагаемых средств системного действия.

Специфическая активность средств, останавливающих кровотечение, с неизвестным механизмом действия проводится на основе интегральных коагулологических тестов: время свертывания цельной крови, время рекальцификации плазмы, АПТВ. Следует от-

метить, что не всякое кровоостанавливающее средство обязательно должно влиять на свертываемость. Оно может сокращать гладкую мускулатуру, снижать сосудистую проницаемость, что можно оценить по тестам, не входящим в круг настоящих методических рекомендаций.

Для остановки кровотечений используются не только стимуляторы фибринообразования, но и ингибиторы фибринолиза. Оценку специфической фармакологической активности этих средств проводят вначале *in vitro* с помощью хромогенных субстратов на плазмин.

Для проведения анализа на первом этапе к 200 мкл стандартной плазмы добавляют раствор потенциального ингибитора фибринолиза в объеме 25–30 мкл. Для контроля используют ту же плазму, в которой вместо исследуемой субстанции добавляют физиологический раствор. Полученные смеси инкубируют 10 мин при 37°С. Дальнейшие исследования проводят следующим образом. В пластиковой пробирке смешивают 20 мкл исследуемой плазмы с ингибитором, 200 мкл раствора стрептокиназы, концентрация которой в исходном растворе составляет 1000 ед/мл и 800 мкл 0,05 М трис-НСl буфера, содержащего 0,15 М NaCl (рН 7,4). Смесь инкубируют 15 мин при температуре 37°С, затем переносят смесь в кювету, добавляют 200 мкл раствора субстрата For-Ala-Phe-Lys-pNa. H Br (концентрация исходного раствора 4 мг/мл). Через 120 с добавляют 1 мл 15% раствора уксусной кислоты, перемешивают и через 5–10 мин определяют оптическую плотность исследуемого образца плазмы при длине волны 405 нм. Точно так же измеряют оптическую плотность раствора, содержащего ту же плазму без добавления ингибитора, объем которого замещают физиологическим раствором. Ингибирование фибринолиза рассчитывают в % по формуле:

$$\frac{DA_1 - DA_2}{DA_1} \times 100\%,$$

где DA_1 — оптическая плотность плазмы, не содержащей исследуемой субстанции; DA_2 — оптическая плотность плазмы, содержащей потенциальный ингибитор.

В каждом исследовании перед добавлением хромогенного субстрата измеряют оптическую плотность растворов (фон), которая вычитается из значения оптической плотности после добавления субстрата.

Описание дано для работы с кюветой объемом 2 мл. При работе с кюветой вместимостью 1 мл объем реагентов уменьшают в 2 раза.

Исследования *in vitro* можно проводить также по методу Astrup на фибриновых пластинах или эуглобулиновым методом [43].

In vivo в экспериментах на крысах или собаках также проводят контроль фибринолитической активности с помощью наборов с хромогенными субстратами либо на фибриновых пластинах, либо эуглобулиновым методом.

Конкретную точку приложения действия потенциального антифибринолитического агента можно уточнить в постскрининговых исследованиях, изучив его влияние на активность тканевого и урокиназного активаторов плазминогена, толерантность сгустка к плазмину и др.

Препаратами сравнения в случае непосредственного ингибитора плазмина могут быть контрикал или апротинин. Если же ингибитор является блокатором генерации плазмина, то его целесообразно сравнить с амбеном или аминокaproновой кислотой.

Заключение

Рекомендованное комплексное исследование позволяет выявить ФС, которые по спектру и характеру своего действия могут быть предложены для КИ в качестве лекарственных регуляторов функции гемостаза.

Вместе с тем нужно иметь в виду, что в процессе доклинического изучения нового ФС может возникнуть необходимость проведения дополнительных исследований,

направленных на более детальное изучение механизмов действия, имеющих важное значение для оптимизации клинического применения каждого из предложенных веществ.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. B.G. Born Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature* — 1962. — V. 194. — p. 927–929.
2. E.F. Plow, M.D. Pierschbacher, E. Ruoslahti, G.A. Marguerie, M.H. Ginsberg The effect of Arg-Gly-Asp-containing peptides on fibrinogen and von Willebrand factor binding to platelets. // *Proc Natl Acad Sci U S A.* — 1985, V. 82. — p. 8057–8061.
3. D.C. Cardinal, R.J. Flower The electronic aggregometer: a novel device for assessing platelet behavior in blood // *Jnl. Pharm. Meth.* — 1980. — V. 3. — p. 135–158.
4. B. Walkowiak, E. Michalak, W. Koziolkiewicz, C.S. Cierniewski Rapid photometric method for estimation of platelet count in blood plasma or platelet suspension. // *Thromb Res.* — 1989. — v. 15. — p. 763–766.
5. G. DiMinno, M.J. Silver Mouse Antithrombotic Assay: A Simple Method for the Evaluation of Antithrombotic Agents *in vivo*. Potentiation of Antithrombotic Activity by Ethyl Alcohol // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* — 1983. — Vol. 225 — № 1. — P. 57–60.
6. K.D. Kurz, B.W. Main, G.E. Sandusky Rat model of arterial thrombosis induced by ferric chloride // *Thromb. Res.* — 1990. — Vol. 15. — P. 269–280.
7. A.C.G. Uprichard, K.P. Gallagher Antithrombotics (Handbook of experimental pharmacology), Springer-Verlag Berlin Heidelberg (1999). — Vol. 132. — 485 p.
8. Балуда В.П., Балуда М.В., Деянов И.И. и др. Методические подходы к восстановлению антиагрегационных свойств стенки сосудов // *Патол. физиол. и эксперим. терапия.* — 1987. — № 4. — С. 51–54.
9. Климанова Е.В., Марков В.А., Петрухин Г.Н. и др. Влияние рентгеноконтрастных средств на тромборезистентные свойства сосудистой стенки // *Эксперим. и клин. фармакология.* — 2009. — Т. 72, № 2. — С. 41–43.
10. Born G.V.R. Aggregation of blood platelets by adenosine diphosphate and its reversal // *Nature.* — 1962. — Vol. 194, № 4832. — P. 927–929.
11. Warkentin T.E. // Bivalent direct thrombin inhibitors: hirudin and bivalirudin // *Best Pract Res Clin Haematol*, 2004. — V. 17, № 1. — P. 105–125.
12. Robertson J.D., Brandao L., Williams S. // Use of a single anti-Xa calibration curve is adequate for monitoring enoxaparin and tinzaparin levels in children // *Thromb Res* 2008; 122(6): 867–9.
13. <http://www.isth.org/Publications/tabid/59/Default.aspx>.
14. Leech B.F., Carter C.J. // Falsely elevated INR results due to the sensitivity of a thromboplastin reagent to heparin // *Am J Clin Pathol* 1998; 109(6): 764–8.
15. Rosenberg, R.D. // Biological actions of heparin // *Seminars in Hematology*, 1977. — V. 14, № 4. — P. 427–440.
16. Stuart R.K. Monitoring heparin therapy with the activated partial thromboplastin time // *Can Med Association J.*, 1971. — V. 104, № 5. — P. 385–388.
17. Coyne E. // Heparin — past, present and future. In.: *Chemistry and biology of heparin* / E. Coyne. Ed. Lundblad R.L., Brown W.V., Mann K.G., Roberts H.R. Ch. I. New-York: Elsevier/North-Holland, 1981. — P. 9–17.
18. Баркаган З.С., Момот А.П. / Тест с ядом щитомордника обыкновенного // В кн.: *Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза.* — М.: Ньюдиамед, 2001. — С. 98–99.
19. Баркаган З.С., Момот А.П. / Тест с ядом эфы многочешуйчатой // В кн.: *Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза.* — М.: Ньюдиамед, 2001. — С. 97–98.
20. Teien A.N., Lie M. // Evaluation of an amidolytic heparin assay method: increased sensitivity by adding purified antithrombin III // *Thromb Res.*, 1977. — V. 10, № 3. — P. 399–410.

21. E. Yin, S. Wessler, J. Butler // Plasma heparin: a unique, practical, submicrogram-sensitive assay // J Lab Clin Med, 1973. — V. 81, № 2. — P. 298–310.
22. H. Motulsky, A. Cristopoulos // Fitting Models to Biological Data using Linear and Nonlinear Regression / GraphPad Software Inc., San Diego CA, 2003. — 553 p.
23. Rezaie, A.R. Determinants of specificity of factor xa interaction with its physiological inhibitors // Mini Rev Med Chem, 2006. — V. 6, № 8. — P. 859–865.
24. A. Teien, M. Lie, U. Abildgaard // Assay of heparin in plasma using a chromogenic substrate for activated factor X // Thromb Res., 1976. — V. 8, № 3. — P. 413–416.
25. C. Sollier, C. Kang, N. Berge, J. Herault, M. Bonneau, J. Herbert, L. Drouet // Activity of a synthetic hexadecasaccharide (SanOrg123781A) in a pig model of arterial thrombosis // J Thromb Haemost, 2004. — V. 2, № 6. — P. 925–930.
26. N. Drozd, A. Sher, V. Makarov, L. Galbraikh, G. Vichoreva, I. Gorbachiova // Comparison of antithrombin activity of the polysulphate chitosan derivatives in *in vivo* and *in vitro* system // Tromb. Res., 2001. — V. 102, № 5. — P. 445–455.
27. Баркаган З.С., Момот А.П. // Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза. — М.: Ньюдиамед, 2001. — С. 284.
28. Дрозд Н.Н., Толстенков А.С., Макаров В.А., Кузнецова Т.А., Беседнова Н.Н., Шевченко Н.М., Звягинцева Т.Н. // Фармакодинамические параметры антикоагулянтов на основе сульфатированных полисахаридов из бурых водорослей // Бюл. Эксп. биол. мед., 2006. — Т. 142, №5. — С. 591–593.
29. C. De Swart, B. Nijmeyer, J. Roelofs, J. Sixma // Kinetics of intravenously administered heparin in normal humans // Blood, 1982. — V. 60, № 6. — P. 1251–1258.
30. S. Wessler, S. Reimer, M. Sheps // Biologic assay of a thrombosis-inducing activity in human serum // J. Appl Physiol, 1959. — № 14. — P. 943–946.
31. Дюк В. Обработка данных на ПК (в примерах): учебник для вузов / В. Дюк. — СПб.: издательство «Питер». — 1997. — 214 с.
32. Макаров В.А. Лекарственные средства для лечения ДВС-синдрома // 1997. — *Materia Medica*. — 1. — 13. — С. 37–43.
33. Баркаган З.С., Момот А.П. Диагностика и контролируемая терапия нарушений гемостаза // М.: Ньюдиамед, 2001.
34. Неведрова О.Е., Воюшина Т.Л., Момот А.П., Мамаев А.Н., Баркаган З.С., Макаров В.А., Зяблицкая Н.К. Наборы с отечественными хромогенными субстратами для диагностики патологии гемостаза // Пособие для врачей, 2004.
35. И.В. Березин и С.Д. Варфоломеев Химическая и биологическая кинетика — 1983. — Изд-во Московского университета.
36. A. Bernat, F. Dol, M. Herbert D. Collen, De Mol M., F. Demarsin et.al. Plasminogen activator inhibitor-1 gene-deficient mice. II. Effects on hemostasis, thrombosis, and thrombolysis // Fibrinolysis, 1993, 7, 1, 23–40.
37. D. Collen, H. Lijnen Fibrin-specific fibrinolysis // Ann. NY Acad.Sci. — 1992. — 667. — 259–71.
38. Неведрова О.Е. Новые диагностикумы для оценки функции гемостаза // Диссертация канд. биол. наук — М., 2000.
39. Максименко А.В., Тищенко Е.Г. Антиоксидантная биотерапия для защиты сосудистой стенки производными супероксиддисмутазы и каталазы // Цитология, 1999. — Т. 41, № 9. — С. 821–822.
40. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Фисенко В.П. — Москва: Ремедиум, 2000. — 398 с.
41. Абакумов М.М., Ложкин А.В., Хватов В.Б. Оценка объема и степени кровопотери при травме груди и живота // Хирург. им. Пирогова. — №11. — 2002. — С. 4–7.
42. Белозерская Г.Г. Разработка новых гемостатических средств местного и системного действия (экспериментальное исследование) // Дисс. ... д.м.н. — Москва. — 2009.
43. Балуда В.П., Баркаган З.С., Гольдберг Е.Д. и др. Лабораторные методы исследования системы гемостаза // Томск: Красная звезда, 1980. — 124 с.

ГЛАВА 28

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ НАРУШЕНИЙ МОЗГОВОГО КРОВООБРАЩЕНИЯ И МИГРЕНИ

*Составители: проф. Р.С. Мирзоян; д. б. н., проф. М.Б. Плотников; д. б. н. Т.С. Ганьшина;
д. м. н., проф. А.В. Топчян; д. м. н. Г.А. Чернышева*

Введение

Фармакологическая регуляция нарушений мозгового кровообращения является одной из важнейших проблем современной фармакологии и медицины, что определяется высоким уровнем смертности и инвалидности населения от сосудистой патологии мозга. В структуре цереброваскулярных расстройств существенная роль принадлежит ишемическим поражениям головного мозга. Об этом свидетельствует частота ишемических инсультов, преходящих и динамических нарушений мозгового кровообращения. Спазмы сосудов мозга имеют место и выражены в значительной степени при геморрагическом инсульте и субарахноидальном кровоизлиянии. Недостаточность кровоснабжения мозга характерна и для первой пусковой фазы приступа мигрени. В связи с этим поиск новых ЛС, улучшающих мозговое кровообращение, в том числе противомигреновых, является весьма актуальной проблемой. Об этом свидетельствуют также недостаточная эффективность и наличие существенных побочных эффектов у применяемых в неврологической практике фармакологических средств.

1. Общие положения

Препараты, улучшающие мозговое кровообращение, применяются в неврологической практике для лечения ишемических поражений мозга и ишемических инсультов. Однако вопрос о целесообразности и сроках назначения указанных препаратов решается неоднозначно. Так, одни исследователи применяют цереброваскулярные средства сразу же после наступления ишемического инсульта, а другие — в течение первых суток воздерживаются от назначения препаратов, улучшающих мозговое кровообращение. Дело в том, что применяемые в клинической практике цереброваскулярные препараты в той или иной степени обладают гипотензивными свойствами. Вместе с тем в условиях нарушения ауторегуляции мозгового кровотока, которое формируется при сосудистой патологии мозга, всякое снижение уровня артериального давления, а, следовательно, и перфузионного давления, вызывает дальнейшее ухудшение кровоснабжения ишемизированных областей мозга.

Цель настоящих методических рекомендаций — обозначить стратегию и описать поэтапно программу разработки препаратов, улучшающих мозговое кровообращение. Задачей, лежащей в основе реализации этой программы, является поиск и углубленное изучение на соответствующих моделях сосудистых заболеваний таких соединений, которые способны:

- а) существенно увеличивать мозговое кровообращение;
- б) не обладать выраженным гипотензивным эффектом;
- в) преимущественно улучшать кровоснабжение ишемизированных областей мозга.

Методология поиска средств для лечения мигрени отличается от собственно цереброваскулярных препаратов, несмотря на важное значение сосудистого компонента в

патогенезе этого заболевания. Так, в настоящее время установлено, что в генезе приступа мигрени существенную роль играет нейромедиатор серотонин. Показано, что серотонин, с одной стороны, оказывает выраженное сосудосуживающее влияние на мозговые артерии, а с другой — участвует в проведении болевых импульсов. Известно, что первая фаза приступа мигрени характеризуется констрикторной реакцией церебральных сосудов, вслед за которой отмечается компенсаторное понижение тонуса сосудов мозга. Применение в клинической практике как антагонистов, так и агонистов серотониновых рецепторов подтверждает участие серотонина в патогенезе мигрени. Для профилактики приступа мигрени используются антагонисты 5HT₂-типа серотониновых рецепторов (метилсергид, пизотифен). Купируют приступ мигрени как антагонисты серотонина (эрготамин, дигидроэрготамин), так и агонисты 5HT₁-типа рецепторов (суматриптан и др.).

Учитывая важную роль цереброваскулярного компонента в генезе приступа мигрени, при поиске новых противомигренозных препаратов важно, чтобы вещество проявляло антисеротониновую активность по отношению к церебральным сосудам и к нейромедиаторным системам, участвующим в проведении болевых импульсов. Используемые в настоящее время агонисты 5HT₁-рецепторов повышают тонус сосудов, в том числе коронарных, что является весьма существенным побочным эффектом, ограничивающим их применение в медицинской практике.

2. Основные этапы исследования

Разработка препаратов, улучшающих мозговое кровообращение, как правило, проводится в несколько этапов:

- скрининг, позволяющий выявить соединения с цереброваскулярной активностью;
- углубленное исследование отобранных соединений на моделях цереброваскулярных заболеваний;
- изучение механизма действия перспективных соединений.

2.1. Скрининг соединений для выявления у них цереброваскулярной активности

Цель этого этапа исследования — выявление соединений, которые обладают выраженным и относительно избирательным влиянием на мозговое кровообращение и превосходят эталонные препараты.

Основная задача включает в себя обязательное исследование общего или регионарного мозгового кровотока в сопоставлении с изменениями системного артериального давления и частоты сердечных сокращений. Значительные изменения системного артериального давления и частоты сердечных сокращений следует рассматривать как побочный эффект, который может ограничивать прямое влияние на мозговое кровообращение. Важно выявить диапазон доз, в которых соединение проявляет избирательное действие на мозговой кровоток без существенных изменений системного артериального давления. Соединения, оказывающие выраженное гипотензивное действие (снижение на 15% и более от исходного артериального давления), исключаются из дальнейшего исследования.

Изучение мозгового кровообращения, системного артериального давления в острых или хронических экспериментах проводят на крысах, кроликах, кошках, собаках.

На этом и последующих этапах кровоснабжение мозга оценивают путем измерения:

- 1) кровотока в каротидных или вертебробазиллярных артериальных системах или оттока крови из мозга с помощью расходомеров (ультразвукового, электромагнитного и др.);
- 2) мозгового кровотока, определяемого с помощью радиоактивных инертных газов при их ингаляции (ксенон-133);
- 3) мозгового кровотока, измеренного с помощью позитронной эмиссионной томографии;
- 4) мозгового кровотока с помощью меченых микросфер;

5) локального кровотока в отдельных структурах мозга, оцениваемого полярографическим методом с регистрацией водородного клиренса при его ингаляции или генерации в мозговой ткани;

6) локального кровотока в коре головного мозга с помощью лазерных или ультразвуковых доплеровских флоуметров.

Выбор вида животных, методики оценки мозгового кровообращения, диапазона доз исследуемых соединений, путей, режимов и продолжительности их введений, а также продолжительность всего эксперимента определяются протоколом исследования.

Оценку возможного избирательного влияния соединений на мозговое кровообращение можно производить и на изолированных сосудах мозга. Однако эти эксперименты могут быть лишь предварительным этапом скрининга, так как они позволяют оценивать влияние веществ на сосуды мозга в условиях изоляции от системной гемодинамики, изменения которой могут существенно модулировать влияние соединения на кровоснабжение мозга.

Для изыскания новых средств для лечения мигрени не обязательно изучение влияния этих соединений на церебральную гемодинамику интактных животных. Поиск этой группы препаратов следует проводить со второго этапа доклинических исследований, а именно с определения их эффективности в условиях расстройств мозгового кровообращения серотонинергической природы.

2.2. Определение эффективности соединений в условиях экспериментальных цереброваскулярных расстройств

Выявленное на первом этапе избирательное влияние соединения на церебральную гемодинамику не гарантирует его достаточной эффективности при различных формах расстройств мозгового кровообращения. Поэтому целью следующего этапа является определение эффективности перспективного соединения в условиях сосудистой патологии мозга в сравнении с эталонным препаратом.

Основная задача на этом этапе — изучение влияния перспективного соединения на мозговой кровоток на модели (моделях), воспроизводящих различные нарушения мозгового кровообращения. Принципиальным является использование адекватных экспериментальных моделей, воспроизводящих основные звенья патогенеза сосудистых заболеваний мозга. Для решения задачи этапа рекомендуется использование следующих моделей.

2.2.1. Локальная ишемия мозга, вызванная перевязкой средней мозговой артерии у крыс

Для поиска средств для лечения ишемического инсульта необходимо использовать экспериментальную модель, наиболее приближенную к указанной патологии. Такой моделью является локальная ишемия мозга, вызванная перевязкой средней мозговой артерии у крыс.

Исследование проводится на крысах с массой тела 350–400 г под общей анестезией хлоралгидратом (400 мг/кг внутривенно).

Животных помещают в специально сконструированную установку, которая позволяет удобно и жестко фиксировать голову в боковом положении левой стороной вверх. Операцию производят с помощью нейрохирургической бинокулярной лупы с волоконным осветителем (ЛБВО). После удаления шерстного покрова и обработки операционного поля делают разрез кожи по ходу скуловой кости (около 2 см). Затем расширяют раневую поверхность ранорасширителем и обнажают слонную железу, расположенную в заднеинфимном квадрате операционного поля. С помощью микрохирургических инструментов слонную железу вместе с сосудистым сплетением аккуратно отделяют от окружающих тканей и перемещают в задневерхний квадрат с ее последующей иммобилизацией. После удаления скуловой кости раскрываются края крепления височной мышцы к нижней челюсти и с помощью бормашины производится щадящий разрез кости по краю крепления к ней сухожилия указанной мышцы. Далее поднимают с помощью крючков нижний край

височной мышцы кверху, при этом обнажается височная ямка, дно которой образует крыловидная мышца с проходящим рядом нижнечелюстным нервом. С помощью специально сконструированного ранорасширителя раздвигается крыловидная мышца, вследствие чего открывается поверхность черепа между овальным отверстием и отверстием зрительного нерва. В этой области, а именно под нижним краем височно-челюстного сустава, сверлится отверстие диаметром около 2 мм и тем самым обнажается место расположения среднечелюстной артерии. Дальнейшую операцию по перевязке указанной артерии проводят под микроскопом с большим фокусным расстоянием ($f=190$ мм) под большим увеличением (14,0×3,3). Под левую среднюю мозговую артерию подводят иглу с этиконовой нитью толщиной 10/0 (Ethicon Ltd.), прокалывая иглой твердую мозговую оболочку. Перевязку среднечелюстной артерии проводят у ее основания. После перевязки ток крови по средней мозговой артерии прекращается, что можно наблюдать в поле зрения под микроскопом.

С целью проведения исследований на бодрствующих животных по возможности восстанавливают топографию мышц и мягких тканей операционного поля. В частности, прикрепляют сухожилия височной мышцы к нижней челюсти для сохранения жевательного процесса. При такой постановке исследований создается возможность для проведения исследований на оперированных животных в течение месяца и более.

2.2.2. Локальная преходящая ишемия мозга, вызванная интралюминальной окклюзией мозговых сосудов

Вариантом модели локальной ишемии головного мозга с рециркуляцией является модель интралюминальной окклюзии мозговых сосудов у крыс. Крыс наркотизируют этиминалом натрия (60 мг/кг внутривентрикулярно) и отпрепаровывают общую сонную артерию (правую либо левую), наружную сонную артерию (в области бифуркации общей сонной артерии) и внутреннюю сонную артерию до места ее вхождения в полость черепа через каротидный канал. После лигирования проксимального конца отпрепарованного участка общей сонной артерии накладывают клипсу на ее дистальный (краниальный) конец, подводят под сосуд лигатуру и через разрез вводят силиконизированную нейлоновую нить диаметром 0,13 мм. Суживают просвет дистального участка общей сонной артерии лигатурой, не затягивая ее полностью, снимают клипсу и под контролем зрения продвигают нейлоновую нить через внутреннюю сонную артерию в полость черепа приблизительно на 15–20 мм от места бифуркации сонной артерии (в зависимости от размера крысы), что соответствует отхождению средней мозговой артерии от виллизиева круга. Манипуляции осуществляют под контролем тканевого кровотока в участках мозга, снабжающихся кровью через среднюю мозговую артерию с помощью высокочастотной ультразвуковой или лазерной доплерографии.

При моделировании необратимой окклюзии средней мозговой артерии лигатуру на краниальном участке общей сонной артерии затягивают и рану ушивают.

При моделировании локальной ишемии через 30–60 мин нить извлекают, лигатуру затягивают, рану ушивают.

В зависимости от времени окклюзии средней мозговой артерии формируется значительное повреждение коры и стриатума головного мозга, сопровождающееся отеком мозговой ткани.

2.2.3. Глобальная ишемия головного мозга

Модели глобальной ишемии включают модель преходящей ишемии и модель глобальной ишемии головного мозга.

2.2.3.1. Модели глобальной преходящей ишемии

Билатеральная окклюзия общих сонных артерий в сочетании с контролируемой гипотензией. Модель воспроизводят у крыс билатеральной окклюзией общих сонных артерий в сочетании с контролируемой гипотензией. Артериальное давление понижают до 50 мм

рт. ст. Гипотензия необходима для моделирования ишемии мозга, так как двусторонняя перевязка общих сонных артерий не обеспечивает понижения мозгового кровотока до величин, при которых развивается ишемическое поражение. Понижение артериального давления достигается контролируемым кровопусканием или применением ганглиоблокаторов, α -адреноблокаторов.

Двусторонняя перевязка общих сонных артерий и понижение артериального давления вызывают морфологические изменения в клетках избирательно уязвимых структур — в пирамидальных нейронах СА 1, в гиппокампе, сауборутаме и новой коре. При этом развиваются также нарушения энергетического обмена в ткани мозга.

Двусторонняя окклюзия сонных артерий после предварительной перевязки (коагуляции) позвоночных артерий. Крыс наркотизируют этиминалом натрия (60 мг/кг внутривентрикулярно) и фиксируют спиной кверху, удаляют в области шеи шерстный покров, делают разрез кожи от проекции остистого отростка II шейного позвонка к нижнему краю уха. Тупым методом раздвигают мышцы, ориентируясь на поперечный отросток I шейного позвонка, и обнажают дорсальную поверхность последнего. Находят отверстие вертебрального канала и коагулируют тонким каутером вертебральную артерию. Рану ушивают и коагулируют аналогичным образом вертебральную артерию контрлатеральной стороны.

Через 3–5 дней для моделирования глобальной транзиторной ишемии головного мозга проводят билатеральную окклюзию общих сонных артерий на 30–60 мин, при этом кровоснабжение головного мозга осуществляется через виллизиев круг только по а. spinalis ventralis с развитием тяжелого ишемического поражения головного мозга. Наблюдается расширение зрачков, побледнение видимой части сосудистой оболочки глаза, нарушение ритма дыхания вплоть до его остановки (требует использования аппарата искусственной вентиляции легких).

2.2.3.2. Глобальная ишемия, вызванная гравитационной перегрузкой

Продольные гравитационные перегрузки, создаваемые центрифугой, вызывают нарушения кровоснабжения головного мозга, тяжесть и характер которых зависит от величины, продолжительности и вектора радиальных ускорений. При краниокаудальном векторе ускорений (положительное радиальное ускорение) происходит перемещение крови в каудальном направлении, и в результате резкого и значительного снижения перфузионного давления во всех сосудах головы развивается ишемия мозга. Объективным показателем ишемии при указанных гравитационных перегрузках является снижение артериального давления в сонных артериях до нулевого уровня. Животных помещают в специальные контейнеры центрифуги (диаметром 2 см) в строго краниокаудальном направлении относительно вектора ускорения, величина которого составляет 10–15 с. По данным литературы такую перегрузку в краниокаудальном направлении можно использовать для тестирования различных видов животных, включая крыс.

2.2.4. Геморрагическое поражение мозга

2.2.4.1. Субарахноидальное кровоизлияние

Субарахноидальное кровоизлияние моделируют на наркотизированных кошках путем введения крови под оболочки мозга. Голова животного фиксируется в стереотаксическом приборе, обнажаются кости черепа. После расчета стереотаксических координат тонким сверлом делают отверстие в кости в области передней супрасильвиевой борозды правого полушария. С помощью тонкой инъекционной иглы с полумягким катетером вводят в субарахноидальное пространство 2 мл аутогенной крови. При морфологическом контроле гематома определяется в виде подболобочечного кровоизлияния вдоль поверхности артерии, проходящей в супрасильвиевой борозде. Изменения кровоснабжения мозга, внутричерепного давления, сопротивления мозговых сосудов и артериального давления соответствуют динамике этих показателей у больных с субарахноидальным кровоизлиянием.

2.2.4.2. Интрацеребральная геморрагия

Может быть воспроизведена у бодрствующих или наркотизированных крыс и кошек. У наркотизированных крыс зубным бором высверливают отверстие в проекции внутренней капсулы: Н=4 мм, L=3 мм, А= -1,3 мм от брегмы). Потом прокалывают твердую мозговую оболочку с помощью заточенной иглы-канюли и погружают ее с помощью стереотаксического прибора до требуемой глубины (4 мм). Затем мандрен-ножом производят деструкцию мозговой ткани в области внутренней капсулы, с последующим (через 2–3 мин) введением в место повреждения крови животного (0,1–0,2 мл), взятого из бедренной артерии. В большинстве случаев кровь распределяется в виде хорошо очерченной гематомы у конца инъекционной иглы с деформацией и разрушением подкорковых структур в области ядер таламуса, реже — в подкорковом белом веществе. У кошек после предварительного стереотаксического вживления полой иглы в область внутренней капсулы внутримозговое кровоизлияние вызывают медленным (в течение 3–4 мин) введением аутогенной крови в объеме 2 мл. Кровь распределяется в виде хорошо очерченной гематомы у конца инъекционной иглы с деформацией и разрушением подкорковых структур в области ядер таламуса, реже — в подкорковом белом веществе. Внутримозговая геморрагия приводит к стойкому понижению общего и локального мозгового кровотока, сопровождающегося в ряде случаев мозаично расположенными очагами гиперемии, и гипоксии мозговой ткани.

2.2.5. Спазмы мозговых сосудов, вызванные серотонином

Моделирование цереброваскулярных расстройств серотонинергической природы необходимо для поиска средств для лечения мигрени. Эксперименты проводятся как на изолированных сосудах мозга, так и на целом животном с регистрацией мозгового кровотока. Влияние веществ на изменения мозгового кровотока и уровень артериального давления, вызванные серотонином (20 мкг/кг, внутривенно), изучают на крысах под общей анестезией (хлоралгидрат 350–400 мг/кг или уретан 1,3 г/кг, внутривенно) или кошках под общей анестезией (уретан 500 мг/кг и хлоралоза 50 мг/кг внутривенно) в условиях искусственной вентиляции легких с регистрацией напряжения углекислоты в артериальной крови ($pCO_2=38-40$ мм рт. ст.). Локальный мозговой кровоток регистрируют с помощью методики лазерной доплеровской флоуметрии. Игольчатый датчик флоуметра диаметром 0,8 мм устанавливают на теменной или другой области коры большого мозга крысы с помощью микроманипулятора и коромысла. Одновременно регистрируют изменения артериального давления через предварительно введенный в бедренную артерию полиэтиленовый катетер. Запись показателей кровотока и артериального давления производят на полиграфе фирмы «ВЮРАК» США, соединенном с персональным компьютером. Регионарный мозговой кровоток регистрируют с помощью ультразвукового или электромагнитного флоуметров, датчики которых диаметром 1–2 мм устанавливают на общей сонной артерии. При этом у крыс перевязывают наружную сонную артерию. У кошек тщательно перевязывают все артерии, питающие кровью экстракраниальные ткани головы, а именно каудальную и краниальную артерии, мышечные ветви, затылочную артерию, язычную, наружную челюстную, большую ушную, поверхностную височную и нижнюю зубную артерии. Артериальное давление регистрируют в бедренной артерии. Серотонин (20 мкг/кг, внутривенно) в большинстве исследований вызывает уменьшение объемной скорости мозгового кровотока на 40–50% и понижение уровня артериального давления. Эффект серотонина наблюдается сразу же после введения и продолжается 5–7 мин. Необходимо отметить, что серотонин при многократном введении (4–6 раз) с интервалом в 30 мин вызывает аналогичные изменения мозгового кровотока и артериального давления. Поэтому после двух контрольных реакций на серотонин вводится испытуемое вещество и затем вновь вводится серотонин.

Учитывая необходимость перорального применения противомигренового средства, после отбора эффективного соединения следует изучить его влияние на изменения моз-

гового кровотока, вызванные серотонином, при введении *per os*. В этих исследованиях продолжительность наблюдения увеличивается до 60–120 мин, что обусловлено особенностями прохождения препарата через ЖКТ.

Как и на предыдущем этапе исследования, методики оценки мозгового кровообращения, применяемые дозы исследуемого соединения, пути, режимы и продолжительности его введения, а также продолжительность всего эксперимента определяются задачами исследования, протоколом исследования.

2.3. Изучение механизмов действия

Для выяснения механизма действия отобранных на втором этапе соединений рекомендуются следующие методические подходы:

1. Изучение собственно сосудистых механизмов действия, включающее:

а) исследование воздействия на рецепторный аппарат стенок мозговых сосудов с помощью агонистов и антагонистов адрено-, холино-, серотонино-, гистамино-, ГАМК-, пептидергических рецепторов (эксперименты *in vivo* и *in vitro* с применением соответствующих анализаторов);

б) исследование мембранного компонента действия (определение активности Na^+ , K^+ -АТФазы, Ca^{2+} -АТФазы), определение содержания цАМФ в стенке мозговых сосудов, их способности продуцировать вазоактивные простагландины, полипептиды и др.;

в) изучение влияния соединения на механизмы формирования сосудистого тонуса гладкомышечных клеток, обмен ионов кальция в гладкомышечных клетках.

2. Исследование влияния соединений на центральные механизмы регуляции мозгового кровообращения путем изучения рефлекторных реакций мозговых сосудов.

3. Изучение реологических свойств крови (вязкости крови и плазмы, гематокрита, агрегации и деформируемости эритроцитов).

4. Изучение влияния соединения на обмен нейромедиаторов (норадреналина, серотонина, ГДМК, глутамата, опиодных пептидов и др.) в ЦНС.

5. Исследование метаболических аспектов действия соединения, в частности на углеводный, белковый и липидный обмен мозговой ткани.

6. Изучение влияния соединений на содержание оксида азота и продуктов перекисного окисления липидов в ткани мозга.

7. Изучение влияния соединений на функциональное состояние мозга.

8. Исследование противотечных свойств соединения, его влияния на уровень внутричерепного давления, вязкоэластические свойства мозга.

Этот этап исследования не является обязательным, но он направлен на выяснение механизмов сосудистого, нейротропного и метаболического действия соединения.

Заключение

Выбор конкретных методических подходов определяется участием тех или иных возможных механизмов действия соединения в патогенетической терапии конкретного сосудистого заболевания мозга.

Экспериментальные данные по изучению препаратов для лечения нарушений мозгового кровообращения и мигрени должны быть статистически обработаны и представлены в виде отчетов в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Гаевый М.Д., Аджиенко Л.М., Макарова Л.М., Абдулсалам А.А. Ишемия головного мозга, вызванная гравитационной перегрузкой. Эксперим. и клин. фармакол. — 2000. — Т. 63, № 3. — С. 63–64.

2. Луньшина Е.В., Ганьшина Т.С., Макарова Л.М., Погорелый В.Е., Мирзоян Р.С. Нейропротекторные свойства пироглутаминовой кислоты в сочетании с пирролидоном // Эксперим. и клин. фармакол. — 2003 — Т. 66, № 1. — С. 20–22.
3. Макаренко А.Н., Косицын Н.С., Пасикова Н.В., Свинов М.М. Метод моделирования локального кровоизлияния в различных структурах головного мозга у экспериментальных животных, Журнал высшей нервной деятельности, 2002. — Т. 52, № 6. — С.765–768.
4. Плотников М.Б., Ваизова О.Е., Суслов Н.И. Анализ изменений спектра мощности электроэнцефалограммы на новой модели ишемии мозга у крыс. Бюл. эксперим. биол. и мед., 1994, № 2, С. 565–567.
5. Топчян А.В., Мирзоян Р.С., Баласанян М.Г. Локальная ишемия мозга крыс, вызванная перевязкой средней мозговой артерии. Эксперим. и клин. фармакол., 1996. — Т. 59, № 5. — С. 62–64.
6. Manual of stroke models in rats. Ed. Yanlin Wang-Fischer. CRC Press. Boca Raton, London, New York, 2009.
7. Koizumi J., Yoshida Y., Nakazawa T., Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema. 1. A new experimental model of cerebral embolism in rats in with recirculation can be introduced he ischemic area. Japan J. Stroke, 1986, 8, P. 1–8.
8. Plotnikov M.B., Logvinov S.V., Suslov №.I., Aliev O.I., Tyukavkina №.A., Tikhonov V.N. The neuroprotective effect of antioxidant complex comprising dihydroquercetin and ascorbic acid in cerebral ischemia. New Trends in Brain Hypoxia Ischemia Research. USA: Nova, 2008, P. 93–133.
9. Pulsinelli W.A., Brierley J. A new model of bilateral hemispheric ischemia in the anaesthetized rat. Stroke, 1979, 10, P. 267–272.
10. Yoshida S., Abe K., Busto R., et al. Influence of transient ischemia on lipid-soluble antioxidants, free fatty acids and energy metabolites in rat brain. Brain Res., 1982, 245, P. 307–316.

ГЛАВА 29

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМЫ И ХРОНИЧЕСКОЙ ОБСТРУКТИВНОЙ БОЛЕЗНИ ЛЕГКИХ

Составитель: д. м. н., проф. Д.Б. Утешев

Введение

Бронхиальная астма (БА) — одно из наиболее часто встречающихся заболеваний. По данным эпидемиологических исследований ее распространенность достигает 5% общей популяции населения, в том числе в детской популяции колеблется в широких пределах 1–30%. С патофизиологических позиций БА рассматривается как хроническое аллергическое воспалительное заболевание дыхательных путей, которое сопровождается синдромом бронхиальной обструкции. К развитию БА предрасполагает атопия — генетически детерминированная повышенная продукция иммуноглобулинов класса E (IgE) тучными клетками в ответ на контакт с аллергенами. Наряду с этими клетками в патогенезе БА участвуют многие другие виды клеток, образующие такие бронхоконстрикторные медиаторы и нейротрансмиттеры как: гистамин, лейкотриены (LTD₄), простагландины (PGD₂), тромбоксан, брадикинин, эндотелины, фактор активации тромбоцитов, ацетилхолин, и др. В последнее время особое внимание уделяется Сфингозину-1-фосфату (S1P) — высокоактивному метаболиту сфинголипидного комплекса, который может связываться с специфическими белками на поверхности многих клеток, вовлеченных в процессы аллергического воспаления при БА. Это

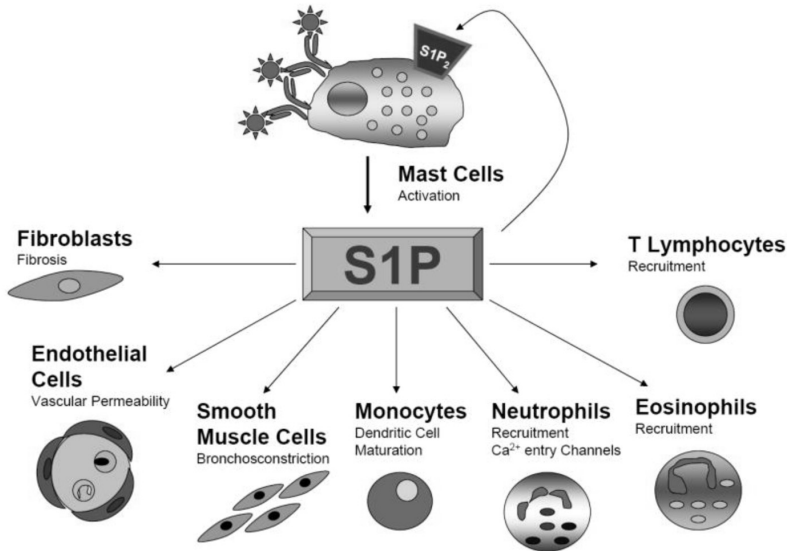


Рис.1. Участие Сфингозин-1-фосфата (S1P) в воспалительных реакциях при бронхиальной астме по Oskeritzian CA и др., 2007

вещество вырабатывается под действием специфических ферментов (сфингозинкиназы) в тучных клетках и может оказывать влияние на все виды клеток воспаления (рис. 1). В эксперименте было показано, что нейтрализующие S1P моноклональные антитела могут предотвращать развитие бронхоспазма. В связи с этим рассматривается терапевтическая стратегия, связанная с созданием ЛС, влияющих как на выработку S1P, так и на внедрение в клиническую практику моноклональных антител и специфических антагонистов к S1P рецепторам.

Синдром бронхиальной обструкции при БА может быть двух видов:

- **Острый**, связанный с бронхоконстрикцией и отеком слизистой оболочки бронхов.
- **Хронический**, обусловленный гиперпродукцией вязкого бронхиального секрета и ремоделированием бронхов (рис. 2).

Основой клинической картины БА являются приступы бронхоспазма, возникающие на фоне генетической предрасположенности к гиперреактивности бронхов. В развитии синдрома бронхиальной обструкции при БА важную роль играет окружающая среда (аэроаллергены и аллергены жилых помещений; табакокурение; вирусные, грибковые и бактериальные заболевания дыхательных путей; профессиональные вредности; поллютанты) и различные специфические (антигены) и неспецифические (химические раздражители, холодный воздух, физические нагрузки, эмоциональные стрессы) стимулы (триггеры) (рис. 3).

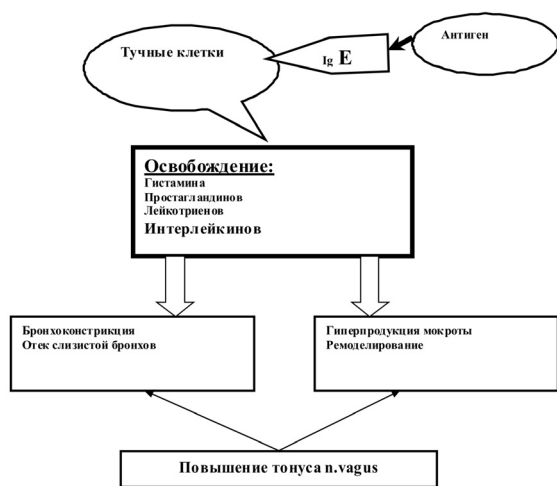


Рис. 2. Формирование синдрома бронхиальной обструкции при БА

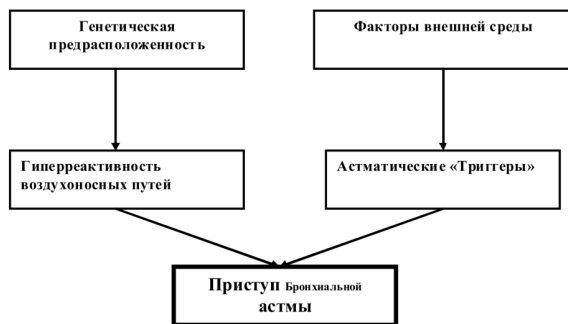


Рис. 3. Факторы, приводящие к развитию приступов бронхиальной астмы

Хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) является серьезной проблемой для здравоохранения из-за широкой распространенности, прогрессирующего течения, сокращения продолжительности жизни больных. Смертность от этой болезни среди лиц старше 45 лет занимает 4–5-е место в общей структуре, что подтверждает лидирующую роль болезни органов дыхательной системы в формировании высокого социального бремени и высокой смертности. По современным представлениям ХОБЛ — это хроническое воспалительное заболевание, с преимущественным поражением дистальных отделов дыхательных путей и паренхимы легких, характеризующееся нарушением вентиляционной функции по обструктивному типу, частично обратимым под воздействием современных методов лечения. Для ХОБЛ характерно частично необратимое ограничение скорости воздушного потока. Снижение вентиляционной функции связано (вне зависимости от степени тяжести заболевания) с воспалительным процессом преимущественно бронхов мелкого калибра и деструкцией легочной паренхимы. Ведущая патофизиологическая чер-

та ХОБЛ — ограничение воздушного потока по экспираторному типу (по данным спирометрии), и нарушения вентиляционной функции легких при адекватной современной терапии частично обратимы.

Развитие ХОБЛ может быть наследственно детерминированным при врожденном дефиците α_1 -антитрипсина, но чаще оно обусловлено активным или пассивным курением, загрязнением воздушной среды, длительным воздействием профессиональных факторов (пыль, пары, химические раздражители, горячий сухой воздух), неблагоприятной атмосферой жилища (кухонный чад, бытовая химия), рецидивирующими вирусно-бактериальными заболеваниями органов дыхания в детском возрасте, дефицитом массы тела при рождении. Заболевания легких:

- ХОБЛ;
- хронический обструктивный бронхит;
- эмфизема легких.

Патогенетическую основу ХОБЛ формирует хронический воспалительный процесс трахеобронхиального дерева, легочной паренхимы и сосудов, при котором выявляются повышенные количества макрофагов, Т-лимфоцитов и нейтрофилов. Воспалительные клетки выделяют большое количество медиаторов: LT B₄, ИЛ-8, фактор некроза опухоли и другие, способные повреждать структуру легких и поддерживать нейтрофильное воспаление. Кроме этого, в патогенезе ХОБЛ имеют значение дисбаланс протеолитических ферментов и антипротеиназ и оксидативный стресс. Морфологически в трахеобронхиальном дереве воспалительные клетки инфильтрируют поверхностный эпителий. Расширяются слизистые железы и увеличивается число бокаловидных клеток, что ведет к гиперсекреции слизи. В мелких бронхах и бронхиолах воспалительный процесс происходит циклично со структурным ремоделированием бронхиальной стенки, характеризующимся повышением содержания коллагена и образованием рубцовой ткани, приводящей к стойкой обструкции дыхательных путей.

За прошедшие 20 лет появилось большое множество сообщений о разработке новых экспериментальных моделей для изучения БА и ХОБЛ [26]. Однако чисто механический перенос результатов этих исследований на человеческую популяцию представляется не совсем корректным, так как фенотипические особенности воспалительного процесса у человека сильно варьируют. В нашей стране большая работа по доклиническому изучению лекарственных веществ для лечения бронхиальной астмы была проведена профессором, доктором медицинских наук В. Л. Ковалевой, которая долгое время возглавляла лабораторию фармакологии исполнительных органов Всероссийского научного центра по изучению биологически активных веществ. При ее непосредственном участии проводился углубленный поиск, изучение и создание ЛС для лечения бронхолегочной патологии, таких как хорошо известный в клинической практике препарат «Рузам». Профессором В.Л. Ковалевой были разработаны методические рекомендации по доклиническому изучению противоастматических средств (2005).

Таким образом основным принципом фармакотерапевтического подхода к лечению БА и ХОБЛ является: быстрое купирование спазма бронхов, обеспечение нормализации тонуса бронхов и надежный контроль аллергического воспаления дыхательных путей. Это достигается за счет использования основных двух групп препаратов: бронхолитиков и препаратов противовоспалительной направленности действия. Термин «противовоспалительные средства» в отчете экспертов Национального института Сердце, Легкие и Кровь (США) «Рекомендации по диагностике и лечению астмы», (EPR-2), заменен на «средства длительного контроля, использующиеся для достижения и поддержания контроля над персистирующей астмой». К бронхолитическим средствам относятся:

- адреностимуляторы (в т.ч. короткодействующие β_2 -агонисты как «средства быстрой помощи для купирования острых симптомов и обострений»);
- м-холиноблокаторы;
- препараты теофиллина.

Противовоспалительные средства (длительного контроля) представлены:

- глюкокортикостероидами;
- стабилизаторами мембран тучных клеток;
- антилейкотриеновыми средствами.

Антагонисты H_1 -гистаминовых рецепторов в терапии БА и ХОБЛ не используются в силу наличия у них холиноблокирующей активности, приводящей к сухости слизистых оболочек дыхательных путей, что само по себе является раздражающим фактором. Кроме того, гистамин — лишь один из медиаторов аллергического воспаления и его роль в патогенезе бронхиальной астмы второстепенна. Однако в экспериментальной фармакологии модель бронхоспазма, вызванного гистамином, является классической, что лишний раз подтверждает постулат о том, что результаты, полученные на животных, нельзя автоматически переносить на человеческую популяцию.

1. Первичное изучение бронхолитической активности веществ на экспериментальных моделях *in vitro*

Для первичного отбора (скрининга) новых веществ, обладающих бронхорасширяющей активностью, необходимы простые, доступные и недорогие экспериментальные модели, позволяющие быстро получить результаты исследования нового химического соединения. К числу таких относятся модели контрактуры гладких мышц изолированных органов морской свинки, в первую очередь, трахеи и главных бронхов; в некоторых случаях — повздошной кишки и матки. В качестве классических бронхоконстрикторных агентов применяют гистамин и ацетилхолин (или карбахолин). Необходимо учитывать, что для скрининга и изучения веществ с предполагаемым бета 2-адреномиметическим действием лучше использовать трахею, главные бронхи или матку морской свинки (в которых превалируют бета-рецепторы 2-го типа), а бронхолитическую активность веществ с неизвестным механизмом действия можно исследовать на любой из указанных моделей, но желательно начинать с контрактуры изолированной трахеи.

1.1. Приготовление изолированного гладкомышечного препарата трахеи

В эксперименте используют морских свинок — самок и самцов — массой 500–600 г.

У наркотизированной морской свинки осторожно извлекают трахею и разрезают на кольца по 2 хряща в каждом. Полученные кольца (по 5 колец) соединяют в цепочку и разрезают хрящи. Подготовленную цепочку (изолированный препарат трахеи) помещают в термостатируемую камеру (37 °С), соединенную с датчиком и содержащую раствор Кребса-Хенслийта (119 мМ NaCl, 4,8 мМ KCl, 1,2 мМ MgCl₂, 1,2 мМ CaCl₂, 2,53 мМ NaHCO₃, 24,8 глюкозы, pH=7,4). В качестве датчика, преобразующего механический сигнал в электрический, может быть использован отечественный прибор Механотрон 6М×2Б или другой датчик.

Исследование релаксирующей способности изучаемых веществ проводят либо в изотоническом либо в изометрическом режиме. В зависимости от этого исходная нагрузка на препарат должна составлять 0,5–0,7 г при работе гладкомышечного органа в изотоническом режиме и 1,5–2 г при работе в изометрическом режиме.

Сокращение трахеи регистрируют с помощью самописца. Релаксацию гладкомышечного препарата трахеи выражают в процентах от максимальной амплитуды сокращения, вызываемого добавлением в инкубационную среду медиатора. Определяют среднюю величину от измерений 4–5 отрезков. Строят концентрацию–доза–эффект. Среднеэффективную концентрацию ($ЭК_{50}$) определяют графически по методу Литчфилда и Уилкоксона.

1.2. Модель гистамин- и ацетилхолин-индуцированной контрактуры гладких мышц изолированной трахеи морской свинки

Сокращение гладкомышечного препарата изолированной трахеи, приготовленного описанным выше способом, вызывают добавлением в инкубационную среду гистамина

(Sigma) или ацетилхолина (Sigma) в концентрации 10^{-5} – 10^{-6} М. Через 30–60 с после введения спазмогена регистрируют максимальную амплитуду сокращения трахеи. Исследуемое соединение вносят на высоте контрактуры в тот момент, когда амплитуда сокращения достигает плато. Вещества добавляют в ванночку кумулятивно в концентрации от 10^{-12} М до 10^{-4} М после добавления медиатора на высоте амплитуды сокращения или однократно предварительно (в том же диапазоне концентраций) за 3 мин до инициации контрактуры.

Для оценки бронхорасширяющей активности исследуемого вещества в качестве препаратов сравнения удобно использовать традиционные бронхолитики — сальбутамол, теofilлин с тем, чтобы сопоставить их среднеэффективные концентрации (IC_{50}).

1.3. Модель анафилактической контрактуры гладких мышц изолированной трахеи активно сенсибилизированной морской свинки (реакция Шульца-Дейла) [28]

Морскую свинку активно сенсибилизируют внутрибрюшинным или внутримышечным введением 0,5 мл физ.р-ра, содержащего овальбумин (Sigma, grade III) (антиген) в дозе 20 мкг и 100 мг $Al(OH)_3$ (адъювант) на свинку. Показано, что при таком способе сенсибилизации (антиген в маленькой дозе + адъювант в большой дозе) у животного через 3–4 недели образуются гомоцитотропные антитела, принадлежащие к классу IgE [16].

Эксперимент начинают через 4–5 недель после сенсибилизации. Выделение трахеи и приготовление из нее препарата осуществляют по описанному выше способу. Сокращение препарата трахеи вызывают добавлением в культуральную среду овальбумина в концентрации 1–10 мкг/мл. Исследуемое соединение вносят в ванночку в концентрации 10^{-12} – 10^{-5} М в кумулятивном режиме. Предварительно вызывают сократительный ответ гладкомышечного препарата трахеи на воздействие гистамина (10^{-5} М). Амплитуда сокращения, вызванного ОА, должна составлять не менее 80% от амплитуды сокращения, вызываемого гистамином. Определение эффекта изучаемого соединения производится описанным выше способом. В том случае, если испытуемое соединение плохо растворяется в воде, его растворяют в ДМСО. Наш опыт работы показал, что 10–20% концентрация ДМСО не оказывает расслабляющего влияния на гладкую мускулатуру.

Однако необходимо учитывать склонность сенсибилизированной гладкой мышцы к спонтанному расслаблению. В силу этого обстоятельства необходимы строгие контроли и неоднократные повторения эксперимента с одними и теми же концентрациями изучаемого вещества.

В качестве препарата сравнения удобно использовать кромогликат натрия (интал), недокромил натрия или другие антиаллергические препараты.

1.4. Модель анафилактической контрактуры гладких мышц изолированного препарата ileum морской свинки [21]

В некоторых случаях, когда необходимо испытать одновременно несколько веществ, можно использовать в качестве гладкомышечного препарата отрезок тонкого кишечника морской свинки. Преимущество работы с изолированными отрезками тонкой кишки состоит в том, что таких отрезков от одной и той же морской свинки можно получить в большом количестве — до 7–15. Недостатком же является вероятность значительных межиндивидуальных различий по степени сенсибилизированности антигеном.

Методика активной сенсибилизации овальбумином (ОА) морской свинки описана выше. У животного после эвтаназии немедленно извлекают из брюшной полости тонкую кишку, выделяют участок *ileum*, ближайший к илеоцекальному углу. Участок разрезают на сегменты длиной 10 мм. Отдельный сегмент кишки прошивают с обеих сторон и помещают в термостатируемую ванночку при 37 °С, содержащую раствор Кребса-Хенслията. Сегмент прикрепляют к тонкому крючку, соединенному с датчиком, и уравнивают его в течение 60 мин с помощью базальной нагрузки, равной 0,5–0,7 г (в изотоническом режиме).

Прежде всего, оценивают ответ данного сегмента кишки (его реактивность) на гистамин, который вносят в ванночку в концентрации 10^{-5} – 10^{-7} М. После удаления гистамина, отмывания его раствором Кребса и возвращения мышцы к исходному состоянию последующее сокращение сегмента кишки вызывают овальбумином в концентрации 1–10 мкг/мл. В каждом эксперименте сократительный ответ мышцы отдельного сегмента на ОА сравнивают с тем сокращением, которое было вызвано гистамином в соответствующей концентрации. Степень выраженности ответа данного сегмента на ОА выражают в % от сократительного эффекта гистамина. Уровень сенсibilизации считается достаточным, если ответ сегмента на ОА составляет не менее 80% от ответной реакции на гистамин.

Испытуемые вещества в диапазоне концентраций 10^{-12} – 10^{-4} М вносят в ванночку либо за 3 мин до ОА-индукции либо на высоте контрактуры сегмента кишки (кумулятивно).

Эффект воздействия вещества оценивают как торможение анафилактического сокращения препарата кишки, выраженное в % от амплитуды сокращения контрольного препарата (инкубация только с растворителем). Каждый сегмент может прореагировать с ОА только один раз, поэтому при инкубации сегмента с веществом следует начинать с самой низкой его концентрации, постепенно повышая до 10^{-4} М. Среднеэффективная концентрация ЭК₅₀ высчитывается графически по Литчфилду–Уилкоксону.

1.5. Модель спонтанного тонуса гладких мышц изолированной трахеи морской свинки [37]

В тех случаях, когда нужно выявить прямое действие вещества на тонус гладкой мышцы, используют модель спонтанного тонуса трахеи.

Препарат трахеи готовят, как описано выше. Релаксацию спонтанного тонуса гладкой мускулатуры трахеи вызывают добавлением в среду культивирования изопrenalина (1,0 мкМ). После отмывания на препарат дают базальную нагрузку, равную 0,5 г. При этом спонтанный тонус восстанавливается до постоянной величины.

Исследуемое соединение вносят в среду культивирования (раствор Кребса-Хенсляйта) в концентрации 10^{-9} – 10^{-4} М кумулятивно. Релаксацию, вызванную изопrenalином, принимают за 100%. Определяют бронхорасслабляющий эффект изучаемого вещества, сравнивая его с эффектом релаксации, вызванным изопrenalином.

2. Углубленное изучение бронхолитической активности химических соединений на экспериментальных моделях *in vitro* и *in vivo*

2.1. Модели *in vitro*

При углубленном изучении веществ также необходимо использовать модели контрактуры гладкомышечных органов *in vitro*, которые описаны в разделе 1, но при этом спектр медиаторов контрактуры значительно расширяется. В зависимости от задач эксперимента применяют в качестве бронхоконстриктора аденозин, лейкотриены C₄ и D₄ простагландины, PAF. Возможна стимуляция электрическим током. В этом случае применяют платиновые электроды величиной в 1 см², которые размещают вдоль гладкомышечного препарата на расстоянии 10 мм от него для трансмуральной стимуляции электрическим током силой 320 мА в течение 10 с.

2.2. Модели *in vivo*

Оценка бронхолитического действия вещества, полученная *in vitro*, — очень важный этап изучения бронхорасширяющего действия нового соединения, так как эти модели позволяют получить быстрый ответ и представление о диапазоне концентраций, однако без использования моделей бронхоспазма *in vivo* нельзя сделать окончательный вывод о бронхорасширяющей активности изучаемого вещества. Для выявления указанной активности используют 2 традиционные модели бронхоспазма, индуцированного либо гистамином либо ацетилхолином (карбохолином, метахолином):

А. Модель бронхоспазма у наркотизированной морской свинки с оценкой параметров внешнего дыхания.

Эта модель позволяет исследовать параметры внешнего дыхания животного и количественно их оценить с помощью трансдуцера бронхоспазма и самописца.

Б. Модель бронхоспазма у ненаркотизированной морской свинки с аэрозольным воздействием бронхоконстриктора.

2.2.1. Модель гистамин и ацетилхолин-индуцированного бронхоспазма [29]

В эксперименте используют морских свинок (самцов и самок) массой 350–400 г.

У наркотизированной морской свинки (этаминал натрий 70 мг/кг, в/брюшинно) выделяют трахею, вставляют в нее канюлю, которую подсоединяют с помощью системы полихлорвиниловых трубочек к датчику бронхоспазма и аппарату искусственного дыхания (Ugo Basile). В течение эксперимента поддерживается определенный режим дыхания: V дыхания — 6–8 мл, частота — 70 в мин. Гистамин (Histamine hydrochloride) 5–10 мкг/кг или ацетилхолин (Acetylcholine 40 мкг/кг) вводят внутривенно (V. jugularis) с 15-минутным интервалом.

После трех одинаковых ответов на бронхоконстриктор вводят исследуемое соединение и мониторируют ответ в течение 60–120 мин.

Исследуемое соединение вводят разными способами:

— внутривенно (в надключичную или бедренную вену) за 2 мин до индукции бронхоспазма;

— внутрижелудочно (с помощью зонда) однократно за 1–2 ч или многократно за 72, 48, 24 и 1 ч до введения бронхоконстриктора;

— ингаляционно с помощью дозирующего устройства для ингаляции либо растворов либо сухих порошков за 30 мин до индукции бронхоспазма.

С помощью самописца, подсоединенного к датчику, регистрируют изменение сопротивления дыхательных путей воздушному потоку, то есть величину бронхоконстрикторной реакции. При введении медиатора (гистамина, ацетилхолина) сопротивление дыхательных путей резко возрастает. Эта степень увеличения сопротивления бронхов эквивалентна величине бронхоспазма, индуцированного тем или иным констриктором.

Эффект исследуемого соединения оценивают по степени торможения бронхоспазма, выраженной в процентах по отношению к максимальному. Максимальный бронхоспазм вызывают полным пережатием трубочки, соединенной с трахеальной канюлей, и принимают его за 100%.

Сравнивают действие изучаемого соединения с нелеченым контролем и с эффектом референтного препарата. В качестве последнего лучше всего использовать сальбутамол, как высокоэффективный бронходилататор, эффект которого хорошо исследован на этой модели при всех способах введения.

Другим традиционным препаратом сравнения является теофиллин; его также можно использовать при внутривенном (2–20 мг/кг), внутрижелудочном и интрадуоденальном способах введения.

Если испытуемое соединение плохо растворимо в воде и его необходимо ввести парентерально, его растворяют в 10% растворе ДМСО. В некоторых случаях вещество вводят в виде суспензии интрадуоденально в 0,5% р-ре карбоксиметилцеллюлозы или Твине-80.

2.2.2. Модель бронхоспазма у ненаркотизированной морской свинки с аэрозольным воздействием бронхоконстриктора

У морских свинок индуцируют бронхоспазм аэрозольным воздействием гистамина (1% р-р) или ацетилхолина (0,5% р-р) с помощью ультразвукового или компрессорного небулайзера. Морскую свинку помещают в камеру, имеющую определенный объем, к

которой подсоединяют небулайзер. Время экспозиции 20 с. Реакция на бронхостриктор оценивается по симптомам: чиханию, кашлю, одышке. Самое тяжелое проявление реакции — коллапс (животное падает на бок) и гибель от удушья. Оценивают латентный период (в минутах) между воздействием бронхоконстриктора и первыми признаками бронхоспастической реакции и сравнивают с контрольной группой (без лечения). Пути введения веществ и препараты сравнения те же, что и в 2.1.

3. Контроль аллергического воспаления в легких

3.1. Модель аллергического воспаления и гиперреактивности дыхательных путей [25]

В экспериментах используют морских свинок обоего пола массой 300–400 г. Схема иммунизации морских свинок: вначале животных иммунизируют внутрибрюшинным введением овальбумина в дозе 10 мг/кг с 7-дневным интервалом (дважды), затем свинкам ингалируют с помощью небулайзерной техники (Pari) р-р овальбумина в возрастающей концентрации, начиная с 0,1%, затем 0,2%, 0,5% и так увеличивая до 1% с интервалом в 4 дня между ингаляциями на протяжении 1,5 месяцев. Через 24 ч после разрешающей дозы ОА (1% раствор) изменения в дыхательных путях оценивают с помощью комплекса методов: гистологических, морфометрических и цитологических. Гиперреактивность дыхательных путей оценивают по метахолиновому или гистаминовому тесту.

Цитологические методы

Забор бронхоальвеолярного смыва проводят под внутрибрюшинным гексеналовым наркозом, путем двукратного промывания легких через трахею 10 мл подогретого до 37 °С физиологического раствора. Жизнеспособность клеток определяют в тесте с трипановым синим. В жидкости бронхоальвеолярного смыва, после центрифугирования при 200 g в течение 10 мин, определяют абсолютное количество клеточных элементов в 1 мл смыва (цитоз). В мазках, окрашенных по Романовскому–Гимзе, подсчитывают эндопульмональную цитогамму.

Морфометрические методы

Морфометрическое исследование лимфоидной ткани, ассоциированной с бронхами, проводят в макропрепаратах. Легкие с трахеей удаляют из грудной полости. Макропрепарат погружают в 2% водный раствор уксусной кислоты и помещают в холодильник (8–12 °С). Через 18–24 ч под лупой проводят морфометрическую оценку лимфоидной ткани, ассоциированной с бронхами. Легкие укладывают в чашку Петри, залитую парафином. Главные и долевые бронхи рассекают ножницами с тупыми концами. В макропрепарате легких лимфоидные фолликулы имеют вид белесоватых бляшек (диаметром 3–5 мм), выступающих над поверхностью слизистой оболочки бронхов. Объемную плотность лимфоидных фолликулов оценивают под лупой с помощью сетки Г.Г. Автандилова.

Гистологические методы

Легкие фиксируют в жидкости Карнуа, заливают в парафин и изготавливают гистологические срезы толщиной 4–5 мкм. Готовят 2 серии гистологических препаратов. В 1 серии гистологические препараты окрашивают гематоксилином и эозином. В гистологических срезах подсчитывают количество эозинофилов и нейтрофилов. Во второй серии препараты окрашивают толуидиновым синим Ph=2,0. В гистологических срезах подсчитывают количество тучных клеток, в том и другом случае клетки считают в поле зрения при увеличении 400.

Степень дегрануляции тучных клеток можно оценивать полуколичественным способом:

- + — вся цитоплазма заполнена темно-фиолетовыми гранулами;
- ++ — отмечаются отдельные участки просветления в цитоплазме клеток;
- +++ — участки просветления цитоплазмы занимают от 50 до 70% цитоплазмы;
- ++++ — гранулолизис.

Вычисляют индекс дегрануляции.

Статистическую обработку полученных результатов проводят с использованием методов вариационной статистики: вычисляют средние арифметические величины, ошибку средней арифметической, среднеквадратическое отклонение. Достоверность различий между показателями средних вычислений определяют по критериям Стьюдента.

Исследуемые вещества вводят либо внутривнутрибрюшинно, либо перорально либо ингаляционно (в этом случае лучше использовать небулайзерную технику) в профилактическом, лечебно-профилактическом или лечебном режиме. Наш собственный опыт показал, что для выявления антиаллергических свойств вещество лучше всего ингалировать морским свинкам ежедневно 1 раз в сутки в одно и то же время в течение 6 последних (с учетом периода иммунизации) суток. Время ингаляции — 180 с.

Наличие аллергического воспаления в легких морских свинок, а также антиаллергический эффект фармакологических препаратов оценивают по клеточному составу бронхоальвеолярного смыва (БАС) и выраженности гиперплазии бронхоассоциированной лимфоидной ткани. Во второй части эксперимента действие препаратов оценивают по гистологическим и морфометрическим критериям.

3.2. Модель аллергического ринита

В экспериментах используют морских свинок обоего пола массой 300–400 г. Схема иммунизации морских свинок та же, что и в разделе 3.1: вначале животных иммунизируют внутривнутрибрюшинным введением овальбумина в дозе 10 мг/кг с 7-дневным интервалом (дважды), затем свинкам ингалируют с помощью небулайзерной техники (Pari) р-ор овальбумина в возрастающей концентрации, начиная с 0,1%, затем 0,2%, 0,5% и так увеличивая до 1% с интервалом в 4 дня между ингаляциями на протяжении 1,5 месяцев. Разрешающую дозу ОА (1% раствор) дают с помощью микропипетки в носовые ходы (по 50 мкл). Через 24 ч животному, находящемуся под наркозом (тиопентал натрия 60–70 мг/кг), в трахею вставляют канюлю, через которую перфузируют 10 мл физиологического раствора (37 °С) со скоростью 2,5 мл/мин. Собирают перфузат. После центрифугирования при 200 g в течение 10 мин в 1 мл бронхоальвеолярного смыва подсчитывают с помощью камеры Фукса-Розенталя абсолютное количество клеточных элементов (цитоз). В мазках, окрашенных по Романовскому-Гимзе, подсчитывают эндодульмональную цитограмму.

3.3. Оценка влияния на анафилактические реакции

3.3.1. Модель антиген-индуцированного бронхоспазма у активно сенсибилизированных наркотизированных морских свинок

В эксперименте используют морских свинок массой 350–400 г.

Животных сенсибилизируют внутримышечным введением 0,5 мл раствора, содержащего овальбумин в дозе 20 мкг и гидроксид алюминия в количестве 100 мг на свинку по методу Andersson. Через 3–4 недели после начала сенсибилизации можно начинать эксперимент: к этому сроку образуются IgE — антитела в достаточно высоком титре и после введения разрешающей дозы антигена развивается сильная бронхоспастическая реакция.

У наркотизированной морской свинки (этамилал натрия 50 мг/кг, в/брюшинно) выделяют трахею, вставляют в нее канюлю, которую подсоединяют с помощью системы полихлорвиниловых трубочек к датчику бронхоспазма и аппарату искусственного дыхания (Ugo Basile). В течение эксперимента поддерживается определенный режим дыхания: V дыхания — 6–8 мл, частота — 70 в минуту. Разрешающая доза антигена 150–200 мкг/кг вводится в v. jugularis. Исследуемое соединение вводят разными способами:

1) внутривенно (с помощью канюли в надключичную или бедренную вену) за 3–5 мин до индукции бронхоспазма;

2) внутривнутрибрюшинно (с помощью зонда) однократно за 1–2 ч или многократно за 72, 48, 24 и 1 ч до внесения разрешающей дозы овальбумина;

3) ингаляционно с помощью дозирующего устройства для ингаляции растворов либо сухих порошков за 15–30 мин до индукции бронхоспазма.

С помощью самописца, подсоединенного к датчику, регистрируют изменение сопротивления дыхательных путей воздушному потоку, то есть величину бронхоконстрикторной реакции. При введении антигена сенсibilизированной морской свинке сопротивление дыхательных путей резко возрастает (как известно, у морской свинки легкое является шоковым органом). Эта степень увеличения сопротивления эквивалентна величине бронхоспазма, индуцированного антигеном. Эффект исследуемого соединения оценивают по степени торможения бронхоспазма, выраженной в процентах по отношению к максимальному.

Максимальный бронхоспазм вызывают полным пережатием трубочки, соединенной с трахеальной канюлей, и принимают его за 100%.

Сравнивают действие изучаемого вещества с препаратом сравнения (интал, тайлед, кетотифен, азеластин, антагонисты H1-рецепторов 2-го поколения, кортикостероидные препараты).

3.3.2. Модель антиген-индуцированного бронхоспазма

у ненаркотизированных морских свинок при аэрозольном воздействии веществ

Морских свинок массой 300 г активно сенсibilизируют способом, описанным выше. Через 3–4 недели после сенсibilизации анафилактическую реакцию у животных (в специальной камере из плексигласа) вызывают разрешающей дозой овальбумина, который вводят в виде аэрозоля (0,5% в 0,9% растворе NaCl) с помощью ультразвукового или компрессорного небулайзера. Длительность и скорость аэрозольного введения веществ зависит от типа небулайзера. Аналогично вводят изучаемые вещества. Эффект вещества оценивают по длительности латентного периода между началом ингаляции и первыми признаками анафилактической реакции (сокращение абдоминальных мышц), после чего животных удаляют из камеры. Важно отметить, что животные не погибают при правильном проведении манипуляций и могут быть использованы в дальнейшем, но точной оценки параметров внешнего дыхания при таком способе исследования получить нельзя. Поэтому обе модели дополняют друг друга.

3.3.3. Модель легочной анафилаксии (увеличение

сосудистой проницаемости дыхательных путей) у морских свинок [36]

Эксперименты выполняют на морских свинках массой 300–400 г. У наркотизированных животных осуществляют вентиляцию легких и тем или иным способом вводят испытуемые вещества. Через 10 мин после подсоединения трахеальной канюли к аппарату искусственного дыхания в *v. jugularis* вводят испытуемое вещество и еще через 10 мин Evans blue в дозе 20 мг/кг и через 1 мин РАФ в дозе 50 нг/кг. Через 5 мин эксперимент заканчивают. После эвтаназии животного выделяют легкие, из которых экстрагируют краситель Evans blue с помощью инкубации ткани в формамиде (2 мл) при 37 °С в течение 16 ч, измеряют его содержание спектрофотометрически при длине волны 620 нм и выражают в нанogramмах на мг сухой ткани.

Второй вариант этой модели предусматривает использование иммунизированных морских свинок. Метод иммунизации описан в 3.1.1. В этом варианте исследования практически одновременно вместе с Evans blue вводят разрешающую дозу антигена (25 мг/мл). Введение изучаемых веществ возможно разными способами.

3.3.5. Модель пассивной кожной анафилаксии у крыс [23]

При необходимости исследования значительного количества веществ и выбора наиболее эффективных из них лучше всего использовать реакцию пассивной кожной анафилаксии у крыс, которая представляет классическую модель для отбора веществ, влияющих на IgE-зависимую анафилактическую реакцию.

Эксперименты выполняют на белых неинбредных крысах самцах массой 200–220 мг. Исследование включает 3 части:

1. Иммунизация 4–5 крыс. Животные дважды с интервалом в 1 месяц получают внутрибрюшинные инъекции овальбумина 100 мкг и 1 мг гидроксида алюминия в объеме 0,5 мл.

2. Тест на уровень сенсибилизации крыс.

Из подъязычной вены иммунизированных крыс забирают кровь, получают сыворотку, в которой определяют титр гомоцитотропных антител IgE следующим образом: из исследуемой сыворотки готовят серию двукратных разведений в изотоническом р-ре NaCl и пробы вводят по 0,1 мл в область спины внутрикожно. Титры сыворотки 1:64 и 1:128 — достаточны для проведения ПКА, если площадь окрашенного пятна составляет не менее 10 мм².

3. Реакция пассивной кожной анафилаксии.

Сыворотку в объеме 0,1 мл вводят внутрикожно в 2 различных места выбритого участка спины (лопаточная область) крысы. Через 48 ч животным вводят разрешающую дозу антигена вместе с синькой Эванса (Evans blue) в хвостовую вену в объеме раствора (5 мл/кг), содержащего 25 мг/кг ОА и 25 мг/кг красителя Evans blue. Животных анестезируют эфиром и подвергают эвтаназии через 30 мин после введения антигена, вырезают кусок кожи с синим пятном на внутренней стороне кожи в месте инъекции сыворотки.

Выраженность анафилактической реакции определяют по площади пятна. Эффект вещества оценивают по размерам площади пятна в сравнении с контрольными животными, не получавшими лечение, и выражают в % от контрольных цифр.

3.4. Оценка влияния на реакции гиперчувствительности замедленного типа

3.4.1. Модель гиперчувствительности замедленного типа к эритроцитам барана у мышей (феномен Артюса) [31]

Мышей линии BALB/c или (CBAxС57BL)F1 самцов массой 30 г сенсибилизируют введением 2×10^7 суспензии эритроцитов барана в 0,2 мл фосфатного буфера подкожно. Через 4 суток разрешающую дозу эритроцитов барана (1×10^8) в 0,04 мл вводят субплантарно в правую лапу. Исследуемое вещество вводят за 24 и 1 ч внутривенно до разрешающей дозы антигена. Через 24 ч измеряют объемы правой и левой лап с помощью плетизмометра (Ugo Basile) или микрометра.

Терапевтический эффект оценивают по разнице объемов лап с воспалительным отеком у леченых и нелеченых животных. Торможение реакции (%) вычисляют по формуле (1):

$$100 - \left[\frac{П - Л}{Л(\text{Исследование})} : \frac{П - Л}{Л(\text{Контроль})} \times 100 \right] (\%), \quad (1)$$

где П — объем правой лапы; Исследование — леченые животные; Л — объем левой лапы
Контроль — нелеченые животные

3.4.2. Модель контактной гиперчувствительности замедленного типа к 2, 4, 6-тринитрохлорбензолу (ТНХБ) у мышей [38]

Мышей C57BL (или гибридов CBAxС57BL) самцов сенсибилизируют нанесением на выбритый участок живота 0,1 мл 3% раствора ТНХБ в ацетоне. Через 7 сут разрешающую дозу ТНХБ (0,025 мл, 3% раствор) наносят на обе поверхности правого уха. Через 30 мин наносят на эти же поверхности мазь в объеме 0,05 мл. Через 24 ч после индукции отека мышей подвергают эвтаназии, уши отрезают и взвешивают. Аллергическая реакция выражается в увеличении объема (за счет отека) правого уха относительно интактного левого.

Противоаллергический эффект исследуемого соединения оценивают, высчитывая разницу веса правого и левого уха, выраженной в процентах, у леченых и нелеченых животных по формуле 1.

4. Изучение противовоспалительной активности фармакологических веществ на моделях воспаления *in vivo*

4.1. Модель бронхоальвеолита у крыс [8]

Традиционные модели острого воспаления (карагениновый отек лапы крыс и мышей) хотя и можно использовать для оценки противовоспалительной активности антиагматического вещества, но лишь на этапе первичного изучения вещества. Для более развернутого представления о механизмах противовоспалительного влияния химического соединения на воспаление с аллергическим компонентом, локализованный именно в ткани легкого, необходимо применить специальную модель, адекватно и динамически отражающая многие стороны аллергического воспаления при БА. Таким требованиям отвечает разработанная нами модель бронхоальвеолита.

Для постановки этой модели можно использовать крыс-самцов популяции Вистар (масса тела 200–240 г), которая склонна к развитию воспалительных реакций со стороны легочной ткани [8].

4.1.1. Методика ингаляционного введения сефадекса А-25

В качестве ирританта использован Сефадекс А-25.

Сефадекс А-25 Fine ДЕАЕ [2-(диэтиламиноэтил) сефадекс] — высокомолекулярный полимер глюкозы, производное декстрана — гидрофильный порошок с размерами частиц от 20 до 80 мкм. Сефадекс А-25 не является антигеном, но также, как и другие полимеры ряда декстрана, обладает неспецифическим адьювантным действием. При попадании в дыхательные пути сефадекс А-25 увлажняясь, образует гель. Высокомолекулярные полимеры, к которым относится сефадекс А-25, способны вызывать в легких развитие воспалительных реакций с образованием гранулем. Важным качеством сефадекса является высокая летучесть, способствующая хорошему распылению порошка.

Введение сефадекса А-25 осуществляется с помощью дозирующего ингаляционного устройства для введения сухих порошков лабораторным животным (разработан в НИИ медицинского приборостроения Казначеевым В.А. и Лохмачевым А.В.).

Введение сефадекса в дозе 5 мг/кг крысам проводят под легким эфирным наркозом. Для того чтобы вводимый порошок попал в трахею и бронхи, тубус ингалятора вводят в ротовую полость животного. Для этого с помощью лигатуры фиксируют верхнюю челюсть за резцы и одновременно оттягивают лигатурой нижнюю челюсть вместе с языком. В момент запыления крылья носа животного прижимают к перегородке двумя пальцами руки.

После запыления животные быстро выходят из наркоза, во внешнем виде, поведении и характере дыхания каких-либо особенностей не наблюдается, но у отдельных животных может быть проходящая одышка.

Развитие воспалительного процесса в легких крыс исследуется в зависимости от задач эксперимента в динамике на 7, 14, 21 и 80-е сутки после аэрозольного воздействия сефадекса А-25. Воздействие исследуемого вещества производят по нескольким критериям. В их число входят:

- гистологическое исследование легких;
- морфометрическая характеристика легочной ткани крыс;
- цитологическое исследование бронхоальвеолярного смыва (определение цитоза и эндодульмональная цитограмма);
- морфометрическое исследование бронхоассоциированной лимфоидной ткани;
- характеристика клеточной инфильтрации межальвеолярных перегородок.

4.1.2. Морфологическая характеристика легких крыс Вистар в различные сроки после аэрозольного воздействия сефадекса А-25

Контрольная группа. В легких крыс контрольной группы межальвеолярные перегородки тонкие, легочная паренхима равномерно воздушная. Эпителий бронхов без дис-

трофических изменений. Просветы бронхов и альвеол свободны от содержимого, в просветах альвеол единичные альвеолярные макрофаги. Междольковая и перибронхиальная соединительная ткань рыхлая с небольшим количеством сосудов. В гистологических препаратах может быть обнаружена незначительная острая очаговая эмфизема, составляющая не более 3% от общей площади ступенчатых срезов легкого. Количество нейтрофилов в междольковых перегородках при морфометрическом исследовании легких не более 3. В эндопульмональной цитограмме бронхоальвеолярного смыва преобладают макрофаги; многоядерные макрофаги практически отсутствуют. Абсолютное количество клеток в 1 мл бронхоальвеолярного смыва составляет, по нашим данным — $0,12 \pm 0,05 \times 10^6$. В макропрепаратах легких контрольной группы крыс, фиксированных в 2% водном растворе уксусной кислоты, объемная плотность бронхоассоциированной лимфоидной ткани, оцениваемой по лимфоидным фолликулам в стенке бронхов, составляет, по нашим данным, $39,0 \pm 1,8$.

7-е сутки после ингаляции сефадекса.

При гистологическом исследовании в легких крыс выявляется картина острого бронхита, альвеолита и острой викарной эмфиземы. Стенки бронхов всех уровней диффузно инфильтрированы нейтрофилами; эпителий с дистрофическими изменениями, очагово десквамирован. В междольковых перегородках, как в зоне аэрогематического барьера, так и в «углах» междольковых перегородок отмечается отек, диффузная инфильтрация нейтрофилами. При морфометрическом исследовании количество нейтрофилов в ткани легких резко увеличено по сравнению с интактными животными. Выявляются зрелые макрофагальные гранулемы, локализованные в периваскулярной, перибронхиальной соединительной ткани, «углах» междольковых перегородок. Клеточные элементы гранулем представлены главным образом одноядерными макрофагами, единичными многоядерными макрофагами, нейтрофилами и лимфоцитами. Количество клеток в гранулеме составляет 20–150 клеток.

При морфометрическом исследовании легких объемная плотность альвеолита составляет в среднем $17,7 \pm 2,9\%$, а эмфиземы $15,4 \pm 3,4\%$. Морфометрическое исследование бронхоассоциированной лимфоидной ткани на 7-е сутки после аэрозольного воздействия сефадекса А-25 выявляет максимальное увеличение объемной плотности лимфоидных фолликулов. Бронхоальвеолярный смыв характеризуется нарастанием показателя цитоза. В эндопульмональной цитограмме преобладают нейтрофилы и лимфоциты. Среди альвеолярных макрофагов большое количество многоядерных клеток, содержащих 2–5 гранул.

14-е сутки. На 14-е сутки после аэрозольного воздействия сефадекса А-25 в легких крыс Вистар выраженность и распространенность бронхита и альвеолита не нарастает, но увеличивается число гранул, содержащих гигантские клетки инородных тел. Большая часть клеток инфильтрата в стенке бронхов и междольковых перегородок представлена лимфоцитами и гистиоцитами, т.е. на 14–21 сутки нейтрофильный альвеолит сменяется лимфоидно-гистиоцитарным. Показатели объемной плотности альвеолита и эмфиземы не изменяются. Показатель цитоза бронхоальвеолярного смыва на 14-е сутки после аэрозольного воздействия сефадекса А-25 остается высоким.

Морфометрическое исследование бронхоассоциированной лимфоидной ткани крыс Вистар выявляет снижение объемной плотности лимфоидных фолликулов по сравнению с 7-ми и 1-ми сутками.

На 21-е сутки после аэрозольного воздействия сефадекса А-25 распространенность альвеолита и бронхита в легких крыс возрастает. Объемная плотность соединительной ткани в легких крыс этой группы по сравнению с контрольной группой, 7-ю и 14-ми сутками возрастает в 2 раза.

В бронхоальвеолярном смыве крыс на 21-е сутки эксперимента отмечен максимальный показатель содержания клеточных элементов: он в 4,2 раза превышает показатель в контроле.

На 80-е сутки при морфометрическом исследовании показатели объемной плотности альвеолита и соединительной ткани возрастают и максимально выражены на этот

срок. Однако распространенность эмфиземы, по характеру хронической обструктивной, по сравнению с предыдущими сроками не увеличивается. Сохраняется гиперплазия иммунного аппарата легких. Но исследование бронхоальвеолярного смыва крыс Вистар выявляет нормализацию цитологического состава.

Важно подчеркнуть, что воспалительный процесс в легких, по данным морфологического, морфометрического и цитологического исследования легких, оценки клеточного состава бронхоальвеолярного смыва, максимально выражен на 7-е сутки эксперимента. Именно этот срок наблюдения удобно использовать для тестирования противовоспалительных свойств новых веществ.

Итак, достоинством разработанной модели является ее простота и легкость воспроизведения. В качестве критериев оценки эффективности противовоспалительной эффективности ЛС рекомендуется использовать морфометрические показатели: объемную плотность альвеолита, эмфиземы, числа нейтрофилов в межальвеолярных перегородках; а также данные цитологического исследования бронхоальвеолярного смыва — показатели цитоза, содержания лимфоцитов и нейтрофилов. Кроме того, на разработанной модели можно оценивать влияние испытуемых веществ на иммунную систему по выраженности гиперплазии бронхоассоциированной лимфоидной ткани путем подсчета объемной плотности лимфоидных фолликулов в стенке бронхов.

Исследуемые вещества можно вводить, как показал наш опыт, различными путями: внутрибрюшинно, внутривентрикулярно и ингаляционно с помощью этого же ингаляционного дозирующего устройства. Мы использовали однократное и курсовое (ежедневно в течение 7 дней) введение лекарственных веществ, причем ингаляцию сефадекса и испытуемого вещества производили с коротким интервалом (не более 30–60 мин) между воздействиями. Эффект лечения оценивали, как уже было сказано выше, через 7 сут после индукции воспаления. Однако в зависимости от задачи эксперимента эффект противовоспалительного действия вещества может быть оценен и в значительно более отдаленные сроки — через 14, 21, 30, 60 дней и т.д.

В условиях этой модели препаратами сравнения могут быть нестероидные противовоспалительные препараты (напроксен, индометацин и др.), ингаляционные кортикостероиды (будесонид, флунизолид и др.). Количество животных в группе должно быть не менее 10.

4.2. Модель ПАФ (полный адьювант Фрейнда) — индуцированного отека лапы крысы

Данная модель позволяет быстро оценить способность испытуемого вещества влиять на экссудативную фазу воспаления. Полагают, что в случае индукции отека ПАФ основную роль играют продукты липоксигеназного пути метаболизма ненасыщенных жирных кислот.

В эксперименте используют крыс-самцов массой 200–300 г. Полный адьювант Фрейнда (ПАФ) вводится субплантарно по 0,1 мл в правую лапу. Исследуемое соединение вводят внутривентрикулярно (5–10 мг/кг в 0,5 мл 1% раствора крахмала за 24 и 2 ч до введения флогогенного агента). Объем лап измеряют через 24 ч после инициации процесса с помощью плетизмометра (Ugo Basile). Эффект терапевтического воздействия исследуемого соединения оценивают по степени угнетения воспалительной реакции и рассчитывают по формуле, указанной в разделе 3.2.1.

Заключение

Применение данных методических указаний при поиске и отборе новых фармакологических веществ, обладающих бронхолитической, антиастматической и антиаллергической активностью, позволяет при проведении доклинических исследований объективно оценить их специфическое фармакологическое действие с целью решения вопроса о целесообразности и возможности проведения КИ.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы / под ред. Чучалина. — М.: Атмосфера, 2007. — С. 104.
2. Бунятыян Н.Д., Утешев Д.Б., Ковалева В.Л., Саядян Х.С. Сравнительная оценка эффективности потенциальных бронхолитиков класса 2-аминотиазолов. Аптечный бизнес, 2009. — №1. — С. 30–32.
3. Глобальная стратегия лечения и профилактики бронхиальной астмы. Пересмотр 2002 г. / Пер. с англ. — М.: Атмосфера, 2002.
4. Гущин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. М.: Фармарус принт, 1998.
5. Дубынина В.П. Небулайзерная терапия острых и хронических заболеваний дыхательных путей. Методические рекомендации. — М.: ООО «Интер-Этон», 2004.
6. Клиническая фармакология по Гудману и Гилману / под общ. ред. А.Г. Гилмана. В четырех томах. Пер. с англ. — М.: Практика, 2006.
7. Ковалева В.Л., Небольсин В.Е., Утешев Д.Б., Карабиненко А.А., Желтухина Г.А. Исследование протективных свойств оригинального вещества псевдопептидной природы ингамина на моделях бронхоспазма. Экспериментальная и клиническая фармакология, 2005. — № 2, Т. 68. — С. 21–24.
8. Макарова О.В., Ковалева В.Л., Сладкопепцев А.С. и др. Экспериментальная модель неинфекционного гранулематоза легких. Пульмонология, 1996. — 1, 76–79.
9. Машковский М.Д. Лекарственные средства. 15-е изд., перераб., испр. и доп. — М.: ООО «Издательство Новая Волна», 2005.
10. Основы клинической фармакологии и рациональной фармакотерапии: Рук. для практикующих врачей / под общ. ред. Ю.Б. Белоусова, М.В. Леоновой. — М.: Бионика, 2002.
11. Утешев Д.Б., Ковалева В.Л. Холинолитики в лечении хронических обструктивных болезней легких. Аптечный бизнес, 2006. — № 1. — С. 28–30.
12. Утешев Д.Б., Ковалева В.Л., Прокофьев П.С., Сторожаков Г.И. Влияние противоастматических препаратов на пролиферацию мононуклеарных клеток человека *in vitro*. Экспериментальная и клиническая фармакология. — 1999. — Т. 62, № 2. — С. 32–37.
13. Утешев Д.Б., Кострюков Е.Б., Карабиненко А.А., Ковалева В.Л., Сторожаков Г.И. Антиастматическое действие β-каротина в эксперименте. Аллергия, астма и клиническая иммунология. — 1999. — № 2. — С. 1–9.
14. Федеральное руководство по использованию лекарственных средств (формулярная система). Выпуск VII. — М.: Эхо, 2006.
15. Фролов В.Г., Ковалева В.Л., Утешев Д.Б., Парфенов Э.А. Исследование противовоспалительной и антиастматической активности новых металлокомплексных производных N-ацетилцистеина и кумарина на моделях воспаления и бронхоспазма *in vitro*. Аллергология и иммунология, 2004. — Т. 5. — № 1. — С. 79–80.
16. Andersson P. Antigen-induced bronchial anaphylaxis in actively sensitized guinea-pigs. Allergy, 1980, 35, 63–71.
17. Barnes P.J., Chung K.F., Page C.P. Inflammatory Mediators and asthma. Pharmacol. Rev., 1988, v. 40, 49–84.
18. Blattner R., Classen H.G., Dehnert H. et al. Experiments on isolated smooth muscle preparation. Ed. J.M. Barnden a. R.Colson, 1980.
19. Cockroft D.W., O'Byrne P.M. Mechanisms of airway hyper-responsiveness, in: Bronchial Asthma. Mechanisms and Therapeutics, 3rd ed, Boston, 1993, ch4.
20. Corrigan C.J. Immunological aspects of asthma. Clinical. Immunotherapeutics. 1994, 1(1), 31–42.
21. De Angelis L., Meth.Find. Exp.Clin.Pharmacol.1980, 2, 335.
22. Global Initiative for Asthma. — 2006. — 106 с.
23. Goose J. and Blair A.M. Passive cutaneous anaphylaxis in the rat. Immunology, 1969, 16, 749–760.

24. Holgate S. Mediator and cytokine mechanisms in asthma. *Thorax*, 1993, v. 48, 103–109.
25. Hutson P.A., Church M.K., Clay T.P. et al. Early and Late-Phase Bronchoconstriction after Allergen Challenge of Nonanesthetized Guinea Pigs. *Am. Rev. Respir Dis* 1988, 137: 548–557.
26. Jarrad J., Wizeman B., Brown RH, Mitzner W. A theoretical model of the application of RF energy to the airway wall and its experimental validation. *BiomedEng Online* 2010, 9: 81.
27. Kay A.B. Asthma and inflammation. *J. Allergy Clin Immunol* 1991, 87, 893–910.
28. Koda A., Nagai H., Wada H. Pharmacological actions baicalin and baicalein. *Folia Pharmacol. Japan*. 1970, 66, 237–247.
29. Konzett H., Rossler, R. Versuchsanordnung zu untersuchungen an der Bronchialmuskulatur. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Exp. Path. Pharmacol.*, 1940, 195, 71–74.
30. Kovaleva V.L., Makarova O.V., Veselova N.I. New experimental model for testing of antiasthmatic drugs. 1st European Congress of pharmacology, Milan, 1995.
31. Lagrange Ph. Mecanismes de regulation de l'activite des cellules lymphocytaires T: applications a la pathologie infectieuse et tumorale. I. Hypersensibilite de type retarde et reponse humorale. *Pathologie Biologie*. 1976, January, 67–73
32. Manual of asthma management. Eds. O`Byrne P., Thompson N. WB Saunders, 2001.
33. Perry W., Boyd E.M. *J. Pharmacol. Exper. Ther.* 1941, 73, 65.
34. Pretolani M., Ferrer-Lorenz P., Vargaftig B.B. From anti-asthma to PAF-acether antagonism and back. *Biochemical Pharmacology*, 1989, 38, 1373–1389.
35. Robinson D.S., Durham S.R., Kay A.B. Cytokines in asthma. *Thorax* 1993, 48, 845–853.
36. Rogers D.F., Belvisi M.G. et al. Effects and interactions of sensory neuropeptides on airway microvascular leakage in guinea pigs. *Br. J. Pharmacol.*, 1988, 95, 1109.
37. Sakai R., Konno K. et al. Effects of alkyl substitutions of xanthine skeleton on bronchodilation. *J. Med. Chem.*, 1992, 35, 4039–4044.
38. Tarayre J.P., Barbara M., Aliaga M. and Tisne-Versailles. Comparative actions of immunosuppressants, glucocorticoids and non-steroidal anti-inflammatory drugs on various models of delayed hypersensitivity and on a non-immune inflammation in mice. *Arzneim. – Forsch. Drug Res.*, 1990, 40, 1125–1131.

ГЛАВА 30

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВОКАШЛЕВЫХ И МУКОЛИТИЧЕСКИХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составитель: д. м. н., проф. Д.Б. Утешев

Введение

Кашель является одним из самых распространенных симптомов заболеваний дыхательной системы. По данным Европейского респираторного общества, до 30% обращений к врачу общей практики так или иначе связаны с развитием кашля в ночное время. В норме кашель выполняет защитную функцию, способствуя выведению из дыхательных путей секрета, инородных тел и раздражающих веществ. Кашель возникает при механическом раздражении рецепторов носа, ушей, задней стенки глотки, трахеи, бронхов, плевры, диафрагмы, перикарда и пищевода. Воздействие внешних и внутренних факторов, таких как колебания температуры и влажности воздуха, аэрополлютанты, табачный дым, назальная слизь, мокрота, воспаление слизистых дыхательных путей и другие, приводят к формированию рефлекторной дуги, заканчивающейся в «кашлевом» центре продолговатого мозга.

Однако кашель может быть и проявлением патологического процесса, что требует уточнения его причины и подбора терапии. Кашель, в особенности хронический, существенно снижает качество жизни пациентов, нарушая сон, физическую и интеллектуальную активность. Кроме того, сильный кашель может привести к развитию ряда осложнений, а именно кровохарканья, рвоты, недержания мочи. Наиболее серьезным осложнением кашля является спонтанный пневмоторакс. Кроме того, длительное повышение внутрибрюшного давления способствует формированию грыж передней брюшной стенки. Кашель классифицируется:

- 1) по характеру: непродуктивный, или сухой; продуктивный, или влажный;
- 2) по интенсивности: покашливание, легкий и сильный;
- 3) по продолжительности: эпизодический кратковременный или приступообразный и постоянный;
- 4) по длительности: острый — до 3 нед., подострый — от 3 до 8 нед. и хронический — более 8 нед.

Важным критерием, позволяющим очертить круг дифференциально-диагностического поиска этиологии кашля, является его длительность (см. табл. 1). Так, острый кашель, как правило, связан с острыми вирусными инфекциями верхних и нижних дыхательных путей, однако может развиваться при пневмонии, в дебюте и при обострениях бронхиальной астмы, хронической обструктивной болезни легких. При необходимости диагноз уточняется с помощью рентгенологического исследования и оценки показателей внешнего дыхания.

В помощь практическому врачу респираторные общества, в частности Американская коллегия врачей — специалистов по заболеваниям грудной клетки (American College of Chest Physicians, ACCP), Европейское респираторное общество (European Respiratory Society, ERS), Британское торакальное общество (British Thoracic Society,

BTS) создали специальные рекомендации по ведению пациентов с кашлем. Наиболее эффективной оказывается этиотропная терапия кашля, которая предполагает либо устранение причины кашля (отмена препаратов, вызывающих кашель, устранение контакта с аллергеном, отказ от курения), либо ликвидацию патологического процесса, ставшего причиной кашля (антибактериальная терапия пневмонии и других респираторных инфекций, терапия гастроэзофагеального рефлюкса, компенсация хронической сердечной недостаточности).

В качестве патогенетической терапии воспалительных заболеваний респираторной системы, являющихся наиболее распространенной причиной кашля, необходимо включить препараты, способствующие восстановлению реологических свойств мокроты и улучшающие дренажную функцию бронхов.

В настоящее время препараты, применяемые для удаления мокроты, делят на две основные группы:

- препараты, стимулирующие отхаркивание (секретомоторные);
- муколитические (или секретолитические) препараты.

Секретомоторные препараты усиливают физиологическую активность мерцательного эпителия и перистальтические движения бронхиол, способствуя продвижению мокроты из нижних отделов дыхательных путей в верхние и ее выведению. Этот эффект обычно сочетается с усилением секреции бронхиальных желез и некоторым уменьшением вязкости мокроты. Условно препараты этой группы делят на 2 подгруппы: рефлекторного и резорбтивного действия. Средства рефлекторного действия (препараты термопсиса, истода, алтея и других лекарственных растений, натрия бензоат, терпингидрат и др.) при приеме внутрь оказывают умеренное раздражающее действие на рецепторы слизистой оболочки желудка, что возбуждает рвотный центр продолговатого мозга, в результате чего усиливается секреция слюнных желез и слизистых желез бронхов. Ряд препаратов рефлекторного действия частично обладает также резорбтивным эффектом: содержащиеся в них эфирные масла и другие вещества выделяются через дыхательные пути и вызывают усиление секреции и разжижение мокроты. Ко второй подгруппе относятся препараты резорбтивного действия (йодид натрия и калия, аммония хлорид, частично — натрия гидрокарбонат и др.), которые, всасываясь в ЖКТ, выделяются слизистой оболочкой дыхательных путей, стимулируя бронхиальные железы и вызывая непосредственное разжижение (гидратацию) мокроты. Однако муколитический и отхаркивающий эффект вышеуказанных групп препаратов недостаточен, и поиск новых эффективных средств, улучшающих отхождение мокроты, привел к созданию нового класса препаратов — муколитиков (секретолитиков).

Муколитические препараты разжижают мокроту в результате расщепления сложных муцинов, что ведет к уменьшению ее вязкости и облегчению эвакуации. Выделяют три группы муколитических препаратов:

1. Протеолитические ферменты.
2. Аминокислоты с SH-группой.
3. Мукорегуляторы.

Протеолитические ферменты (трипсин, химотрипсин, рибонуклеаза, дезоксирибонуклеаза и др.) разжижают мокроту за счет разрыва пептидных связей белка геля мокроты, что облегчает ее отделение. Однако препараты этой группы практически не применяются в пульмонологии, так как могут спровоцировать бронхоспазм, кровохарканье, аллергические реакции. Аминокислоты с SH-группой разрывают дисульфидные связи кислых мукополисахаридов мокроты, что приводит к деполаризации мукопротеидов и уменьшению вязкости слизи. К этой группе относятся ацетилцистеин, карбоцистеин.

Основные причины кашля у взрослых

Острый кашель < 3 недель	Инфекции верхних дыхательных, путей вирусные бактериальные
	Пневмонии
	Аспирация инородного тела в дыхательные пути
	Заболевания ЛОР-органов
	Обострение бронхиальной астмы
Подострый кашель от 3 до 8 недель	Обострение хронической обструктивной болезни легких
	Кашель после перенесенной инфекции
	Заболевания ЛОР-органов
Хронический > 8 недель	Дебют хронических заболеваний легких и внелегочной патологии
	Бронхиальная астма
	Хронический риносинусит
	Хроническая обструктивная болезнь легких
	Плеврит
	Интерстициальные болезни легких
	Туберкулез легких
	Новообразования верхних дыхательных путей и легких
	Курение
	Заболевания ЛОР-органов: хронические воспалительные; заболевания ЛОР-органов; новообразования; аномалии строения ЛОР-органов (длинный язычок и др.)
	Заболевания сердечно-сосудистой системы: сердечная недостаточность; пороки сердца; перикардит
	Заболевания желудочно-кишечного тракта: гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь; грыжа пищеводного отверстия диафрагмы
	Прием лекарственных препаратов (наиболее часто — ингибиторов АПФ, реже — амиодарона)
Диффузные заболевания соединительной ткани	
Ятрогенные причины (бронхоскопия, ларингоскопия, постинтубационный синдром)	

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 трахеи и бронхов).

1. Экспериментальные модели для изучения противокашлевой активности новых фармакологических веществ

1.1. Первичный отбор новых фармакологических веществ с противокашлевой активностью

Для скрининга желателно использовать классическую модель кашля у морских свинок, индуцированного лимонной кислотой. Эта модель вполне доступна и хорошо воспроизводима. При анализе литературы, посвященной поиску веществ с противокашлевой активностью, можно встретить описание разнообразных моделей кашля с участием разных экспериментальных животных, однако подавляющее большинство исследователей вполне справедливо считает модель с индукцией кашля лимонной кислотой наиболее адекватной, хорошо контролируемой и воспроизводимой в 100% случаев [10, 15, 16].

Чрезвычайно интересными и важными представляются результаты недавно проведенных экспериментов на морских свинках, в которых было показано, что кашель-индуцирующее действие лимонной кислоты реализуется через дельта-опиоидные рецепторы [15] и NK-рецепторы [9, 18].

Необходимо подчеркнуть, что имеются значительные видовые различия в реактивности экспериментальных животных на кашель-индуцирующие агенты (лимонную, лауриловую кислоты, капсаицин и др.). В специальном исследовании, посвященном сравнительному изучению интенсивности кашлевой реакции, вызванной аэрозольным воздействием лимонной кислоты и капсаицина, у морских свинок, крыс породы Вистар и кроликов, было показано, что на лимонную кислоту и капсаицин реагируют кашлем 100% морских свинок. При этом интенсивность кашлевой реакции хорошо коррелирует с концентрацией лимонной кислоты или капсаицина. Только 43% крыс реагировали кашлем на аэрозоль лимонной кислоты и 28,6% — на капсаицин. Что касается кроликов, то лишь у 61% из них удалось вызвать кашель на аэрозоль лимонной кислоты и ни в одном случае — на капсаицин. В заключение был сделан вывод, что морские свинки наиболее предпочтительны для воспроизведения кашля, индуцированного химическими агентами.

1.2. Модель кашля у морских свинок, индуцированного лимонной кислотой [24]

Морских свинок (самок и самцов) массой 300–400 г перед началом исследования (за 14–16 ч до исследования) оставляют без корма. Животных размещают (каждого по отдельности) в камере из плексигласа или тефлона (20×14×12 см). Морской свинке, находящейся в камере, ингалируют в течение 5 мин с помощью специального устройства (ультразвукового или пневматического компрессора)⁶ аэрозоль 10–17% водного раствора лимонной кислоты (Sigma). Эксперимент состоит из 2 этапов. На первом этапе животных индивидуально тестируют по интенсивности реакции на лимонную кислоту за день до введения испытуемого вещества. В исследование отбирают группу интенсивно кашляющих морских свинок (в среднем 20–30 кашлевых приступов в течение 30 мин). На втором этапе (на следующий день) испытывают собственно противокашлевые свойства изучаемого вещества. Для этого животным вводят парентерально (подкожно, внутримышечно, внутрибрюшинно за 5–10 мин до индукции кашля) или внутрижелудочно (за 30–60 мин до индукции кашля) или ингаляционно (в виде аэрозоля) испытуемое вещество в нужном диапазоне доз. После терапевтического вмешательства морскую свинку подвергают аэрозольному воздействию 10–17% р-ра лимонной кислоты в течение 5 мин. Подсчитывают количество приступов кашля в течение последующих 30 мин и выражают полученные результаты в процентах от нелеченого контроля, который принимают за 100%. В случае использования нескольких доз вещества определяют дозовую зависимость. При необходимости оценивают длительность противокашлевого эффекта и уровень толерантности к нему.

⁶ Мы применяли в аналогичных экспериментах небулайзер фирмы *Pari*, скорость воздушного потока которого составляет 0,16 л/сек, давление 0,5 бар.

В зависимости от цели эксперимента в качестве референтных препаратов могут быть использованы кодеин⁷ (20 мг/кг подкожно), либексин, тусупрекс, фенспирид и др.

2. Углубленное изучение новых фармакологических веществ с противокашлевой активностью

Углубленное изучение новых веществ с противокашлевой активностью проводят с целью выяснения их механизмов действия, причем модель кашля, индуцированного капсаицином, необходима в первую очередь для исследования веществ с предполагаемым центральным механизмом противокашлевого действия, а остальные модели (2.2; 2.3; 2.4) могут быть использованы для изучения противокашлевых веществ с преимущественно периферическим механизмом действия.

2.1. Модель кашля у морских свинок, индуцированного капсаицином — селективным кашель-индуцирующим агентом

Эту модель следует рассматривать как важнейшую на этапе более детального изучения противокашлевых веществ, так как механизм действия капсаицина неоднозначен: с одной стороны, эффект капсаицина реализуется через опиоидные рецепторы о чем свидетельствует блокада его действия морфином [20], а с другой стороны, его эффект опосредован рецепторами нейропептидов [17].

Процедура подготовки и тестирования морских свинок та же, которая описана в 1.1. Для индукции кашля животным ингалируют с помощью небулайзера или другого распылителя капсаицин (Sigma) в концентрации 30–60 мкМ в течение 5 мин.

Способы введения тестируемых веществ и оценка противокашлевого эффекта те же, что и в разделе 1.1. В некоторых случаях, когда необходимо оценить прямое воздействие вещества на рецепторы, его вводят непосредственно в желудочки мозга наркотизированной морской свинки.

Для изучения агонистического или антагонистического действия тестируемых веществ на этой модели используют в качестве неселективного антагониста опиоидных рецепторов налоксон (3 мг/кг, внутримышечно); *селективных антагонистов* опиоидных рецепторов: μ -рецепторов — beta-funaltrexamine (20 мг/кг, подкожно), σ -рецепторов — rimcazole (внутрибрюшинно), δ -рецепторов — налтриндола, а в качестве *селективных агонистов* опиоидных рецепторов: δ -рецепторов — DADLE (D-АЛА-D-лей-энкефалин), μ -рецепторов — codeine phosphate, hydrocodone; κ -рецепторов — BRL 52974; σ -рецепторов — dextromethorphan (внутрибрюшинно) [15, 17].

2.2. Модель кашля, индуцированного электрической стимуляцией слизистой трахеи у наркотизированных морских свинок или кошек

Кашель вызывают электрическим раздражением верхнего гортанного нерва.

2.3. Модель кашля, индуцированного механическим раздражением слизистой трахеи, у наркотизированных морских свинок, крыс или кошек

Слизистую оболочку трахеи механически раздражают движением сверху и снизу фиксированного на проволочной нити полиэтиленового цилиндра диаметром 5 мм и длиной 10 мм.

2.4. Модели кашля, индуцированного диоксидом серы (газ) или аммонием (газ) у мышей [21]

В этих моделях чаще всего используют белых нелинейных мышей. Животных размещают в прозрачной клетке из плексигласа, в которую подают диоксид серы или аммоний. Противокашлевое действие оценивается положительно, если мыши не кашляют в течение

⁷ В соответствии с ФЗ от 08.01.1998 г. № 3-ФЗ (ред. от 03.12.2011 г.) «О наркотических средствах и психотропных веществах».

ние 3 мин. Использование этих моделей требует специального оборудования для подачи газа животным.

2.5. Модель кашля, индуцированного *Bordetella pertussis* bacilli у мышей [11] и крыс [19]

Специфическая модель, требующая специальных условий для работы с культурами бактерий (эксперимент проводится в боксе). Заражение мышей или крыс проводится интраназально.

3. Исследование муколитических свойств

Муколитики имеют большое значение в лечении заболеваний дыхательных путей, сопровождающихся затруднением удаления секрета из их верхних и нижних отделов. Роль муколитиков значительно возрастает при повышенной вязкости мокроты, которая может стать причиной застоя бронхиального секрета при обструкции нижних дыхательных путей (например, при бронхиальной астме, хроническом обструктивном бронхите). Удаление мокроты способствует улучшению вентиляции альвеол и предупреждению инфекции дыхательных путей.

Длительное время основными препаратами, применяемыми для этой цели, были отхаркивающие средства, действие которых в значительной мере связано со стимуляцией рецепторов слизистых оболочек бронхов и механическим усилением продвижения мокроты.

В последнее время появились новые возможности повышения дренажной функции трахеи и бронхов с помощью новых эффективных средств, которые обладают способностью влиять на реологические свойства мокроты, ее адгезивные показатели, а также облегчать выведение мокроты физиологическим путем. В отличие от старых секретомоторных препаратов, стимулирующих только отхаркивание (трава термопсиса, корень алтея, пертуссин, глицирам, бензоат натрия и др.), новые препараты обладают муколитическими (т.е. бронхосекретолитическими) свойствами: усиливают физиологическую активность мерцательного эпителия, перистальтику бронхов и стимулируют секрецию бронхиальных желез, а также уменьшают вязкость мокроты. Одним из наиболее эффективных препаратов этой группы является бромгексин.

3.1. Исследование муколитической активности веществ

Морских свинок (по 8 — 10 в группе) анестезируют этиламиналом натрия (40 мг/кг). В трахею животного вставляют канюлю, соединенную с аппаратом искусственного дыхания (Ugo Basile). После чего животное укладывают вниз головой под углом 45°. Мокроту из канюли собирают отсасыванием с помощью шприца в течение 2 ч после введения лекарства.

Испытуемое вещество вводят внутривентриально или внутривентриально в объеме 1 мл (доза 1,2 мг/кг). Сравнивают объем мокроты, полученной у животных, которым вводили испытуемое вещество, и леченных препаратом сравнения — ацетилцистеином, бромгексином (субстанция). Желательно исследовать и качественный состав мокроты: вязкость, плотность и т.д. и сравнивать его с нелечеными животными и лечеными эталонными препаратами.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Дворецкий Л.И. Кашель: дифференциальный диагноз // Consilium Medicum. — 2006. — Т. 8, №3. — С. 5–8.
2. Зайцева О.В. Синдром кашля у детей с острыми респираторными заболеваниями: алгоритм терапии // РМЖ. — 2007. — Т. 15. — № 21. — С. 1549–1552.

3. Чучалин А. Г., Абросимов В.Н. Кашель. — Рязань, 2000. — 59 с.
4. Chung K.F., Pavord I.D. Prevalence, pathogenesis, and causes of chronic cough // *Lancet* — 2008; vol. 19 — №.371. — pp.1364–1374.
5. Irwin R.S. Unexplained cough in the adult // *Otolaryngol Clin North Am.* — 2010. — vol.43. — № 1.— pp. 167–180.
6. Kardos P., Berck H., Fuchs K.H. et al. Guidelines of the german respiratory society for diagnosis and treatment of adults suffering from acute or chronic cough // *Pneumologie.* 2010 –v ol.64. — №6. — pp. 336–373.
7. Malerba M, Ragnoli B. Ambroxol in the 21st century: pharmacological and clinical update // *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, 2008. — vol. 4 . — №.8. — pp. 1119–1129.
8. Wunderer H., Morgenroth K., Weis G. The cleaning system of the airways: physiology, pathophysiology and effects of ambroxol // *Med Monatsschr. Pharm.* — 2009 — vol. 32. — №. 2. — pp. 42–47
9. Advenier C., Girard V., Naline E. et al. Antitussive effect of SR 48968, a non-peptide tachykinin NK2 receptor antagonist. // *Eur. J. Pharmacol.*, 1993, 250(1), 169–171.
10. Braga P.C., Bossi R. Piatti G. Dal Sasso M. Antitussive effect of oxatomide on citric acid-induced cough in conscious guinea pig. // *Arzneimittelforschung*, 1993, 43(5), 550–553.
11. Guiso N, et al. Intranasal murine model of Bordetella pertussis infection. // *Vaccine*, 1999, 17(19), 2366–2376.
12. Empey W. // *Therapiewoche.*, 1980, 30, 1913.
13. Irwin R.S. et al. // *Therapiewoche.*, 1981, 31, 6660.
14. Kapui Z., Mikus E.G., Bence J. et al. // *Arzneimittelforschung*, 1998, 48(12), 1147–1155.
15. Kotzer C.J., Hay D.W., Dondio G., Peetrillo P., Underwood D.C. The antitussive activity of delta-opioid receptor stimulation in guinea pigs. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 2000, 292(2), 803–809.
16. Laude E.A., Bee D., Crambes O., Howard P. Antitussive and antibronchoconstriction actions of fenspiride in guinea-pigs. // *Eur. Respir. J.*, 1995, 8(10), 1699–1704.
17. Lavezzo A., Mellilo G., Clavenna G., Omini C. Peripheral site of action of levodropropizine in experimentally-induced cough: role of sensory neuropeptides. // *Pulm. Pharmacol.*, 1992, 5(2), 143–147.
18. Moreaux B., Nemmar A., Vincke G., Hallou D., Beerens D., Advenier C., Gustin P. Role of substance P and tachykinin receptor antagonists in citric acid-induced cough in pigs. // *Eur. J. Pharmacol.*, 2000, 408(3), 305–312.
19. Parton R, et al. Responses to Bordetella pertussis mutant strains and to vaccination in the coughing rat model of pertussis. // *J. Med. Microbiol.*, 1994, 40(5), 307–312.
20. Rogers D.F. and Barnes P.J. Opioid inhibition of neurally mediated mucus secretion in human bronchi. *Lancet*, 1989, II, 930–932.
21. Saha K., Mukherjee P.K., Murugesan T., Saha B., Pal M. Studies on *in vivo* antitussive activity of *Leucas lavandulaefolia* using a cough model induced by sulfur dioxide gas in mice. // *J. Ethnopharmacol.*, 1997, 57(2), 89–92.
22. Stone R.A., Barnes P.J., Chung K.F. Effect of 5-HT_{1A} receptor agonist, 8-OH-DPAT, on cough responses in the conscious guinea pig. // *Eur. J. Pharmacol.*, 1997, 332(2), 201–207.
23. Tatar M., Pecova R, Karcolova D. Sensitivity of cough reflex in awake guinea pigs, rats and rabbits // *Bratisl., Lek. Listy.*, 1997, 10, 539–543.
24. Ucelay M., Labeaga L., Orjales A. et al. Evaluation of Bronchospasmolytic, Antiallergic, Anti-inflammatory, Mucolytic and Antitussive Activities of Decasilate in Experimental Models. // *Arzneim.-Forschung / Drug*, 1991, 41(1), 5, 528–532.

ГЛАВА 31

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВОМИКРОБНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова;
академик РАМН А.М. Егоров; академик РАМН, проф. В.П. Фисенко;
д. м. н., проф. С.В. Сидоренко; д. м. н., проф. В.П. Яковлев;
к. м. н. Л.А. Блатун; к. м. н. С.В. Буданов; д. б. н. М.В. Шульгина;
д.м. н. А.Н. Миронов; д. м. н., проф. В.А. Меркулов;
к. б. н. А.Н. Васильев; Л.Б. Смирнова; к. м. н. А.А. Цыбанев;
к. м. н. А.И. Зебрев; к. м. н. А.И. Губенко; к. м. н. И.В. Лыскова*

Введение

Современные антибиотики и синтетические антимикробные препараты занимают ведущее место в лечении бактериальных инфекций. Они применяются при различных инфекционно-воспалительных заболеваниях у 70–100% больных хирургического, урологического, гинекологического стационаров, отделений реанимации и интенсивной терапии и в детской практике, у 50–60% терапевтических больных. На долю антибактериальных препаратов приходится около 25–30% расходов многопрофильной больницы на лекарственную терапию. Номенклатура средств антимикробной терапии огромна и непрерывно пополняется за счет внедрения в клиническую практику новых поколений антибиотиков, новейших антибактериальных препаратов, получаемых путем химического синтеза. Побудительной причиной, стимулирующей развитие исследований по созданию новых антибактериальных препаратов, является возникновение и широкое распространение антибиотикорезистентности и как следствие — снижение эффективности антимикробной химиотерапии. Принято считать, что основным путем преодоления резистентности является создание новых антимикробных препаратов. Применение стандартных и достоверных методов оценки антимикробной активности и химиотерапевтического действия новых антимикробных препаратов на этапах доклинического изучения должно служить ограничительным механизмом, позволяющим отбирать и рекомендовать для широкого медицинского применения лишь препараты, кардинально превосходящие существующие по показателям эффективности, фармакокинетическим, фармакологическим свойствам, скорости формирования устойчивости.

Целью методических рекомендаций по доклиническому изучению антибиотиков и синтетических антибактериальных препаратов является унификация исследований по оценке спектра антимикробной активности и химиотерапевтического действия с использованием комплекса стандартных методов. По результатам исследования должна быть установлена активность нового препарата в отношении определенных групп возбудителей, рекомендованы показания к применению, ориентировочные режимы лечения на период КИ.

1. Методы и модели экспериментального изучения новых антибиотиков и синтетических препаратов

1.1. *Спектр действия и сравнительная антимикробная активность in vitro изучаемого вещества и его лекарственных форм*

1.1.1. *Оценка спектра действия и степени антибактериальной активности in vitro новых антибиотиков и синтетических антибактериальных веществ* производится в отношении определенного набора штаммов (чувствительных и устойчивых к антибиотикам). Отбирают вещества, характеризующиеся широким или узконаправленным спектром антибактериального действия, используя высокочувствительные эталонные штаммы (из международных и региональных коллекций) и свежeweделенные клинические штаммы грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. Каждый вид должен быть представлен 4–5 штаммами с различным набором маркеров антибиотикорезистентности.

1.1.2. *Оценка мультирезистентности*

Новые антибактериальные препараты должны быть оценены также на наличие активности в отношении таких проблемных возбудителей, как метициллинрезистентные стафилококки; устойчивые к бензилпенициллину *Streptococcus pneumoniae*, устойчивые к ванкомицину *Staphylococcus spp.*, *Enterococcus spp.*, множественноустойчивые энтеробактерии (*Escherichia coli*, *Citrobacter spp.*, *Enterobacter spp.*, *Klebsiella spp.*, *Shigella spp.*, *Salmonella spp.* и др.); устойчивые к амикацину и другим аминогликозидам *Pseudomonas aeruginosa*, другие виды псевдомонад (*Burkholderia cepacia*, *Stenotrophomonas maltophilia* и др.) и неферментирующих грамотрицательных бактерий (*Acinetobacter spp.*). Эти микроорганизмы выделяют из клинического материала, идентифицируют и оценивают по структуре и уровням антибиотикостойчивости.

Определение спектра антибактериального действия и антибиотикочувствительности проводят методом двукратных серийных разведений на жидкой или плотной питательной среде. Условия определения (питательная среда, число и характеристика штаммов, особенности культивирования, сроки учета результатов и др.) зависят от вида возбудителя (см. приложение) [1].

1.1.3. *Скорость формирования устойчивости к новым соединениям*

Определение рекомендуется проводить на плотных питательных средах, содержащих концентрации препарата ниже соответствующих значений МПК (минимальная подавляющая концентрация) и двукратно возрастающие концентрации испытуемых соединений.

Для выявления природноустойчивых мутантов в популяции штамма его «подвергают однократному воздействию препарата, для чего взвесь одно-двухсуточной культуры в изотоническом растворе хлорида натрия засевают на чашки с агаром, содержащим 25–100 мг/л вещества (в зависимости от установленных значений МПК). Состав среды, продолжительность и температура инкубации зависят от вида микроорганизма. У выросших колоний определяют уровень резистентности к препарату.

Частота мутаций устанавливается отношением числа антибиотикостойчивых клеток к числу особей, выросших на контрольных чашках без антибиотика.

Скорость формирования устойчивости устанавливается при посеве культур (посевная доза 10^{10} микробных тел на чашку Петри) на агар, содержащий двукратно возрастающие концентрации препарата, используя для дальнейших пересевов последнюю чашку, на которой обнаружили рост единичных колоний. При оценке результатов устанавливают степень возрастания устойчивости (колонии, выросшие в присутствии максимальных концентраций испытуемого вещества) и скорость ее развития (отмечается последний пересев, после которого прекращается или замедляется возрастание устойчивости).

Стабильность приобретенной устойчивости in vitro у мутантных культур изучают путем пересевов культур на жидкой или плотной питательной среде без препарата с периодическим определением (после 5, 10, 15 и т.д. пассажей) МПК не менее чем для 100 вариантов штамма, по результатам которого устанавливается степень снижения МПК у вариантов штамма или сохранения их значений на уровне, характерном для мутанта [1].

1.1.4. Изучение мишеней и механизмов антибактериального действия соединений

На этапах последующей детальной оценки нового перспективного соединения целесообразно изучить мишени и механизмы его антибактериального действия, с использованием простых тестов. Эти исследования проводятся с целью выявления скорости формирования устойчивости, способности оказывать разрушающее воздействие на макромолекулярные структуры бактериальной клетки.

Рекомендуемые методы основаны на определении уровня одного из внутриклеточных фрагментов бактериальной клетки — β -галактозидазы, являющегося маркером белкового синтеза в клетках *Escherichia coli*. Предпосылкой при проведении этих исследований является снижение скорости синтеза β -галактозидазы в присутствии веществ, подавляющих синтез белка.

Для проверки действия новых соединений *на синтез белка и проницаемость клеточной стенки используют трехкомпонентную систему*, содержащую культуру клеток *E. coli* K-12 в логарифмической фазе роста, испытуемый препарат в концентрации 0,5 МПК, 1 МПК, 2 МПК и т.д. до конечной концентрации 10 мг/л. По изменению активности β -галактозидазы в присутствии ее индуктора — *изопропил-тио Д- β -галактозида* под влиянием испытуемого вещества определяют его влияние на *проницаемость мембраны, скорость и уровень синтеза фермента*.

Для выявления *ДНК-повреждающего действия* соединений можно использовать тест-систему, в которой индукцию SOS оперонов в присутствии различных концентраций испытуемого вещества оценивают по абсолютному значению активности β -галактозидазы и расчету коэффициента индукции — соотношению абсолютных значений активности фермента в присутствии ДНК-повреждающих агентов и в необработанной культуре EG1000/rjE43. Способность тестируемых соединений вызывать разрывы в бактериальной ДНК в данной системе позволяет оценить предположительно не только механизм повреждающего воздействия, но и прогнозировать их возможную генотоксичность.

1.1.5. Оценка активности воспроизводимых препаратов

Необходимый объем исследований по оценке активности воспроизводимых препаратов (дженериков) значительно меньше. Задачей исследования в этом случае является подтверждение соответствия воспроизводимого препарата исходному (зарегистрированному в России, желателно выпускаемому фирмой-разработчиком). Набор референс-микроорганизмов может быть ограничен 1–2 штаммами на каждый вид, с использованием только тех видов, которые входят в спектр действия воспроизводимого препарата. В ходе изучения определяются значения МПК и МБК (минимальная бактерицидная концентрация) соединения. Контролем служат субстанция и лекарственная форма препарата сравнения. Контроль антимикробной активности не только субстанции, но и лекарственной формы препарата необходим для исключения возможного влияния на антимикробную активность вспомогательных веществ, содержащихся в лекарственной форме дженерика.

1.2. Порядок исследования при определении спектра антимикробного действия и активности нового соединения in vitro

Первичная оценка изучаемых соединений на чувствительность к антибиотикам эталонных штаммов различных видов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов.

Детальное изучение степени антибактериальной активности соединений в отношении штаммов грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов из междунациональных коллекций с известными механизмами резистентности.

Исследование активности новых соединений в отношении набора множественно-устойчивых и клинических штаммов условно патогенных и патогенных микроорганизмов оценивают в сравнении с известными препаратами близкой химической группы или аналогичными по антимикробному эффекту. В случае преимущественной активности испытуемого вещества в отношении грамположительных микроорганизмов контролем служат природные пенициллины, полусинтетические пенициллиназоустойчивые пенициллины; цефалоспорины I–II поколений, макролиды, линкозамиды и др. При активности соединений в отношении грамотрицательных возбудителей в качестве контроля можно использовать азтреонам, полимиксин В.

Для препаратов широкого спектра действия контролем могут быть аминогликозиды, тетрациклины, хлорамфеникол, полусинтетические пенициллины и цефалоспорины III–IV поколений.

При постановке исследований по изучению антибиотикочувствительности соблюдение ряда условий является определенной гарантией их достоверности. К ним относятся условия, приведенные ниже:

– Выбор адекватных *питательных сред*, которые должны отвечать требованиям стандартности и воспроизводимости результатов. В их составе не должны содержаться вещества, подавляющие действие антибиотиков и синтетических препаратов.

В наибольшей степени соответствует указанным требованиям при определении антибиотикочувствительности среда Мюллер-Хинтона. Возможным также является использование бульона или 1,5–2% агара Хоттингера, содержащего 110–130 мг% аминного азота с необходимыми добавками при определении чувствительности б-гемолитических стрептококков группы А, В. При определении чувствительности гемофильной палочки, возбудителей опасных инфекционных заболеваний применяют специальные среды. Подробные рекомендации по этому разделу приведены в соответствующих руководствах [1, 2, 3].

– *Первоначальные концентрации оцениваемых препаратов устанавливаются с учетом токсичности, установленной в исследованиях по изучению острой токсичности, ориентировочной химической структуры нового соединения.* Первая пробирка ряда при проведении исследований методом серийных разведений в исходной питательной среде обычно содержит испытуемый раствор в концентрации 100–200 мг/л. В ее присутствии обычно подавляется рост большинства музейных антибиотикочувствительных штаммов, а также множественноустойчивых эталонных и клинических штаммов. Эти концентрации превышают в 8–10 и более раз максимальные уровни концентраций антибиотиков в крови при их введении в максимально переносимых дозах.

Основной раствор вещества, из которого готовят последующее разведение, должен содержать 1 мг (1000 мкг) в 1 мл. Из него готовят рабочий раствор — 100–200 мг/л, который последовательно разводят двукратно в жидкой или плотной питательной средах в ряду из 8–10 пробирок. Последняя пробирка служит контролем роста культуры.

– *Величина посевой дозы.* Обычно используют *взвесь суточной бульонной или агаровой культуры тест-штаммов* из расчета 10^3 , 10^5 , 10^7 , 10^9 КОЕ/мл в объеме 0,2 мл, которую в зависимости от задачи исследования добавляют в каждую пробирку с разведениями испытуемого препарата. Пробирки инкубируют при температуре 37 °С в течение 18–24 ч. *Результаты оценивают визуально*, определяя наличие или отсутствие роста в среде, содержащей различные концентрации испытуемого соединения. Последняя пробирка ряда с задержкой роста (прозрачный бульон) соответствует минимальной подавляющей (бактериостатической концентрации) препарата в отношении данного штамма. Бактерицидную концентрацию определяют путем высева из 2–3 последних пробирок ряда с отсутствием видимых признаков роста на агар или бульон. После оптимального для каждого микробного вида срока инкубации посевов отмечают наименьшую концен-

трацию вещества в пробирке, высев из которой не дал роста. Эту концентрацию принимают за минимальную бактерицидную [4].

Сравнительную степень антибактериальной активности препаратов оценивают величиной МПК или МБК, определяемых не менее чем при 2-х значениях посевной дозы: минимальной (10^4 – 10^5 КОЕ/мл) и максимальной (10^6 – 10^9 КОЕ/мл) в зависимости от вида возбудителя. По разнице значений МПК и МБК, установленных при максимальной и минимальной величинах инокулума, можно:

а) прогнозировать химиотерапевтическую эффективность соединений в условиях генерализованной инфекции;

б) судить о возможности достижения бактерицидного действия веществ в условиях макроорганизма (с учетом их переносимости), условно классифицировать новый препарат по типу действия на бактериальную клетку (бактериостатическое или бактерицидное действие);

в) устанавливать наличие (или отсутствие) перекрестной устойчивости испытуемых микроорганизмов к новому соединению;

г) выявлять преимущества нового соединения перед известными по широте спектра действия, активности в отношении различных микроорганизмов («проблемных» возбудителей, внутриклеточных патогенов, анаэробных микроорганизмов и др.), а также по сравнительной степени антимикробной активности, бактерицидности и др.

д) определять влияние на активность нового соединения рН питательной среды (в диапазоне 6,0–8,0), величины инокулума (в пределах от 10^3 до 10^9 КОЕ/мл), белков сыворотки крови человека и лабораторных животных. Новые препараты рассматриваются перспективными для дальнейшего изучения, если значения их МПК *in vitro* для тест-штаммов не превышают 10–20 мг/л.

2. Изучение химиотерапевтической эффективности антибиотиков и синтетических антибактериальных препаратов на моделях экспериментальных инфекций

Задачей химиотерапевтического эксперимента является оценка эффективности испытуемого соединения и его лекарственных форм (нового или воспроизводимого) в условиях моделирования инфекционного процесса *in vivo*.

Изучение химиотерапевтических свойств новых соединений проводится в отношении возможно большего числа микробных видов возбудителей инфекций человека. На первых этапах скрининга эффективных препаратов используют простейшие модели генерализованной инфекции (экспериментальный сепсис, вызываемый условно-патогенными микроорганизмами, отнесенными по степени патогенности и контагиозности к III группе возбудителей).

Рекомендуемый набор культур для воспроизведения инфекции включает: стафилококки (плазмокоагулирующий и коагулазонегативный штаммы, антибиотикочувствительные и антибиотикоустойчивые с различным набором маркеров резистентности, в том числе метициллинрезистентные), стрептококки (гемолитический и зеленающий), пневмококки (чувствительные к бензилпеницилину и пенициллинрезистентные); различные виды энтеробактерий антибиотикочувствительные и множественноустойчивые (эшерихии, клебсиеллы, протеи, шигеллы, сальмонеллы), псевдомонады и другие неферментирующие грамотрицательные бактерии, возбудители газовой гангрены, дрожжеподобные грибы *Candida* и др. [5]

2.1. Экспериментальные животные

При изучении химиотерапевтической эффективности соединений используют различные виды животных: белые мыши и крысы, морские свинки, кролики, обезьяны. Однако на первом этапе исследования предпочтение отдается мышам, на которых возможно проведение массовых исследований. Следует учитывать, что клиника инфекций, моде-

лируемых в этих исследованиях, существенно отличается от проявлений соответствующих заболеваний человека. В этих исследованиях подтверждается лишь выявленное *in vitro* наличие антибактериальной активности у испытуемых соединений без разработки конкретных схем применения у больного.

2.2. Выбор экспериментальной модели

План химиотерапевтического исследования *in vivo* зависит от того, имеет экспериментатор дело с новым соединением или воспроизведенным препаратом. Для воспроизведенного препарата химиотерапевтическую эффективность оценивают по сокращенному варианту на 2–3 стандартных моделях сепсиса, вызываемого стафилококком, кишечной палочкой или протеем, применяют антибиотикочувствительные штаммы бактерий.

Для новых соединений набор моделей должен быть достаточно широким, а их первоначальный выбор основывается на данных антимикробного спектра, установленных *in vitro*. В случае отсутствия необходимой информации в исследованиях *in vitro* перспективные вещества из новых химических групп должны быть изучены при экспериментальных инфекциях, так как их активность может выявиться только после соответствующих метаболических превращений *in vivo*.

Необходимым требованием при выборе модели является ее стандартность, воспроизводимость, закономерность развития симптомов заболевания в повторных исследованиях при заражении животных одной и той же культурой определенного микробного вида. В первых исследованиях устанавливается наличие у испытуемого соединения химиотерапевтического эффекта. В дальнейшем на ряде моделей острых и хронических инфекций, в том числе приближающихся по течению к наблюдаемым в клинике формам заболевания, устанавливают широту химиотерапевтического действия препарата, зависимость его выраженности от тяжести инфекции, используемых схем применения. Наиболее распространенными в химиотерапевтических исследованиях являются модели генерализованной инфекции (экспериментальный сепсис) белых мышей, вызываемой вирулентными штаммами грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов с различной степенью чувствительности к антимикробным препаратам.

2.3. Описание моделей

2.3.1. Острая генерализованная инфекция у мелких животных

Может быть воспроизведена при внутривенном, внутрибрюшинном, подкожном или внутримышечном заражении (в двух последних вариантах при использовании высоковирулентных штаммов). Набор возбудителей для воспроизведения инфекции определяется установленным спектром действия препарата и включает представленные в таблице 1 возбудители. Заражающая доза, для воспроизведения определенной модели и всех последующих, для каждого штамма определенного вида возбудителя устанавливается в предварительных исследованиях.

2.3.2. Хроническая септикопиемия (стафилококковая)

Развивается при внутривенном введении штаммов стафилококков с пониженной вирулентностью. Инфекция (септические очажки со скоплениями микробов в паренхиматозных органах) развивается на 5–7 день после заражения с гибелью животных до 10-го дня.

2.3.3. Пневмония с генерализацией инфекции

Одна из наиболее частых моделей, используемых при изучении химиотерапевтических свойств препаратов. Она воспроизводится путем интраназального заражения белых мышей суточной бульонной или агаровой культурой пневмококков, стафилококков, клебсиелл, эшерихий, смешанной культурой грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов. Используется заражающая доза (для каждого возбудителя), обеспе-

чивающая 100% гибель животных в течение 48–72 ч. Распространенность и тяжесть процесса, сроки гибели животных определяются видом возбудителя, его вирулентностью, величиной заражающей дозы и др. Эти модели для оценки химиотерапевтических свойств испытуемого препарата удобны, так как дают возможность установить его эффективность не только по выживаемости животных, но и по динамике изменений клинической картины заболевания.

2.3.4. Экспериментальный пиелонефрит (стафилококковый, колибациллярный, протейный, а также вызванный ассоциацией микроорганизмов)

Может быть воспроизведен путем внутрибрюшинного или интрауретрального заражения мышей суточной культурой соответствующего возбудителя. В первом случае при заражении животных одной смертельной дозой (1 DLM) развивается септикопиемия с двусторонними метастатическими абсцессами почек, в центре которых находятся скопления микробов, окруженных участками некроза. При интрауретральном заражении наблюдается картина восходящего пиелонефрита с образованием гнойных абсцессов почки и интерстициального нефрита с возможной генерализацией процесса. Гибель животных в зависимости от вида микроорганизма, величины заражающей дозы наблюдается в течение 2–5 суток.

2.3.5. Инфекции, вызываемые патогенными и условно-патогенными энтеробактериями

Большинство экспериментальных животных (белые мыши, крысы, морские свинки, кролики) устойчивы к энтеральному заражению сальмонеллами, шигеллами, эшерихиями и др. В связи с этим для оценки химиотерапевтического действия препаратов в отношении этих микроорганизмов разработаны специальные модели:

– Генерализованная сальмонеллезная септикопиемия белых мышей, развивающаяся при внутрибрюшинном введении суточной культуры *Salmonella typhi*. Гибель 100% животных наблюдается в течение первых двух суток при картине токсемии и бактериемии с высевом сальмонелл из крови, паренхиматозных органов, лимфатических узлов.

– Генерализованная форма сальмонеллезной инфекции (*Salmonella* spp., в том числе *Salmonella typhi*), воспроизводится путем внутрибрюшинного введения белым мышам смыва суточной культуры сальмонелл в смеси с «голодным» агаром (0,4%), в соотношении 1 часть культуры и 4 части агара в объеме 0,5–1 мл. Срок наблюдения за животными 10 дней (гибель 100% животных).

– Брюшнотифозная пневмония с генерализацией. Белых мышей заражают интраназально взвесью суточной культуры сальмонелл в объеме 0,05 мл. Гибель 80–90% животных наблюдается в течение первых 3–4 суток после заражения; гистологически в легких выявляют очаги серозно-геморрагического воспаления, фибринозную экссудацию в плевру; специфическую пролиферацию светлых «тифозных» ретикулярных клеток. В цитоплазме «тифозных» клеток и внеклеточно обнаруживается большое количество сальмонелл.

– Генерализованная дизентерийная инфекция белых мышей воспроизводится внутрибрюшинным введением суспензии суточной культуры шигелл (Шига Флекснера) в 0,5–1 мл изотонического раствора хлорида натрия в смеси с 0,4% «голодным» агаром. Гибель животных в зависимости от вида шигелл и вирулентности штаммов происходит в течение 2–7 сут после заражения, при картине токсикосептицемии.

Дизентерийная пневмония белых мышей — стандартная и хорошо воспроизводимая при интраназальном заражении модель. Клиника заболевания развивается через 2–3 сут после заражения с гибелью животных в эти сроки. Морфологически в легких определяются сливные очаги уплотнения багрово-красного цвета (гнойный бронхит), спавшиеся расширенные легочной артерии лимфатические сосуды (в их просвете наблюдается серозная жидкость с примесью эритроцитов); отмечается полнокровие крупных и мелких вен. В процессе лечения наблюдается положительная динамика изменений в легких, без нормализации тканей.

2.3.6. Экспериментальный менингит и менингоэнцефалит кроликов

Заражение взвесью суточных культур возбудителей производят в большую цистерну мозга (вирулентные штаммы стафилококков, синегнойной палочки, клебсиелл, ассоциации возбудителей и др.). В течение 72–96 ч развивается гнойно-геморрагический (в зависимости от вида возбудителя) менингит или менингоэнцефалит с гибелью животных в течение этого срока. При использовании высоких инфицирующих доз менингоэнцефалит осложняется сепсисом. Клинически заболевание проявляется в повышении температуры, ригидности затылочных мышц, снижении массы тела. Из ликвора высеивается возбудитель; в спинно-мозговой жидкости наблюдается цитоз, высокое содержание белка и др. В оболочках мозга развиваются процессы, типичные для гнойного воспаления. Нелеченные животные погибают при явлениях нарастающей интоксикации. О химиотерапевтическом эффекте судят по показателям: температуре тела у получавших ЛС животных и у контрольных; массе тела животных; динамике развития менингеальных симптомов; числу лейкоцитов в крови и лейкоцитарной формуле крови; количеству белка в спинно-мозговой жидкости; цитозу; патоморфологической картине оболочек, ткани мозга и внутренних органов.

Модель экспериментального менингита кроликов, вызванного интрацестернальным заражением различными возбудителями, приближается по патогенезу к менингиту и менингоэнцефалиту у человека и является достаточно информативной. Картина менингоэнцефалита кроликов развивается значительно медленнее, чем сепсис у мышей, что позволяет оценить динамику лабораторных показателей крови, ликвора, явлений интоксикации у экспериментальных животных в течение длительного времени.

2.3.7. Анаэробные инфекции

Для оценки эффективности препаратов при клостридиальных инфекциях используют модель газовой гангрены, вызываемой различными видами патогенных клостридий (*Clostridium perfringens*, *Clostridium septicum*, *Clostridium histolyticum*, *Clostridium oedematiens* и др.) и микробными ассоциациями. Практически все виды лабораторных животных восприимчивы к заражению клостридиями (белые мыши, молодые крысы массой 35–50 г, морские свинки, кролики, обезьяны). Животных заражают внутримышечно, вводя в предварительно травмированную мышцу бедра суточную культуру клостридий в среде Китт-Тароцци в объеме от 0,05 до 2 мл в зависимости от вида возбудителя и экспериментального животного. При хорошо подобранной заражающей дозе клиническая картина местного и общего процесса у мышей развивается в течение 48–72 ч, у морских свинок — 2–5 дней. Местные морфологические процессы характеризуются некробиозом коллагеновой ткани; скоплением микробов в мышечной ткани; венозным полнокровием, резкими венозными стазами, артериальной ишемией, некрозом стенок кровеносных сосудов. Во внутренних органах и в ткани мозга отмечается развитие дегенеративно-некротических процессов, расстройство кровообращения (особенно выраженное в сердечной мышце).

Основными признаками эффективности испытуемого препарата при экспериментальной газовой гангрене являются уменьшение и исчезновение микробов в пораженных тканях, уменьшение отека, пролиферация соединительной ткани, резорбция некротизированных тканей [5].

2.3.8. Экспериментальный каловый перитонит белых мышей или крыс, вызванный неклостридиальными анаэробами

Является наиболее простой моделью и часто используется при оценке эффективности новых соединений с антианаэробной активностью. Заболевание воспроизводится путем внутрибрюшинного введения 5–10% каловой взвеси в изотоническом растворе хлорида натрия. Гибель животных начинается на 4–5 день после заражения и морфологически проявляется в картине сливного перитонита с многочисленными гнойными абсцессами в паренхиматозных органах, серозным экссудатом в брюшной полости. Эффективность

новых соединений оценивается по показателям предупреждения гибели животных, удлинения сроков выживания, положительной клинической динамики перитонита.

2.3.9. Локализованная гнойная инфекция белых мышей

Для получения локализованных процессов животных заражают внутрикожно, подкожно, в полость суставов, субконъюнктивально, в глаз. Испытуемые препараты применяют местно в виде соответствующих местных лекарственных форм; парентерально или комбинированно (местное и системное применение). Способ лечения определяется поставленными задачами: оценки создаваемой лекарственной формы при установленной химиотерапевтической активности нового соединения; отработки схем терапии при тяжелом течении заболевания.

Изучение химиотерапевтической эффективности нового соединения по расширенному кругу показаний на специальных моделях (туберкулез, микозы, гельминтозы, хламидийная инфекция и др.) проводится на втором этапе, как правило, на крупных животных, с учетом рекомендаций по режимам применения, данных о бактериостатических, бактерицидных свойствах *in vitro* и *in vivo* и др. Оценка эффективности препарата при опасных инфекционных заболеваниях (чума, туляремия, бруцеллез, сибирская язва и др.), при опасных вирусных инфекциях, глубоких микозах и др. проводится в специальных лабораториях, имеющих разрешение на проведение этих работ.

2.4. Порядок исследования

После выявления химиотерапевтической эффективности у нового препарата *in vivo* на этапе первичного скрининга проводят исследование при системных и локализованных инфекциях с определением терапевтических преимуществ нового соединения перед близкими препаратами по химической структуре или по спектру антимикробного действия. При фиксированной заражающей дозе (1 DLM) и на стандартной модели (например, стафилококковой или коли-сепсис) определяется оптимальный способ введения (внутривенно, внутримышечно, внутрь), устанавливаются значения ЭД₅₀–ЭД₁₀₀. Растворы испытуемого соединения для парентерального введения готовят на дистиллированной воде или изотоническом растворе хлорида натрия, нерастворимые — вводят внутрь в виде взвеси в изотоническом растворе хлорида натрия, в 0,5–5% растворе крахмала или в 0,15–0,25% водном растворе агар-агара.

При оптимальном способе введения и оптимальной дозе определяется связь эффективности препарата с тяжестью инфекции (при различных инфицирующих дозах 1 ЛД₅₀, 2–4 ЛД₅₀, 10 ЛД₅₀, 100 ЛД₅₀ и более в зависимости от вида возбудителя). Оценивается эффективность препарата в различные сроки до заражения (3, 6, 12, 24 ч — профилактические режимы) и после заражения (через 1, 3, 6, 12, 24 и 48 ч после заражения — лечебное действие), при различной кратности введения (однократно или повторно в зависимости от модели). Для каждого временного промежутка устанавливается минимальная эффективная доза и доза, обеспечивающая максимальный терапевтический эффект. При выборе первоначальной дозы следует исходить из предполагаемой терапевтической дозы для человека в пересчете на поверхность тела соответствующего вида животного [6]. Последняя доза (субтоксическая) должна обеспечивать 100% защитный эффект. Для удобства статистической обработки разница между двумя последовательными дозами должна отличаться на фиксированную величину или в определенное число раз (0,2, 0,4; 0,6, 0,8 мг и т.д. или в 2 раза 0,2; 0,4; 0,8; 1,6 мг и т.д.). Полученные результаты подвергают математической обработке с расчетом средних величин, стандартного отклонения, стандартной ошибки средней арифметической, доверительного интервала, доверительных границ или вычисления критерия s_2 . Математические методы используются при расчете значений ЕД₅₀ испытуемого препарата, необходимых при оценке эффективности нового соединения по сравнению с известными [7]. Значение ЭД₅₀, установленное в химиотерапевтическом эксперименте, необходимо сопоставить с ЛД₅₀ (средней токсичной дозой

изучаемого соединения для животных при введении внутривенно и внутрь) для определения величины химиотерапевтического индекса. Контроль переносимости в каждом исследовании определяется на интактных и на инфицированных животных.

Для определения эффективности препарата при местном действии готовят лекарственные формы в виде мазей, гелей, эмульсий, суспензий, повязок, специальных стерильных форм для имплантации в раны (пластины, бусы и др.). При сравнительной оценке эффективности соединений исследование проводят, соблюдая равные условия для испытуемого вещества и препарата сравнения.

К каждому варианту исследований ставятся два контроля:

— контроль гибели животных *без лечения* (используемый растворитель вводят в том же объеме и том же способе введения и продолжительности лечения, что и испытуемое соединение);

— контроль эффективности лечения (в сравнении с *известным препаратом* или соединением, наиболее эффективным при данной инфекции).

Длительность наблюдения за животными в зависимости от особенностей течения инфекции может составлять 10–15 дней при острой генерализованной инфекции; 2–3 недели — при восходящем пиелонефрите; 3–5 дней — при каловом перитоните; 15–20 дней — при хронической стафилококковой инфекции и др.

2.5. Оценка эффективности препаратов

Основными параметрами при оценке эффективности нового соединения в химиотерапевтических исследованиях являются:

— сравнительная выживаемость и сроки гибели животных в контрольных и леченых группах животных. Оцениваются различия в смертности (%) контрольных и леченых животных;

— средняя продолжительность жизни отдельного животного или суммарной продолжительности жизни всех животных, входящих в сравниваемые группы. Продолжительность жизни в днях в группе выражают в процентах по отношению к максимально возможной длительности жизни при данном сроке наблюдения. Для корректности выводов о химиотерапевтических свойствах испытуемого соединения на основе данных о выживаемости необходимо проводить исследования на достаточном числе животных в группах (не менее десяти в каждой группе). Воспроизводимость результатов должна быть подтверждена в 2–3 повторных исследованиях;

— динамика освобождения организма экспериментального животного от возбудителя в процессе лечения и по его окончании (проводится посев крови, ткани и органов с определением числа микробов на грамм ткани или жидкости у леченых и нелеченых животных);

— динамика клинических (поведенческие реакции, изменения массы тела, состояние шерстного покрова, температуры тела) и лабораторных (картина крови, спинно-мозговой жидкости и др.) проявлений заболевания. Динамическая оценка патоморфологических изменений органов и тканей в процессе лечения и после его окончания [5].

Результаты исследования во всех вариантах исследований статистически обрабатываются с расчетом средних величин, стандартной ошибки средней, доверительного интервала, доверительных границ. Оценка химиотерапевтической эффективности нового соединения в сравнении с известными препаратами близкой химической структуры или близкими антимикробными свойствами проводится путем сравнения средних эффективных доз ($ЭД_{50}$), средних смертельных доз ($ЛД_{50}$), сопоставления значений химиотерапевтического индекса [5].

На основании оценки химиотерапевтических свойств нового соединения *in vivo* делается заключение о его преимуществах, равнозначности или недостатках по сравнению с известными препаратами (по широте спектра химиотерапевтического действия, по степени стерилизующего эффекта — полная или частичная эрадикация; значительное снижение обсемененности органов, персистенция возбудителя и др.).

Результаты изучения химиотерапевтической эффективности воспроизводимых препаратов оцениваются на их соответствие известным характеристикам для прототипа. Исследования по оценке эффективности новых препаратов при экспериментальных опасных инфекционных заболеваниях, туберкулезе, микозах, при заболеваниях, вызываемых простейшими, гельминтами, проводятся на крупных животных в соответствии со специальными методическими рекомендациями.

Таким образом, наиболее важными отличиями при изучении антимикробной активности и химиотерапевтического действия новых препаратов, известных и воспроизводимых в той или иной лекарственной формах, является объем необходимых исследований *in vitro* и *in vivo*.

С учетом данных, характеризующих основные свойства воспроизводимых препаратов, их оценка осуществляется по укороченной программе.

In vitro она включает сравнительную оценку антимикробной активности на уровне соединения и лекарственной формы (для исключения возможного влияния на степень активности включенных в состав лекарственной формы вспомогательных веществ). В необходимый набор штаммов входят музейные культуры микроорганизмов в пределах спектра действия и уровня чувствительности, характерной для воспроизводимого соединения.

In vivo используются простейшие экспериментальные модели (например, острый сепсис, вызываемый грамположительными и грамотрицательными микроорганизмами, в зависимости от спектра действия прототипа), позволяющие убедиться в идентичности сравниваемых препаратов в одинаковых условиях исследования (пол, масса, линии животных, при работе с линейными животными, одинаковые условия содержания и пищевого режима; идентичные способы и режимы введения ЛП, время начала лечения по отношению к заражению и др.). Как и в случае исследований *in vitro* в химиотерапевтических исследованиях должны оцениваться как воспроизводимая субстанция, так и лекарственная форма.

Спектр исследований при оценке принципиально новых соединений направлен на выявление его кардинальных преимуществ по сравнению с имеющимися в огромной номенклатуре антибактериальными препаратами. Он включает ряд этапов и предусматривает использование комплекса обязательных методов *in vitro* и *in vivo*.

I этап исследований: in vitro устанавливается спектр антимикробного действия соединения на расширенном наборе музейных штаммов грамположительных и грамотрицательных аэробных и анаэробных микроорганизмов различных видов, включая внутриклеточно расположенных (на данном этапе возможно использование только субстанции нового соединения). На *II этапе исследований* используется музейный набор штаммов микроорганизмов международных и национальных коллекций, включающих штаммы с различным набором маркеров, уровней и механизмов антибиотикорезистентности. Каждый вид должен быть представлен 3–4 штаммами при возможности с различными уровнями резистентности (для проблемных возбудителей). Выявление на данном этапе активности нового соединения в отношении множественноустойчивых штаммов является подтверждением новизны структуры и ее перспективности для дальнейшей оценки.

III этап исследований предусматривает изучение антимикробной активности нового соединения в отношении большого набора клинических штаммов микроорганизмов, устойчивых к известным антибиотикам и синтетическим антибактериальным препаратам, включая полирезистентные. Конкретный набор микробных видов определяется установленным на предыдущих этапах спектром действия нового вещества. Из того же исходят и при выборе контрольных препаратов (активных преимущественно в отношении грамположительных или грамотрицательных микроорганизмов при узконаправленном спектре действия отобранного соединения, или набора препаратов широкого спектра действия при соответствующих данных для нового вещества).

Данный этап исследований позволяет исключить наличие перекрестной устойчивости у полирезистентных штаммов к испытываемому соединению и дает возможность с известной долей вероятности судить о степени его новизны.

Исследования *in vitro* обычно проводятся на стадии субстанции испытуемого препарата, однако испытуемый образец должен быть стандартным по основным химическим параметрам и иметь паспорт. На заключительном этапе исследований *in vitro* необходимо провести сравнительную оценку активности субстанции и окончательной прописи лекарственной формы нового вещества в отношении небольшого набора чувствительных штаммов, для исключения возможного отрицательного влияния вспомогательных веществ на антибактериальные свойства испытуемого соединения.

Изучение химиотерапевтической активности (in vivo) отобранного вещества также проходит в ряд этапов. Оценка химиотерапевтической активности новых соединений включает первичный этап исследования при остром сепсисе белых мышей, вызываемом грамотрицательными и/или грамположительными микроорганизмами с учетом установленного спектра действия. На данном этапе определяется доза препарата (минимальная эффективная и максимальная, обеспечивающая 100% защитный эффект), устанавливается оптимальный способ введения, зависимость эффекта от вида возбудителя, величины заражающей дозы, определяется значение ЭД₅₀ и др. Контроль известного препарата подбирается с учетом спектра действия нового, испытуемый препарат используется в виде субстанции — полностью стандартизованный с паспортными данными и лекарственной формой.

На следующем этапе на широком спектре экспериментальных моделей (пневмония, перитонит, менингит, остеомиелит, различные формы раневой и ожоговой инфекций и др., воспроизводимых на белых крысах, морских свинках, кроликах, хомяках) устанавливаются терапевтические возможности испытуемого препарата, определяются оптимальные способы и режимы введения, выявляется возможность его использования в профилактических и терапевтических режимах. Оптимальные способы и режимы введения определяются с учетом физико-химических, фармакодинамических, фармакокинетических свойств препарата. (Методы изучения токсичности фармакологических, фармакокинетических и фармакодинамических свойств новых соединений изложены в соответствующих методических рекомендациях.) Задачей данного этапа исследования является определение круга показаний, способа/способов введения, ориентировочных режимов лечения. Испытуемый препарат используется в виде стандартной лекарственной формы.

На заключительном этапе оценки химиотерапевтического действия лекарственная форма нового соединения изучается на моделях (патогенетически и по развивающему синдрому) комплексу, близких клиническому течению заболевания человека: бактериальный эндокардит, туберкулезный менингит, опасные инфекционные заболевания, глубокие микозы и др., воспроизводимые на собаках, обезьянах, кроликах, хомяках и др. (исследования проводятся в специализированных учреждениях). Полученные результаты в предыдущих сериях исследований и на данном этапе используются для разработки программы КИ нового соединения у больных.

3. Требования к отчетным материалам

Отчетные материалы по всему объему проведенных исследований должны состоять из двух основных разделов:

1. Результаты изучения противомикробной активности и спектра действия новых препаратов *in vitro* в сравнении с известными ЛС близкой химической структуры или аналогичного спектра действия.

2. Результаты изучения химиотерапевтического действия оригинальных соединений или воспроизводимых препаратов на экспериментальных моделях инфекций.

В каждом разделе должны быть представлены сравнительные, статистически обработанные данные, позволяющие оценить преимущества нового препарата перед существующими антибиотиками той же химической группы или применяющимися по тем же показаниям. Для воспроизведенного препарата доказывается его идентичность с прототипом по данным изучения спектра и степени противомикробной активности.

Заключение

По результатам комплексного изучения биологических свойств нового антибиотика или синтетического антимикробного препарата разрабатывается программа КИ или программа изучения биоэквивалентности воспроизводимых ЛП, или терапевтической эквивалентности.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Навашин С.М., Фомина И.П., Лобусева А.Н., Самойлова Л.Н. и др. Методические рекомендации по экспериментальному и клиническому изучению, оценке антимикробной активности и переносимости новых антибиотиков и химиопрепаратов для экстренной профилактики и этиотропного лечения опасных инфекционных заболеваний и раневой инфекции. — Москва, 1989.
2. Скала Л.З., Сидоренко С.В., Нехорошева А.Г., Резван С.П., Карп В.П. Практические аспекты современной клинической микробиологии. — М.: ТОО «Лабинфарм», 1997. — С. 76–93.
3. Навашин С.М., Фомина И.П. Рациональная антибиотикотерапия (справочник), 4-е изд. — М.: Медицина, 1982. — 496 с.
4. Essential Procedures for Clinical Microbiology. Ed H D Isenberg ASM Press USA. 1998, 693–731.
5. Першин Г.Н. Экспериментальная химиотерапия. Изд. второе. — М.: Медицина, 1982. — С. 5–12, 100–192, 507–523.
6. Гуськова Т.А. Ведомости Фармакологического Комитета. 1999, 1.
7. Соловьев В.Н., Фишман В.М. Хим.-фарм. ж., 1971, 1, 55–57.

Приложение

Определение антибактериальной активности и спектра антимикробного действия антибиотиков и химиопрепаратов [1]

Таблица 1

Этап исследования	Микроорганизм	Число штаммов	Характеристика штаммов	Метод изучения	Рекомендуемые питательные среды	Величина посевной дозы (микробных клеток/мл)	Т-инкубация и сроки учета результатов
I	Staphylococcus aureus Streptococcus pyogenes ^{3*} Streptococcus faecalis ^{3*} Bacillus subtilis Escherichia coli Providencia stuartii Providencia pneumoniae Pseudomonas aeruginosa Proteus vulgaris Salmonella typhi Shigella flexneri Haemophilus influenzae	1–2	Штаммы эталонные (международных коллекций), штаммы свежeweделенные; генетически измененные (множественноантибиотикоустойчивые)	Метод диффузии в агар, испытываемые в ва вносятся в «лунки» в агаре	Среды на переваре Хотингера (33 мг %-аминного азота, рН 7,0) Синтетическая среда для химиопрепаратов состава: глюкоза – 2 г NaCl – 5г (NH ₄) ₂ SO ₄ – 5 г KH ₂ PO ₄ – 3 г желатина – 3 г никотиновая кислота – 0,01 г на 1 л дистиллированной воды рН 7,2	1 мл – 10 ⁸ суточной культуры на 100 мл растопленного и охлажденного до 50° агара, 3×10 ⁴ микробных клеток на 1 мл	37 °С, 18 часов
I–II	Staphylococcus aureus Streptococcus pneumoniae ^{3*} Streptococcus pyogenes (гр. А ^{3*}) Streptococcus faecalis ^{3*} Escherichia coli ^{6*,7*} Enterobacter spp. Citrobacter spp. ^{6*} Haemophilus influenzae ^{3*,3*} Klebsiella pneumoniae ^{7*} Pseudomonas stutzeri Pseudomonas aeruginosa ^{5*} Pseudomonas fluorescens Proteus mirabilis ^{6*} Proteus vulgaris Shigella spp. ^{7*}	4–5		Метод двукратных серийных разведений в жидкой и плотной питательной среде	Мясопептонный бульон или 25-х мясопептонный агар рН 7,2–7,4, для микробов, хорошо растущих на обычных средах; среды с добавлением крови, глюкозы и др. для микробов, нуждающихся в специфических добавках	10 ⁵ микробных клеток/мл ^{2*}	37 °С, 18 ч, 48–72 часа при учете результатов активности в отношении устойчивых штаммов, характеризующихся замедленным ростом

Этап исследования	Микроорганизм	Число штаммов	Характеристика штаммов	Метод изучения	Рекомендуемые питательные среды	Величина посевной дозы (микробных клеток/мл)	Т-инкубация и сроки учета результатов
	Salmonella typhi ^{7*} Salmonella enteritidis Serratia marcescens Bacteroides spp. ^{4*} Clostridium spp. ^{3*} Arizona spp. Haflia spp.						

Примечание:

I) Этап первичной оценки антибактериальной активности препаратов антибиотиков или индивидуального вещества

II) Этап оценки антибактериального спектра персептивных веществ

^{*)} Необходимость стандартизации по содержанию Mg⁺⁺ (не более 20-35 мкг/ более 50-100 мкг/мл) и др. 2-валентных ионов при определении чувствительности к аминогликозидам и тетрациклинам

^{2*)} При определении антибактериальной активности антибиотиков, имеющих бета-лактаминаю структуру используют ряд посевных доз — 10³, 10⁵, 10⁹ КОЕ/мл

^{3*)} Микроорганизмы, растущие на специальных питательных средах

^{4*)} Микроорганизмы, требующие специальных условий культивирования

^{5*)} В том числе штаммы, устойчивые к гентамицину; амикацину

^{6*)} В том числе штаммы, устойчивые к ампициллину, цефалоспорином I-II поколений

^{7*)} Множественноустойчивые штаммы с устойчивостью к большинству групп антибиотиков и химиопрепаратов

Наборы национальных эталонных международных штаммов клинических штаммов микроорганизмов различных видов из коллекции NCCCLS (Laboratory National Committee for Clinical and Standards) США со статусом музейных, можно получить из коллекции Государственного научного центра по антибиотикам.

Таблица 2
Определение чувствительности возбудителей опасных инфекционных заболеваний к новым антибиотикам и химиопрепаратам

Микро-организм	Число штаммов	Характеристика штаммов	Метод изучения	Рекомендуемые питательные среды	Величина посевной дозы	Температура инкубации и сроки учета результатов
Yersinia pestis	25	а) штаммы эталонные; б) природные со стабильной вирулентностью; в) свежевыделенные; г) генетически измененные	Метод двукратных серийных разведений в жидкой или плотной питательной среде	агар или бульон Хоттингера, рН 7,2–7,4	10 ⁵ , 10 ⁸ микробных клеток/мл	28 °С при определении МПК – в течение 2-х суток, МБК – 5 суток

Микро-организм	Число штаммов	Характеристика штаммов	Метод изучения	Рекомендуемые питательные среды	Величина посевной дозы	Температура инкубации и сроки учета результатов
<i>Bacillus anthracis</i>	25			агар или бульон Хоттингера; рН 7,2–7,4	10^6 , 10^7 спор/мл	37 °С при определении МПК – 24 ч, МБК – 5 суток
<i>Pseudomonas mallei</i>	10	а) штаммы эталонные б) природные со стабильной вирулентностью		МПА и МПБ + 5% глицерин, Дуриа-агар рН 6,8–7,0	10^4 , 10^8 микробных клеток/мл	37°С при определении МПК – 24 ч, МБК – 5 суток
<i>Burkholderia pseudomallei</i>	20			возможно применение дрожжевого или казеинового агара и бульона рН 6,8–7,0	10^4 – 10^5 микробных клеток/мл	
<i>Rickettsia prowazekii</i>	1	штамм Брейнль	Риккетсии смешиваются с различными концентрациями препарата и вводятся в желточный мешок 6–7-дневного эмбриона или в культуру фибро-бластов куриного эмбриона	куриные эмбрионы, культура клеток, вши	10^4 – 10^5 ИД/эмбрион 50	а) 6–7-дневные эмбрионы куриные инкубируют при 36–37°С 10–12 дней, оценка после 1–2 слепых пассажей б) культура клеток, 5 суток, 37 °С
<i>Coxiella burnetii</i>	1	штамм Грига		куриные эмбрионы, культура клеток, вши		
<i>Brucella</i> spp	10	а) эталонные б) свежесывделенные штаммы	метод двукратных серийных разведений в полужидком агаре (2%)	агар Альбيني рН 7,0–7,2	10^5 – 10^7 микробных клеток/мл	37 °С определение МПК – 2 суток и МБК – 10 суток
<i>Francisella tularensis</i>	10	а) эталонные (Евроазиатский и Американский варианты) б) свежесывделенные в) генетически измененные	метод двукратных серийных разведений в плотной питательной среде	рыбно-дрожжевой агар с 10% свежей дефибринированной крови	2×10^6 микробных клеток/мл	37 °С определение МПК – 2 суток и МБК – 10 суток

ГЛАВА 32

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ПРОТИВОВИРУСНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: академик РАМН, проф. Ф.И. Ершов; д. б. н. Э.Б. Тазулахова;
д. б. н. А.Н. Наровлянский, д. м. н. А.Н. Миронов; д. м. н., проф. В.А. Меркулов;
д. б. н. И.А. Ленева; к. м. н. Т.П. Оспельникова; к. б. н. А.Н. Васильев*

Введение

Проблема поиска эффективных противовирусных препаратов обусловлена высокой заболеваемостью и широкой распространенностью вирусных инфекций, сопровождающихся частым развитием затяжных и хронических форм, тяжелыми последствиями, особенно для групп риска (дети раннего возраста и люди преклонного возраста).

Несмотря на интенсивный скрининг, проводимый во всем мире, до сих пор число этиотропных противовирусных препаратов при подавляющем большинстве инфекций весьма ограничено, а при некоторых инфекционных заболеваниях их просто нет. В значительной степени это объясняется особенностями паразитизма вирусов, поражающих геном клетки. С этим связано важное требование к поиску противовирусных препаратов, которые должны либо непосредственно воздействовать на сам вирус, не повреждая клетки, в которых он паразитирует, либо обладать способностью активации выработки эндогенного интерферона. Все это определяет трудности поиска препаратов, эффективных в условиях организма (*in vivo*), хотя в экспериментальных условиях (*in vitro*) многие вещества нередко могут вызвать прямое ингибирующее действие на внеклеточный вирус.

Традиционные методы первичного исследования противовирусной активности веществ были разработаны к началу 60-х годов, затем они были усовершенствованы и к настоящему времени могут считаться вполне информативными. Между тем анализ современной литературы свидетельствует о том, что методы и схемы оценки противовирусных препаратов, используемых исследователями, различны, что приводит к несопоставимым, а порой и противоречивым результатам. Это обстоятельство определяет необходимость разработки системы стандартных методов и схем оценки для отбора потенциальных противовирусных препаратов как средств профилактики и лечения вирусных инфекций.

Начальным этапом изучения противовирусных препаратов является первичный отбор (скрининг), который должен быть высоко производительным, простым и доступным для каждой вирусологической лаборатории. Он состоит из двух этапов: исследования *in vitro* — в культуре клеток и *in vivo* — на лабораторных животных.

1. Методы исследования противовирусных препаратов в культуре клеток

Первичный отбор препаратов следует начинать с исследований отобранных веществ синтетического или природного происхождения в культуре клеток.

Оценка антивирусной активности препаратов сводится к контролю репродукции вируса. Ниже кратко описаны основные методы, применяемые для определения ингибции инфекционной активности вирусов:

1) микрометод; 2) определение цитопатогенного действия (ЦПД); 3) метод флуоресцирующих антител (МФА); 4) метод ингибции бляшкообразования; 5) реакция

гемагглютинации; 6) реакция гемадсорбции; 7) радиоизотопный метод; 8) радиоиммунный анализ (РИА); 9) реакция иммунофлюоресценции (РИФ); 10) метод иммуноферментного анализа (ИФА); 11) молекулярные методы (молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот, полимеразная цепная реакция (ПЦР), ПЦР в реальном времени); 12) методы электронной микроскопии; 13) оценка противовирусного действия препаратов *in vitro*.

1.1. Микрометод

Оптимизация методов первичного отбора противовирусных препаратов в культуре клеток развивалась по линии создания систем, позволяющих одновременно оценивать большое количество соединений. Прогрессивным методом этого плана исследований следует считать микрометод, являющийся экономичным и довольно простым [3, 27]. По этому методу культуру клеток выращивают в пластиковых панелях с 96 лунками, в каждую из которых вносят по 0,1 мл вирусосодержащей суспензии и затем — по 0,1 мл поддерживающей среды, содержащей исследуемые вещества с кратностью разведения 1:2, начиная с концентрации 1000 мкг/мл. Через 48–72 ч (сроки максимального накопления вируса) культуру клеток микроскопируют для определения титра по ЦПД и вычисления индекса селективности препаратов.

В качестве второго критерия оценки можно использовать вычисление титра в надосадочной жидкости. Представленный метод является чувствительным и позволяет проводить одновременное исследование большого количества соединений (4 препарата на панель) при минимальном расходе питательных сред и изучаемых веществ.

С помощью микрометода можно оценить одновременно цитотоксические и противовирусные свойства вещества, во-первых, по степени ингибции вирусспецифического ЦПД, во-вторых, по снижению 50% ингибирующей дозы и, в-третьих, по степени ингибции микроблишкообразования [34].

1.2. Определение цитопатогенного действия

Большинство вирусов (покс-, герпес-, микс-, парамиксо-, тогавирусы и др.) вызывают четко выраженный цитопатогенный эффект в перевиваемых и первично-трипсицинизированных клетках человеческого и животного происхождения. Описано множество методик оценки вирусингибирующего действия химиопрепаратов с использованием этого теста при выращивании клеток в пробирках, на матрасах и пластиковых панелях. Последние получили наиболее широкое распространение, так как позволяют использовать культуру клеток в микрообъемах и оценивать одновременно большое количество соединений при минимальном расходе питательных сред и изучаемых веществ. Микрометоды оценки противовирусных препаратов на основе ЦПД используют для исследования вирусов полио-, адено-, герпеса, везикулярного стоматита и др.

Суть этих методов заключается в предварительной обработке 24-часовой культуры клеток, выращенных в 96-луночных пластиковых панелях, разными концентрациями исследуемого препарата за 24 ч до заражения различными дозами соответствующего вируса. Учет результатов производят при полном развитии ЦПД (деструкции клеток) в контроле. Положительным считают результат, при котором отмечается 50% подавление размножения вируса по сравнению с контролем.

1.3. Метод флуоресцирующих антител

Метод флуоресцирующих антител (МФА) используют в лабораторной практике по отбору вирусных ингибиторов в культуре клеток значительно реже, чем метод на основе ЦПД вирусов. Следует отметить, что этот метод имеет несколько вариантов, применяют как прямой, так и непрямой МФА. Эффективность препарата может быть оценена по сравнительной интенсивности свечения в клетках экспериментальной и контрольной групп в течение одного цикла репродукции вируса, по подсчету количества светящихся

или инфицированных клеток (%) в присутствии препарата и без него [36], по определению титра вируса.

МФА для первичного исследования противовирусных средств в культуре клеток, в основе которой лежит определение титра вируса, включает 2 этапа: 1-й этап (МФА-1) — предварительное определение подавляющего эффекта с одновременной оценкой токсичности соединений для культур клеток, 2-й этап (МФА-2) — определение действия активных соединений на накопление вируса в культуре клеток (26).

1-й этап. Оценка токсичности и предварительное изучение вирусингибирующего действия соединений проводятся одновременно, что позволяет экономить время, материалы и получать результаты уже после первого исследования. Для проведения такого исследования берут не менее трех концентраций препарата с 10-кратными разведениями и на каждую дозу — три конечных разведения вируса (с учетом его титра). Обычно используют перевиваемые линии клеток (СПЭВ, ВНК-21 и др.), которые выращивают на покровных стеклах в пробирках или в микропланшетах. Исследуемый вирус вносят в культуру клеток и помещают на 50–60 мин в термостат при 37 °С. Затем инокулят удаляют, клетки трижды отмывают от неадсорбированного вируса и в пробирки заливают поддерживающую среду, содержащую препараты в различных концентрациях. Так, если исследуемый химиопрепарат в концентрации 1000 мкг/мл оказывает цитотоксическое действие (ЦТД) на клетки, по данным прижизненного морфологического исследования, то снижение его дозы в 10 раз может не только не оказать на клетки токсического действия, но и привести к снижению титра вируса на 1,0 lg.

Достоинством данного метода является одновременная оценка токсичности и предварительное изучение вирусингибирующего действия соединений. Причем следует подчеркнуть, что токсическое влияние препарата изучается на инфицированной культуре клеток. Инфекционный титр вируса определяют через 48 ч после заражения клеток вирусом и выражают в ТЦД₅₀/мл. Репродукцию вируса учитывают с помощью прямого МФА с контрастированием фона. Приготовление препаратов для люминесцентной микроскопии проводят по общепринятой методике [30]. Концентрации препарата, оказывающие повреждающее действие на клетки, по данным прижизненного морфологического исследования (ЦТД), оценивают как токсические. Максимально переносимой концентрацией препарата (МПК), нетоксичной для клеток, обычно считают 1/2 от концентрации, не оказывающей ЦТД. Минимально эффективная вирусингибирующая концентрация (МЭК) — это концентрация препарата, снижающая титр вируса не менее чем на 1,5 lg (26). Инфекционный титр вируса определяют с помощью МФА по 4-крестовой системе и выражают в ТЦД₅₀/мл [36]. Вирусингибирующий эффект оценивают по снижению титра вируса препаратами и степени (%) подавления.

Препараты, проявляющие вирусингибирующее действие (не менее 95%), подлежат дальнейшему изучению в культуре клеток для определения их влияния на накопление вируса.

2-й этап. Используют «пристеночную» культуру клеток, выращенную в пробирках. Методика инфицирования клеток и введения препаратов не отличается от описанной выше. Концентрации препаратов колеблются от МПК и ниже с двукратным шагом. Для каждой инфицирующей дозы вируса используют не менее 4 пробирок. Через 48 ч инкубации клетки разрушают трехкратным замораживанием и оттаиванием, содержимое пробирок объединяют по группам и титруют по МФА для определения концентрации репродуцированного возбудителя. Вирусингибирующий эффект оценивают по кратности снижения титра вируса в экспериментальной группе по сравнению с контрольной. Одновременно определяют ХТИ препарата.

Описанная методика оценки вирусингибирующего действия химиопрепаратов с использованием МФА является весьма чувствительным тестом при первичном отборе и исследовании противовирусных средств. Этот метод позволяет проводить количественную оценку противовирусной активности соединений с получением достоверных результатов.

1.4. Метод ингибции бляшкообразования

Наибольшее распространение при оценке противовирусного действия химиопрепаратов в культуре клеток получил метод подавления бляшкообразования. Основным методом для первичного исследования антивирусных свойств химиопрепаратов в культуре клеток является скрининг-тест. Этот метод обеспечивает большую пропускную способность. В основе метода лежит одна из наиболее точных и признанных методик количественного определения вирусов — методика подавления бляшкообразования. Использование этого метода получило особенно широкое распространение в последние годы, когда были разработаны условия для получения бляшек большинства вирусов. Существуют различные модификации этого метода.

В настоящее время получение высокоочищенных ингредиентов, входящих в состав питательного покрытия, а также новых культур клеток позволяет проводить культивирование практически всех известных вирусов. Агар-диффузионный скрининг-тест предполагает изучение соединений в широком диапазоне концентраций.

После формирования клеточного монослоя во флаконах или в чашках Петри ростовую среду удаляют, клетки промывают и инфицируют в течение часа в термостате, после чего инфицирующий инокулят удаляют и монослой заливают средой (содержащей испытуемый препарат или не содержащей), соединенной с агаром. После застывания агара флаконы переворачивают так, чтобы слой агара находился сверху, и помещают в термостат при 36 °С. На 3 день инкубации во флаконы добавляют второе агаровое покрытие, содержащее нейтральный краситель в разведении 1:1000. Флаконы с застывшим вторым слоем агара снова помещают в термостат. Через 3–20 ч (в зависимости от скорости репликации вируса в клетках) проводят учет количества бляшек в опытных и контрольных флаконах.

Оценка результатов исследования может быть проведена путем сравнения подсчитанного количества бляшек в опытных и контрольных чашках (флаконах).

1.5. Реакция гемагглютинации

Реакция гемагглютинации (РГА) основана на способности некоторых вирусов (ортомиксо-, парамиксо- флави-, тогавирусы и др.) агглютинировать эритроциты ряда животных. Данную реакцию используют для оценки противовирусного действия препаратов в отношении вирусов, обладающих гемагглютинирующей активностью. При использовании этого теста надо иметь в виду, что не всегда торможение РГА коррелирует со способностью препарата подавлять инфекционную активность вируса.

1.6. Реакция гемадсорбции

Реакция гемадсорбции основана на способности культур клеток, зараженных вирусом, адсорбировать на своей поверхности эритроциты и является наиболее чувствительной для ортомиксо- и парамиксовирусов. Вирусингибирующий эффект препаратов оценивают по уменьшению количества гемадсорбированных клеток в экспериментальной группе по сравнению с контролем. В качестве примера можно привести использование подавления гемадсорбции вируса гриппа А для оценки эффективности амантадина, ремантадина, рибавирина и 2-дезоксидео-Д-глюкозы. Описано использование метода гемадсорбции для оценки других антивирусных препаратов в отношении некоторых ортомиксовирусов.

1.7. Радиоизотопный метод

Ускоренный метод оценки противовирусной активности соединений в культуре клеток, который основан на определении синтеза нуклеиновых кислот по включению меченых предшественников: ³Н-уридина (РНК) и ³Н-тимидина (ДНК), является высокопроизводительным и позволяет одновременно оценивать большое количество веществ (100 проб за 3 ч). По мнению исследователей, данный метод более чувствителен, чем

скрининг-тест редукции бляшек. Вместе с тем следует подчеркнуть, что обязательным условием этого метода является использование культур клеток, свободных от микоплазм, которые разрушают аденин и уридин.

1.8. Радиоиммунный анализ (РИА)

Метод основан на метке антител радиоизотопами, что обеспечивает высокую чувствительность в определении вирусного антигена. Широкое распространение получил этот метод в 80-е годы, особенно для определения маркеров HBV и других некультивируемых вирусов. К недостаткам этого метода относится необходимость работы с радиоактивными веществами и использование дорогостоящего оборудования (гамма-счетчиков).

1.9. Реакция иммунофлюоресценции (РИФ)

Метод основан на использовании антител, связанных с красителем, например изотиоцианатом флюоресцеина. На практике применяют 2 варианта РИФ: прямой и непрямой.

При прямом методе РИФ применяют меченые красителем антитела к вирусам, которые наносят непосредственно на инфицированные клетки (мазок). Реакция таким образом протекает одноэтапно.

При непрямом варианте РИФ на исследуемый материал наносят специфическую сыворотку, антитела которой связываются с вирусным антигеном, находящимся в исследуемом материале, а затем наслаивают антивидовую сыворотку к гамма-глобулинам животного, из которого получали специфическую иммунную антисыворотку. Преимущество непрямого метода состоит в потребности лишь одного вида меченых антител.

1.10. Метод иммуноферментного анализа (ИФА)

Принцип иммуноферментного анализа (ИФА) основан на выявлении комплекса антиген–антитело с помощью фермента (пероксидаза, щелочная фосфатаза и др.). Для изучения активности химических соединений или противовирусных препаратов в культуре клеток используют модифицированный ИФА, который позволяет выявить уровень экспрессии вирусных антигенов (вирусных белков) на поверхности клеток в опытных и контрольных пробах. Использование метода ИФА, модифицированного для оценки противовирусной активности соединений в культуре клеток, позволяет проводить эксперименты быстро, получать количественные, объективные и хорошо воспроизводимые результаты. К неоспоримым преимуществам этого метода относится и то, что 96-луночный формат планшета позволяет исследовать большое число соединений одновременно, используя их в малом количестве. Применение ИФА позволяет уменьшить количество сред, клеток и самого тестируемого соединения примерно в 10–100 раз по сравнению с определением противовирусной активности с применением методов ингибирования БОА или ЦПД.

Клетки рассаживают в 96-луночные планшеты для культивирования клеток с плоским дном и выращивают до полного монослоя в соответствующей среде с сывороткой. Перед заражением вирусом клетки 2 раза промывают средой без сыворотки, далее исследуемые соединения добавляют к клеткам в 2-кратной концентрации. Часть лунок используют для контроля вируса и клеток. После инкубации клеток с исследуемыми препаратами в течение 2 ч при 37 °С в лунки, исключая клеточный контроль, добавляют вирус, разведенный на используемой среде, при этом множественность заражения должна составлять приблизительно от 0,1 до 10 ТЦИД₅₀ на клетку в зависимости от условий эксперимента. Планшеты инкубируют в течение 17–24 ч в зависимости от вируса и условий эксперимента в атмосфере 5% CO₂ при 37 °С. После этого клетки планшета просматривают под инвертированным микроскопом, чтобы убедиться в отсутствии в них цитотоксических и цитопатических изменений. Далее среду удаляют, клетки фиксируют, хорошо высушивают и отмывают 3 раза фосфатным буфером с 0,05% Твин-20. Все дальнейшие процедуры проводят в соответствии

с техникой постановки ИФА для выявления антигена, разработанного для соответствующего вируса. По окончании реакции на спектрофотометре для измерения оптического поглощения в 96-луночных планшетах проводят измерение оптической плотности (ОП) каждой лунки при длине волны 492 нм или 450 нм при использовании в качестве хромогенов ортофенилендиамина или 3-3'-5-5'-тетраметилбензидина соответственно. Значение ОП в контроле клеток не должно превышать 0,2, а значение ОП вирусного контроля должно превышать значение ОП контроля клеток не менее чем в 4–5 раз. Процент ингибирования вирусной репродукции изучаемым соединением определяют по формуле:

$$\text{Ингибирование, \%} = \frac{100 - (\text{ОП}_{\text{опыт}} - \text{ОП}_{\text{кл. контроль}})}{(\text{ОП}_{\text{вир. контроль}} - \text{ОП}_{\text{кл. контроль}})}$$

Для одной точки опыта используют 3 или 4 лунки планшета, из которых определяют среднее значение, при этом отклонения значения ОП каждой из точек от него не должны составлять больше 10–15%. Концентрация препарата или соединения, уменьшающая значение величины ОП на 50%, принимается за ингибирующую концентрацию 50 (ИК₅₀).

1.11. Молекулярные методы

Классическим методом выявления вирусного генома считался высокоспецифичный метод гибридизации НК. Однако в настоящее время все шире используется выделение геномов вируса с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот. Метод основан на гибридизации комплементарных нитей ДНК или РНК с образованием двунитиевых структур и на выявлении с их помощью изотопной метки. Для этой цели используют специальные ДНК- или РНК-зонды, меченые изотопом (³²P) или биотином, которые обнаруживают комплементарные нити ДНК или РНК.

Существуют несколько вариантов метода:

Точечная гибридизация. Выделенную и денатурированную НК наносят на фильтры и затем добавляют меченый зонд. Индикация результатов учитывается с помощью ауторадиографии при использовании ³²P или окрашиванием при авидин-биоти́не.

Блот-гибридизация. Выделение фрагментов НК, нарезанных рестрикционными эндонуклеазами из суммарной ДНК. Фрагменты переносят на нитроцеллюлозные фильтры и тестируют с помощью меченых зондов.

Гибридизация *in situ* позволяет определять НК в инфицированных клетках.

ПЦР. Идея ПЦР основана на принципе естественной репликации ДНК (ген можно размножить в пробирке, увеличивая количество копий в миллионы раз).

Суть метода заключается в многократном повторении циклов синтеза (амплификации) вирусспецифической последовательности ДНК. Для проведения ПЦР нужны пара специфических олигонуклеотидов (праймеров), комплементарных исследуемому фрагменту и фермент (термостабильная ДНК-полимераза). В определенных условиях праймеры способны распознавать гомологичные последовательности в денатурированной ДНК, связываться с ними и служить затравкой для ферментативного синтеза копий участка изучаемого гена.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различным температурным режимом.

Первая стадия – выделение ДНК (РНК) из образца. На данной стадии, которая осуществляется при температуре 94°C, образец подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, денатурация НК (удаление белковых и полисахаридных фракций) и получение раствора НК, свободной от примеси ингибиторов и готовой для дальнейшей амплификации.

На **второй стадии** два олигонуклеотидных праймера, строго специфичных (гомологичных) к определенным участкам антипараллельных цепей исследуемой ДНК, свя-

зываются (образуют гибриды с помощью водородных связей) с этими участками ДНК (стадия отжига).

На **третьей стадии**, протекающей при температуре 70–72°С с участием термофильной ДНК-полимеразы и дезоксинуклеозид-5-трифосфатов, происходит синтез новых цепей ДНК. Инициация синтеза ДНК происходит в местах связывания олигонуклеотидов (праймеров) с исследуемой ДНК. Матрицей для синтеза служат исходные цепи ДНК (стадия полимеризации).

В каждом цикле удваивается число копий синтезируемого участка. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации, что позволяет за 25–30 циклов накопить достаточное количество копий выбранного участка ДНК для ее определения. Количество исходной ДНК увеличивается в миллион и более раз.

В большинстве методик на третьем этапе производится разделение смеси продуктов амплификации, полученной на второй стадии, **методом горизонтального электрофореза в агарозном или полиакриламидном геле**. До проведения электрофоретического разделения к амплификационной смеси добавляют раствор бромистого этидия, образующий прочные соединения с двуцепочечными фрагментами ДНК. Под действием УФ-облучения эти соединения способны флюоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в геле. Специфичность полосы подтверждается ее положением (размерами) по отношению к маркерным фрагментам и положительному ДНК-контролю. Дополнительные доказательства специфичности ампликона получают методами рестрикционного анализа, гибридизации и прямого секвенирования.

Метод высокоточен и очень чувствителен. Он позволяет обнаружить несколько копий вирусной ДНК (РНК) в исследуемом материале.

Для повышения специфичности и чувствительности анализа в некоторых методиках используют метод «гнездой» (nested) ПЦР, в котором используют 2 пары праймеров («внешние» — для 1 стадии и «внутренние» — для второй стадии).

ПЦР-анализ РНК-содержащего инфекционного материала. Для ПЦР-анализа РНК-содержащего материала (например ВГС, ВКЭ) предварительно проводят стадию обратной транскрипции — получение ДНК, комплементарной РНК-матрице, для чего используют специфические праймеры к РНК и фермент — РНК-зависимую ДНК полимеразу (обратную транскриптазу, ревертазу). Далее ПЦР-анализ проводят по схеме, описанной выше.

В настоящее время в практическое здравоохранение внедряется новая технология ПЦР — **ПЦР в реальном времени (Real-Time PCR)**. Принципиальной особенностью данного метода является мониторинг и количественный анализ накопления продуктов ПЦР и автоматическая регистрация и интерпретация полученных результатов. Этот метод не требует стадии электрофореза, что позволяет снизить требования, предъявляемые к ПЦР-лаборатории.

1.12. Метод электронной микроскопии

Электронную микроскопию (ЭМ) используют для изучения механизма противовирусного действия соединений. С помощью этого метода можно обнаружить собственно вирус. Для успешного определения концентрации возбудителя в пробе должна быть примерно 1×10^6 частиц в 1 мл. Поскольку, как правило, концентрация вируса в исследуемом материале значительно ниже, идентификация возбудителя требует предварительного его осаждения при помощи высокоскоростного центрифугирования с последующим негативным контрастированием.

Метод ЭМ дает неполное представление о цикле репродукции вирусов, особенно ранних этапов (эклипс-фаза, синтез ранних вирусспецифических ферментов и др.), которые протекают без существенного изменения ультраструктуры инфицированных клеток.

Кроме того, данный метод не позволяет типировать вирусы ввиду отсутствия морфологических различий у многих представителей внутри семейства.

Более перспективным представляется использование иммунной ЭМ, которая позволяет обнаруживать появление ранних антигенов, а также антигены на клеточной поверхности и вирусспецифические рецепторные структуры. При этом методе применяются специфические антитела к вирусам, в результате чего образуются комплексы, которые после легче обнаруживаются после негативного контрастирования.

Недостатком методов ЭМ является то, что они требуют сложного технического оснащения и их использование при проведении первичного отбора проблематично.

2. Критерии оценки противовирусного действия химиопрепаратов в культуре клеток

При проведении исследований по отбору противовирусных препаратов важна адекватность критериев оценки. Такие критерии применимы к исследованиям на культуре клеток: 1) при проведении первичного отбора и 2) при оценке избирательности противовирусного действия. Применение культур клеток является наиболее дешевым и быстрым методом оценки противовирусной активности соединений.

На 1-м этапе первичного отбора соединения подразделяют на активные и неактивные.

Вещества, проявившие активность на 1-м этапе, дополнительно изучают по следующим показателям: снижение инфекционного титра, подавление репродукции вируса в условиях одноциклового исследования, величина ХТИ.

Основным критерием при изучении специфического противовирусного действия соединений является показатель ХТИ, определяемый отношением среднетоксичной концентрации вещества (TK_{50}) к среднеэффективной вирусингибирующей концентрации ($ЭК_{50}$).

Величина ХТИ наиболее достоверно характеризует специфическую противовирусную активность исследуемого вещества. Исследование вирусингибирующей активности соединений показало, что наиболее однородной является группа веществ, ХТИ которых равен 8 и более.

Оптимальный срок контакта изучаемого соединения с культурой клеток при определении МПК соответствует периоду максимального функционирования клеточных культур (в среднем 4 сут) [33]. Выраженную активность проявляют соединения, у которых снижение титра вируса при действии МПК вещества составляет не менее 2,0 lg, подавление репродукции вируса в условиях одноциклового исследования — на 1,25–2,0 lg и ХТИ 8 и больше. Эти соединения можно считать перспективными для дальнейших исследований в исследованиях на животных [4, 7].

3. Система оценки противовирусного действия веществ в культуре клеток

Система оценки противовирусного действия соединений включает 3 последовательных этапа, когда вещества, проявившие активность на 1-м этапе, изучают на 2-м и т. д. Для 1-го этапа рекомендуются скрининг-тест и МФА-1, которые позволяют одновременно оценить пороговую токсическую дозу вещества и первичный ингибирующий эффект.

Избирательность противовирусного действия устанавливают на 2-м этапе. Метод торможения (редукции бляшек) позволяет дать количественную оценку с расчетом титра вируса. Снижение титра вируса можно определить также по ЦПД и МФА-2. 2-й этап предполагает изучение вирусингибирующего действия соединений одним из указанных методов в условиях многоциклового исследования. При одном цикле репродукции вируса исследуется действие препарата на разные стадии репродукции вируса (3-й этап).

Следовательно, использование культур клеток позволяет достаточно быстро и с большой достоверностью оценить противовирусную активность веществ. Результаты этого этапа исследований позволяют говорить о перспективной значимости исследуемого вещества и необходимости его исследования на лабораторных животных.

4. Исследование противовирусного действия веществ при экспериментальных вирусных инфекциях на животных

Следующим этапом изучения противовирусного действия соединения, оказавшегося эффективным в культуре клеток, является экспериментальная его оценка при инфекциях у животных. Корреляция между вирусингибирующей активностью веществ в культуре клеток и в исследованиях на животных существует не всегда. Отсутствие корреляции обусловлено патогенетическими особенностями конкретной моделируемой вирусной инфекции и химической структурой вещества.

Основным требованием к экспериментальной модели вирусной инфекции является адекватность ее соответствующему заболеванию человека. Большинство вирусных инфекций моделируются на мышах, чувствительность которых к различным вирусам далеко не одинакова. Путь инфицирования зачастую отличается от естественного пути заражения человека, что накладывает свои особенности на патогенез заболевания. Тем не менее, использование конкретной экспериментальной модели на мышах дает ценную первичную информацию об эффективности изучаемого препарата. При этом вначале следует (1) выбрать дозы заражения и (2) определить оптимальные пути инфицирования.

4.1. Выбор доз заражения

При моделировании смертельных вирусных инфекций для данного вида животного обычно используют несколько доз заражения в диапазоне 1–10 – 30 ЛД₅₀ [1, 13, 14]. При получении положительного результата (выживаемость) инфицирующую дозу можно повысить до 100 ЛД₅₀ и более. Эффективность веществ может быть выявлена и при использовании минимальных инфицирующих доз (порядка 1–10 ЛД₅₀).

При моделировании не смертельных вирусных инфекций, когда показателем оценки эффективности препарата не является выживаемость, величина дозы заражения должна быть максимальной (с учетом титра вируса).

4.2. Путь инфицирования

Для создания модели инфекционного заболевания у животного необходимо использовать тот путь инфицирования, который соответствует естественному пути заражения человека данной инфекцией. При отсутствии чувствительности животного используют другие пути заражения с учетом тяжести течения инфекции, при этом очень важен выбор сроков наблюдения за инфицированными животными. Длительность максимального наблюдения при острых вирусных инфекциях определяет показатели сроков максимальной и остаточной смертности. Так, например, при периферическом заражении белых мышей патогенным штаммом тогавируса восточного энцефаломиелита лошадей (ЕЕЕ) в дозах 5–10 ЛД₅₀ и выше сроки максимальной гибели животных соответствуют 7-му дню после заражения, а остаточная гибель – 10-му. Исходя из этих показателей, сроки максимального наблюдения за инфицированными животными составляют 14–21 день.

Нелетальные модели вирусных инфекций с использованием неадаптированного вируса, сроки наблюдения за животными определяются динамикой накопления вируса в чувствительных органах. Так, например, при интраназальном заражении белых мышей тогавирусом Пиксун максимальное накопление возбудителя в чувствительных органах (головной мозг и селезенка) соответствует 120 ч после заражения, а спустя 168 ч вирус не репродуцируется. На этом основании сроки максимального наблюдения за инфицированными животными соответствуют 7 дням.

Немаловажное значение в моделировании вирусных инфекций имеют штаммовые особенности вируса. В данном случае речь идет о том, что при использовании в исследованиях различных штаммов вируса одного семейства можно получить неадекватные результаты. Так, например, вирус гриппа А WSN оказался резистентным к ремантадину, который, в свою очередь, обладает селективным ингибирующим действием в отношении

почти всех эпидемических штаммов вируса гриппа А последних лет. Выявлены штаммовые различия в чувствительности белых мышей как у одного вируса (штаммы Софьин и Пан), так и у различных вирусов комплекса клещевого энцефалита. На этом основании можно заключить, что при моделировании экспериментальной вирусной инфекции (ЭВИ) необходимо использовать эталонные штаммы вируса (по таксономической квалификации — типичный представитель). При получении положительных результатов в дальнейшем можно использовать штаммы тестируемого вируса, имеющие наиболее важное значение в эпидемиологической и клинической практике.

Существенную роль играет однородность возраста, массы и генотипа лабораторных животных. Так, например, показана зависимость генотипа животного и штаммовых особенностей вируса на течение экспериментального клещевого энцефалита у белых мышей. При подкожном заражении мышей линии СВА и С57В1/6 массой 18–20 г выявлены межлинейные различия в чувствительности животных. Для моделирования ЭВИ важно использовать животных наиболее чувствительных линий, одинаковой массы и одного возраста.

После выбора соответствующей экспериментальной модели определяют эффективность действия препарата при различных способах введения по профилактической и лечебной схемам, а также влияние препарата на репродукцию вируса в органах и тканях и др.

Для выбора разовой и суточной доз препарата и схем его введения необходимо провести исследования по определению его острой токсичности хотя бы при трех путях введения, одним из которых является способ, рекомендуемый для применения в клинике.

Результаты дальнейших исследований должны определить целесообразность того или иного пути введения препарата для обеспечения химиотерапевтического эффекта.

Доза препарата для различных видов животных должна быть эквивалентна дозам, предлагаемым для КИ при перерасчете на единицу поверхности тела. Каждая экспериментальная группа должна состоять не менее чем из 10 животных (для крупных — обезьян, собак — до 5).

Схемы оценки эффективности препаратов подразделяются на профилактическую и лечебную. Профилактическая схема предусматривает введение препарата до или в момент заражения и в течение инкубационного периода. При изучении лечебной схемы препарат назначают с момента появления первых симптомов заболевания до полного купирования инфекции.

При изучении профилактической эффективности препарата вначале используют концентрации препарата, соответствующие 1/8, 1/16, 1/32 ЛД₅₀, в условиях однократного введения. При разработке схем многократного назначения препарата используют данные, полученные при его однократном назначении.

Критериями оценки эффективности действия препарата являются степень защиты (%), средняя эффективная доза (ЕД₅₀) по показателю выживаемости, средняя продолжительность жизни (СПЖ) животных и величина ХТИ.

Клиническое выздоровление животных должно быть подтверждено вирусологическими исследованиями. С этой целью проводится:

- 1) непосредственное исследование материала на наличие вирусного антигена или нуклеиновых кислот;
- 2) изоляция и идентификация вируса;
- 3) серологическая диагностика, основанная на установлении значительного прироста вирусных антител инфицированных животных.

5. Методы выявления вирусов

Прямые методы, позволяющие обнаружить вирус, вирусный антиген или вирусную НК непосредственно в исследуемом материале, являются наиболее быстрыми (2–24 ч). Однако эти методы имеют свои ограничения из-за возможности получить ложноположительные или ложноотрицательные результаты. Поэтому они требуют подтверждения непрямыми методами.

К методам **прямого выявления вирусологического материала** относятся:

- 1) электронная микроскопия;
- 2) реакция иммунофлюоресценции (РИФ);
- 3) иммуноферментный анализ (ИФА);
- 4) молекулярные методы (молекулярная гибридизация нуклеиновых кислот, ПЦР).

Все вышеперечисленные методы описаны в разделе «Методы исследования противовирусных препаратов в культуре клеток».

К **непрямым методам выявления вирусологического материала** относятся:

- 1) выделение вирусов;
- 2) серологическая диагностика.

5.1. Выделение вирусов

Один из самых старых и трудоемких методов. На сегодняшний день применяют выделение вируса с последующей идентификацией с помощью одного из современных методов (ИФА с моноклональными антителами или ПЦР).

5.2. Серологическая диагностика

Серологическая диагностика, основанная на реакции **антиген–антитело**, может быть использована для определения как вирусного материала, так и антител к нему и играет роль в определении этиологии вирусной инфекции даже при отрицательных результатах выделения вируса.

Успех серологических реакций зависит от специфичности реакции и интервала времени взятия проб крови по отношению к моменту заражения, необходимого для синтеза организмом антител.

В большинстве случаев используют парные сыворотки, взятые с интервалом в 2–3 недели. Положительной считается реакция при нарастании титров антител по крайней мере в 4 раза.

Большинство специфических антител относятся к IgM и IgG классам, которые синтезируются в разное время инфекционного процесса.

Тесты, используемые для их определения, применяются для ранней диагностики вирусной инфекции. Антитела класса IgG синтезируются позже и длительно сохраняются.

Существуют разнообразные методы серологической диагностики:

- 1) Реакция связывания комплемента (РСК)
- 2) Реакция торможения гемагглютинации (РТГА)
- 3) Реакция пассивной гемагглютинации (РПГА)
- 4) Иммуноферментный анализ (ИФА)

5.2.1. РСК

Является одной из традиционных серологических реакций и используется для диагностики многих вирусных инфекций. В реакции принимают участие 2 системы: 1) антитела сыворотки инфицированного животного + вирус и 2) эритроциты барана + антитела к ним, а также оттитрованный комплемент. При соответствии антител и вируса этот комплекс связывает комплемент, и лизиса эритроцитов барана не происходит (положительная реакция). При отрицательной РСК комплемент способствует лизису эритроцитов. Недостатком метода является его недостаточно высокая чувствительность и трудность стандартизации реагентов.

5.2.2. РТГА

Используется для диагностики заболеваний, вызванных гемагглютинирующими вирусами. Она основана на связывании стандартного вируса, добавленного в систему, антителами проб сыворотки животного, взятых через определенные интервалы времени после заражения. Индикатором реакции являются куриные эритроциты, агглютини-

рующиеся вирусом (формирование характерного зонтика) в отсутствие специфических антител. При наличии антител эритроциты оседают на дно неагглютинированными.

5.2.3. РПГА

Эритроциты могут сорбировать любые вирусы вне зависимости от наличия у последних гемагглютинирующих свойств. Сущность метода заключается в агглютинации сенсibilизированных вирусными антигенами эритроцитов (или полистероловых шариков) в присутствии антител. Сыворотки исследуют, начиная с разведения 1:10, в связи с наличием неспецифических реакций.

5.2.4. ИФА

Применяется для определения антител в сыворотке. На твердую фазу (дно лунок полистироловых планшет) сорбируется соответствующий вирусный антиген. При добавлении разведений исследуемой сыворотки антитела связываются с сорбированными антигенами. Наличие антител, специфичных для данного антигена, обнаруживают с помощью анти-антител, конъюгированных с ферментом (пероксидазой). Добавление субстрата и реакция субстрат–фермент дают окраску. ИФА может быть использована и для определения антигенов. В этом случае на твердую фазу сорбируют антитела.

5.2.5. Моноклональные антитела

Большой прогресс в диагностике вирусных инфекций был достигнут с развитием генно-инженерных исследований в области получения моноклональных антител, в связи с чем была резко повышена специфичность и чувствительность методов диагностики вирусных антигенов. Узкая специфичность моноклонов, представляющих небольшую долю вирусных белков, которые могут присутствовать в материале, успешно преодолевается использованием нескольких моноклональных антител к различным вирусным детерминантам.

Вышеперечисленные критерии позволяют определить степень активности препаратов на основе количественных показателей. Препараты, при введении которых степень защиты животных составляла до 30%, следует считать неактивными, а 70% и выше — активными. Показатель эффективности препарата (степени защиты животных) определяется при использовании для заражения животных трех инфицирующих доз (5–10–30 ЛД₅₀).

Обязательными показателями, характеризующими защитные свойства исследуемых препаратов, являются ЕД₅₀ и степень защиты при исследовании средства по профилактической и лечебной схемам. ЕД₅₀ — это показатель (величина) суточной дозы препарата (мг/ЕД), которая обеспечивает защиту 50% животных. ЕД₅₀ вычисляют графически или по методу Кербера при использовании одной (постоянной) инфицирующей дозы.

СПЖ животных отражает динамику выживаемости до момента гибели и выражается в днях. Этот показатель также объективно отражает противовирусное действие препарата. Показатели ЕД₅₀ и СПЖ в экспериментальной группе (для оцениваемого препарата) должны существенно отличаться от таковых контрольной группы. Величина ХТИ должна строго обосновывать рекомендуемый диапазон лечебных доз препарата при конкретном пути его введения в организм.

6. Вирусы

Для изучения токсичности и специфической противовирусной активности предполагаемых фармакологических веществ могут быть использованы различные РНК- и ДНК-содержащие вирусы.

РНК-вирусы:

- 1) вирус гриппа (с. Orthomyxoviridae);
- 2) вирусы кори, свинки (с. Paramyxoviridae);

- 3) вирусы везикулярного стоматита, бешенства (с. *Rabdoviridae*);
- 4) вирусы Коксаки В, гепатита А и энцефаломиокардита (с. *Picornaviridae*);
- 5) вирусы клещевого энцефалита, желтой лихорадки, Денге, гепатита С (с. *Flaviviridae*);
- 6) вирус восточного энцефаломиелита лошадей, вирус Пиксун (с. *Togaviridae*);
- 7) вирусы Крымской-Конго геморрагической лихорадки (с. *Bunyaviridae*);
- 8) иммунодефицита человека (с. *Retroviridae*);
- 9) другие вирусы.

ДНК-вирусы:

- 1) вирус цитомегалии человека, вирусы герпеса простого 1-го и 2-го серотипов (с. *Herpesviridae*);
- 2) другие вирусы.

Общие принципы изучения изложены в разделах 1–4. В качестве примера ниже излагаются методы, используемые ранее при поиске новых препаратов, активных против гриппа, герпеса, гепатита С, клещевого энцефалита.

6.1. Вирусы гриппа

Из трех существующих серологических типов вируса гриппа (А, В, С) причиной эпидемий и пандемий являются вирусы типа А и В. При этом вирусы типа А характеризуются чрезвычайно высокой антигенной изменчивостью, что обуславливает кратковременность приобретенного к ним иммунитета. По этим причинам именно различные штаммы вирусов гриппа А и В во многих исследовательских лабораториях являются объектами для проведения поиска активных противогриппозных веществ [89]. С этой целью используют вирусы гриппа А с различными антигенными формулами: А/PR-8/34(Н1N1), А/Betesda/63(Н2N2), А/Aichi/74(Н3N2) и др., а также различные штаммы вируса гриппа В, адаптированные к культуре клеток, куриным эмбрионам и мышам.

Изучение противовирусной активности веществ в отношении вирусов гриппа А и В проводят в опытах *in vitro* в культуре клеток и *in vivo* — в модельных исследованиях на животных.

*6.1.1. Изучение активности веществ в отношении вируса гриппа в опытах *in vitro**

Для работы может быть использован любой вид культуры клеток, обеспечивающий интенсивное размножение вируса гриппа А или В. С этой целью успешно используют культуры почки эмбриона человека, почки обезьян, телят, куриных эмбрионов, клеточные линии, например MDCK (почки собаки).

6.1.2. Определение цитотоксичности и противовирусной активности испытываемых препаратов

В опытах используют переносимые дозы испытуемого соединения. Оценка противовирусной активности соединений в культуре клеток осуществляется путем контроля репродукции вируса различными методами: учет цитопатогенного действия вируса на клетки (ЦПД), реакцию гемагглютинации с вируссодержащей жидкостью, реакцию гемадсорбции на инфицированном клеточном монослое, метод ингибирования бляшек, методы электронной микроскопии, метод флуоресцирующих антител (МФА), метод иммуноферментного анализа (ИФА).

*6.1.3. Изучение вирулиционного действия соединений в контактных опытах *in vitro**

Вирулицидную активность соединений можно изучать при их непосредственном контакте с вирусом в пробирке с последующим определением инфекционности смеси на

мышьих или куриных эмбрионах. Для проведения эксперимента готовят разведения испытуемого соединения, например в концентрации от 1000 до 1 мкг/мл.

Для более полного выявления вирулицидных свойств соединений следует использовать несколько заражающих доз вируса, например 100, 10 и 1 LD₁₀₀. В стерильные пробирки наливают по 0,5 мл соответствующих разведений испытуемого соединения и вируса. В контрольную пробирку к 0,5 мл соответствующего разведения вируса добавляют 0,5 мл буферной смеси. Смесь тщательно встряхивают и штатив с пробирками устанавливают над ванной со льдом, чтобы температура в пробирках не превышала 14 °С. Такие условия не сказываются на действии соединения на вирус и в то же время предохраняют вирус от инактивирующего влияния повышенной температуры.

Контакт соединения с вирусом длится один час. При этом пробирки встряхивают регулярно, не менее 4 раз. Затем полученными смесями интраназально в объеме 0,05 мл заражают по 5 мышей (с массой тела 12–14 г). За мышами устанавливают наблюдение в течение 14 дней. Погибших животных вскрывают, регистрируя специфические патологоанатомические изменения в легких. Специфичность гибели животных от гриппозной пневмонии следует подтверждать также постановкой реакции геммагглютинации с легочной тканью павших мышей, а также ее патоморфологическими исследованиями.

Вместо мышей смеси после контакта можно ввести в аллантоисную полость 9-ти дневных куриных эмбрионов (по 5 эмбрионов на каждое разведение). Зараженные эмбрионы инкубируют 48 ч в термостате при 37 °С. Затем ставят РГА по обычной методике.

Если испытуемое соединение в контактных опытах *in vitro* в концентрации 10 мкг/мл и ниже полностью нейтрализует инфекционные свойства одной или более ЛД₁₀₀, то его оценивают как высокоактивное с точки зрения вирулицидного действия.

*6.1.4. Изучение активности веществ в отношении вируса гриппа в исследованиях *in vivo* на модели гриппозной пневмонии белых мышей*

Экспериментальная модель гриппозной пневмонии мышей является доступной в исполнении и достаточно информативной, причем химиотерапевтический эффект, полученный на этой модели, может проявляться не только за счет вируспецифической активности, но и за счет интерферониндуцирующего или иммуномодулирующего действия изучаемых препаратов. Поэтому изучение активности соединений на модели гриппозной пневмонии мышей представляет особый интерес и может быть рекомендовано для всех потенциально активных веществ.

Изучение проводят на белых нелинейных мышях с массой тела 14–16 г. Для заражения используют штаммы вируса гриппа А или В, адаптированные к мышам. Вирусосодержащим материалом обычно является легкое зараженной вирусом гриппа мыши или аллантоисная жидкость зараженного вирусом гриппа 9-дневного куриного эмбриона. Для проведения химиотерапевтических исследований заражающая доза составляет 10 ЛД. При этом 90–100% животных погибают от гриппозной пневмонии на 5–7 сутки после заражения. Но для более подробного изучения противовирусной активности соединения можно использовать как более высокие, так и более низкие заражающие дозы вируса. Заражение животных проводят интраназально (в объеме 0,05 мл) под легким эфирным наркозом.

Для изучения на мышях могут быть использованы как растворимые, так и нерастворимые в воде соединения. Дозы изучаемого соединения подбираются с учетом ЛД для этого соединения. Обычно используют 1/4 или 1/8 от ЛД₅₀ и более низкие дозы. Следует учитывать повышение токсичности соединений для инфицированных животных.

Схемы введения препарата могут быть как профилактические, так и лечебные. Путь введения соединения также может быть различным: пероральным или парентеральным (подкожно, внутривенно, внутримышечно, внутривенно).

При проведении эксперимента наряду с группами мышей, получающих исследуемое соединение в разных дозах, планируются группы контроля. В каждой группе должно быть

не менее десяти животных. За лечеными и контрольными мышами устанавливается ежедневное наблюдение на протяжении 14 дней. После вскрытия павших мышей регистрируют патологоанатомические изменения в легких. В случае гибели мыши от гриппозной инфекции ее легкие увеличены в размерах, красные, плотные. При погружении кусочка легкого в воду он тонет. Под микроскопом видны очаги пневмонии катарально-геморрагического характера. Изменения в легких оцениваются в баллах по 4-балльной системе. При специфической гибели мышей от гриппозной пневмонии их легкие имеют поражения на 3–4 балла. Для уточнения факта гибели животных от гриппозной инфекции рекомендуется выборочно провести реакцию гемагглютинации с легочной тканью павших мышей.

Химиотерапевтическую активность соединений на модели гриппозной пневмонии оценивают по следующим показателям:

1. Учет степени снижения летальности: соединения, снижающие летальность животных на 60 и более процентов по сравнению с контролем, представляют интерес для углубленного изучения.

2. Учет средней продолжительности жизни мышей или общей суммы прожитых всеми мышами дней в получаемых исследуемое соединение и контрольных группах.

3. Определение титра вируса в легких леченых и контрольных мышей: снижение титра вируса на 1,75 lg и более в группе леченых животных свидетельствует об угнетении его репродукции.

4. Снижение количества случаев пневмоний и степени их интенсивности у леченых животных по сравнению с контролем.

5. Изучение зависимости «доза–эффект» и определение ХТИ (чем выше ХТИ, тем больший интерес представляет вещество).

Активное соединение должно быть изучено в сравнении с активным противогриппозным препаратом, применяющимся в медицинской практике.

6.2. Вирусы герпеса

Широкое распространение, ряд биологических особенностей, важная роль в инфекционной патологии человека, присущие вирусам герпеса, обуславливают актуальность разработки и изучения противогерпетических препаратов. Вирусы герпеса (ВПГ) относятся к ДНК-геномным вирусам. Для них характерно длительное существование в организме, преимущественно в латентной форме. Вызываемые ими заболевания имеют многочисленные клинические проявления (поражения кожи, слизистых оболочек, роговицы, конъюнктивы и др. оболочек глаз, головного мозга, гениталий и других органов и тканей) и могут протекать остро или переходить в хроническую рецидивирующую форму. Выявлена этиологическая и патогенетическая роль ВПГ, особенно 2-го типа, при раке шейки матки. Доказано влияние герпетической инфекции на детородную функцию женщин, а также ее тяжелые последствия для здоровья матери и ребенка.

Изучение активности веществ в отношении ВПГ 1 и 2 типов проводят в опытах *in vitro* с использованием различных культур клеток и в модельных исследованиях на животных.

Необходимо отметить, что любой антивирусный препарат должен быть изучен на штаммах герпеса — как чувствительных, так и резистентных к ацикловиру.

6.2.1. Изучение активности веществ в отношении вирусов герпеса *in vitro* в клеточной культуре

Практически все известные культуры клеток могут быть использованы для размножения ВПГ, но количество вируса, динамика его накопления и характер цитопатического действия на клетки различны в разных культурах, что следует учитывать при выборе культуры клеток для постановки химиотерапевтических исследований. С этой целью часто используют первичные клетки фибробластов эмбриона курицы (ФЭК); клетки эмбриона человека (КЭЧ) или клеточную линию Vero (клетки почки обезьян) и другие.

6.2.2. Изучение активности веществ

в отношении вируса герпеса в культуре клеток эмбриона курицы (ФЭК)

Первичную культуру ФЭК, инфицированную вирусом герпеса в дозах 1–1000 ТЦД₅₀ (50% тканевых цитопатогенных доз), инкубируют в термостате при 37 °С и в течение пяти суток ежедневно микроскопируют, отмечая цитопатическое действие вируса на клетки в сравнении с контрольными пробирками, где монослой не был инфицирован. Цитопатическое действие ВПГ на клетки морфологически проявляется в образовании симпластов или округлых шарообразных клеток в сочетании с пролиферацией и гигантскими многоядерными клетками.

Для изучения противовирусной активности веществ в пробирки с клеточным монослоем вносят 0,8 мл среды без сыворотки, в которой содержится испытуемое вещество в максимально переносимой или меньшей концентрации. Через один час контакта вещества с клетками добавляют указанные выше дозы вируса. Действие вещества определяют по его способности предотвращать цитопатическое действие вируса на клетки по сравнению с контролем через 72 ч инкубации.

В опытах необходимы три контроля: состояние клеточного монослоя, репродукции вируса, цитотоксического действия вещества.

Ингибирующее действие веществ оценивают по снижению инфекционного титра вируса под действием испытуемого вещества по сравнению с контролем. Снижение на 1,5–2,0 lg ТЦД свидетельствует о выраженной противогерпетической активности изучаемого соединения, особенно, если ХТИ при этом равен 8 и более.

Следует отметить, что существует большое разнообразие постановки эксперимента с внесением испытуемого соединения в разные сроки до или после инфицирования монослоя, а для регистрации репродукции вируса герпеса в чувствительной клеточной культуре можно использовать метод иммунофлюоресцирующих антител (ИФА), метод ингибции бляшкообразования, метод иммуноферментного анализа и др.

6.2.3. Изучение активности веществ в отношении вирусов герпеса *in vivo*

Изучение активности веществ в отношении ВПГ 1 и 2 типов в модельных исследованиях *in vivo* чрезвычайно важно, так как позволяет выявить химиотерапевтическое действие соединения в целостном организме. Большое разнообразие клинических форм герпетической инфекции у человека (герпес кожи, герпес гениталий, герпетический энцефаломиелит, герпетический кератит и др.) делает необходимым изучение активности на различных моделях.

6.2.3.1. Изучение активности веществ в отношении вируса герпеса на мышах

Белые нелинейные мыши с массой тела 8–10 г высоко восприимчивы к внутримозговому заражению ВПГ 1 и 2 типов. Инкубационный период составляет 3–5 дней, после чего развивается характерная клиническая картина герпетического энцефалита, проявлениями которого являются возбуждение, ортостатическое положение, расстройство координации, парезы задних конечностей и судороги. Заболевание заканчивается гибелью животных на 4–10 день после заражения в зависимости от использованной дозы вируса и его вирулентности. Энцефаломиелит воспроизводится также при внутрибрюшинном или интраназальном заражении мышей.

Для проведения химиотерапевтических экспериментов используют мышей с массой тела 12–14 г. Предпочтителен способ заражения внутрибрюшинный или интраназальный. При внутримозговом заражении животных инфекция развивается очень быстро, что затрудняет выявление химиотерапевтического эффекта изучаемых веществ. Способы и время введения изучаемых веществ могут быть различными в зависимости от поставленных целей (изучение профилактического или лечебного действия). В химиотерапевтических экспериментах используют переносимые для инфицированных животных

дозы изучаемых веществ. Группы леченых и контрольных животных должны включать не менее 10 мышей каждая. Защитный эффект выражается в % и учитывается по снижению летальности мышей в группе леченых животных по сравнению с контролем. О противогерпетической активности испытуемого препарата свидетельствует снижение летальности мышей на 30 и более %. Активность испытуемого соединения оценивается также по удлинению инкубационного периода по сравнению с контролем, увеличению средней продолжительности жизни и снижению титра вируса в мозговой ткани леченых мышей.

6.2.3.2. Изучение активности веществ в отношении вируса герпеса на кроликах

Вирусы простого герпеса обладают кератотропными свойствами, вызывая офтальмовирусную патологию. Наиболее подходящей и доступной моделью для изучения противовирусной активности препаратов при офтальмогерпесе являются кролики. Эта модель очень удобна и информативна, т.к. легко воспроизводится, клиническая картина офтальмогерпеса близка к таковой у людей, позволяет получить четкие результаты терапевтической эффективности, коррелирующие с противовирусной активностью испытуемого вещества, установленной в культуре клеток и на мышах.

Для химиотерапевтических исследований используют молодых кроликов породы Шиншилла с массой тела 2–2,5 кг, так как их роговица более чувствительна к ВПГ. Герпетический кератит вызывают следующим образом. Перед заражением глаза анестезируют закапыванием в конъюнктивальный мешок 0,5% раствора дикаина. Затем глазное яблоко фиксируют. Удобнее, если глазное яблоко выведено из орбиты путем нажатия пинцетом под его нижний край. Острой иглой наносят поверхностные линейные насечки (в слое эпителия) в виде 3-х взаимно перпендикулярных полос. Вируссодержащий материал наносят на поврежденное место в количестве 0,01 мл. Веки плотно смыкают и слегка втирают инокулят в роговицу. Наблюдение за развитием клинической картины кератита проводят, рассматривая ежедневно глаза с помощью бинокулярной лупы. Перед осмотром поверхность роговицы окрашивают 0,5% раствором флюоресцеина для выявления эрозированных участков. Эрозии роговицы, обусловленные механической травмой, обычно эпителизируются в течение 48 ч. Сроки появления первых признаков заболевания варьируют в зависимости от степени патогенности штаммов вируса. При использовании вирулентных штаммов с выраженными кератотропными свойствами клинические признаки герпесвирусного кератита обнаруживаются через 12–24 ч после заражения, выраженная картина кератита развивается через 48–72 ч. Клинические явления могут нарастать еще в течение нескольких дней с признаками воспаления радужной оболочки, а затем постепенно уменьшаются.

Первое проявление инфекционного процесса выражается в образовании мелких пузырьков вдоль насечек на роговице, которые вскоре сливаются, образуя поражения, напоминающие веточку. Обычно на роговице появляются 2–3 такие веточки, которые более отчетливо видны при окраске 0,5% раствором флюоресцеина. Степень тяжести поражений варьирует от слабо ветвистой дендрической язвы до тяжелых поражений с вовлечением глубоких слоев роговицы. Это различие в степени интенсивности заболевания может зависеть как от степени патогенности вируса, так и от индивидуальной особенности животного.

В большинстве случаев наблюдается ограничение инфекционного процесса и самопроизвольное выздоровление в течение 3-х недель. Обычно через 12–15 суток уменьшается инфильтрация и наступает полная эпителизация роговицы. Как правило, на роговице на месте ее поражения остается рубец. Иногда течение инфекции может быть более тяжелым и заканчиваться через 30–45 дней образованием грубых обширных помутнений роговицы, выраженным сосудистым паннусом, зарастиванием зрачка. Однако такое течение кератита у кроликов нежелательно. При различных формах поражений глаз на-

блюдается образование небольшого количества отделяемого, содержащего лейкоциты. Иногда в отделяемом может быть обнаружен вирус. Необходим контроль микрофлоры конъюнктивы.

Герпесвирусный характер заболевания можно подтвердить обнаружением в слезе или в соскобе с конъюнктивы век антигена ВПГ методом флуоресцирующих антител.

Как правило, у кроликов с развившимся герпетическим поражением глаз в сыворотке крови на 7-й день после заражения появляются специфические вируснейтрализующие антитела. Титр антител достигает максимума на 11–12 день.

Тяжесть течения экспериментального герпетического кератита зависит от вирусной нагрузки, вирулентности и кератотропности возбудителя. Для инфицирования глаз рекомендуется использовать ВПГ, пассированный путем внутримозгового заражения мышей, в виде 10% суспензии мозга мышей, содержащей 4–4,5 lg ЛД₅₀ в количестве 0,03 мл. Однако при частых пассажах на мышах не все штаммы вируса сохраняют кератотропные свойства. При этом нередко усиливаются нейротропные свойства вируса герпеса, приводящие к развитию энцефалита, что является нежелательным осложнением герпетического кератита. Для сохранения кератотропных свойств вируса необходимо проводить пассажи вируса на роговице кроликов. Нейротропные свойства ВПГ уменьшаются при использовании попеременных пассажей на мышах и в клеточной культуре ФЭК или от роговицы к роговице кроликов с однократным пассированием на мышах путем их внутримозгового заражения.

Для экспериментальных исследований можно использовать ВПГ 1-го типа штаммы 1–С, 9–С, «Коптев», «Ела»; ВПГ 2-го типа штаммы «Трайков», ВН, MS.

На каждую дозу изучаемого вещества планируют группу кроликов (3–5 животных). Такая же группа животных должна быть контрольной. Заражать можно оба глаза, но использовать один глаз для лечения, а другой в качестве контроля не следует. Способ применения испытуемых веществ может быть разным: инсталляции растворов, аппликации мази, субконъюнктивальные инъекции, пероральное введение и т.д. Контрольным животным по той же схеме вводят плацебо (растворитель, мазевую основу и т.д.). При изучении терапевтической активности соединений лечение начинают через 2–3 дня после заражения при наличии начальной клиники кератита. Длительность курса может быть различной — 7–10 дней и более, в зависимости от эффективности изучаемого соединения. При оценке активности проводят сравнительный анализ тяжести клинического течения кератита в группе леченых и контрольных животных, учитывают длительность течения инфекции, определяют титр вируса в соскобах с роговицы глаза путем титрования на мышах или в культуре клеток. Проводят также морфологическое исследование тканей глаза кроликов, пораженных вирусом герпеса, у контрольных животных и после лечения активным веществом.

6.2.4. Генитальный герпес

Противогерпетическая активность ЛП *in vivo* традиционно определяется на модели генитального герпеса морских свинок.

Наиболее адекватной генитальному герпесу человека является интравагинальная модель герпетической инфекции морских свинок, которая имеет ряд характерных, сходных с генитальным герпесом человека признаков, включающих: естественный путь заражения (интравагинально); самоограничение первичного вульвовагинита; ассоциация с неврологическими и урологическими симптомами (осложнениями); латентная инфекция в чувствительных ганглиях; спонтанные или индуцированные рецидивы, а также гуморальные, клеточные и цитокиновые ответы на ВПГ-2 [40].

Герпетическая инфекция воспроизводится на самках морских свинок (линия Hartley) массой 200–250 г инстилляцией интравагинально специальным шприцем вируссодержащей жидкости с инфекционным титром ВПГ-2 не ниже 10⁵ БОЕ/мл.

Клинические симптомы генитального герпеса регистрируются ежедневно в группе контроля и получающих исследуемый препарат группах перед проведением соответ-

ствующих схем лечения. Наблюдения за животными при первичной инфекции проводят до 21 дня после заражения.

Критериями оценки тяжести инфекционного процесса служат степень выраженности, распространенность и размеры специфических поражений: покраснение, припухлость, отек, мелкие и крупные пузырьки, язвы с мацерацией, геморрагические корки, струп и наличие системных признаков. Максимальная выраженность каждого из указанных признаков составляет 4 балла.

Эффективность препарата оценивается на пике развития патологического процесса по снижению выраженности клинических проявлений, сокращению сроков заболевания и расчету индекса лечебного действия (ИЛД). При различных схемах применения препарата (дозы, кратность введения, продолжительность курса лечения) ИЛД рассчитывается для каждой из них.

При более длительном наблюдении (до 2–3 месяцев) у контрольных животных в различные сроки после первичной инфекции наблюдаются спонтанные рецидивы герпетических высыпаний и/или асимптомное выделение HSV-2, что позволит оценить эффективность противорецидивного действия препарата или различных схем его применения и рассчитать индекс его противорецидивного действия (ИПД).

В зависимости от целей доклинического исследования препарата герпетическая инфекция может быть воспроизведена на морских свинках-самцах. В этих случаях вирусосодержащий материал наносится и втирается в предварительно скарифицированную кожу *penis*. Скарификацию проводят под анестезией с помощью хирургического ланцета, площадь скарификации не менее 4 мм.

6.3. Вирус гепатита С

Вирус гепатита С (ВГС) открыт в 1986 году. Данные изучения последовательностей генома ВГС (РНК) позволили отнести этот вирус к семейству «Flaviviridae», род «Hepacivirus». Среди других возбудителей вирусных гепатитов ВГС занимает ведущее положение, поскольку является одной из главных причин хронических форм вирусных гепатитов, часто заканчивающихся циррозом или гепатоцеллюлярной карциномой. Вирусный гепатит С имеет глобальное распространение: более 3% населения мира инфицировано ВГС. Чрезвычайно высокая степень изменчивости генома ВГС явилась причиной появления значительно отличающихся друг от друга генотипов вируса (в настоящее время известно до 6 циркулирующих в мире генотипов ВГС), каждый из которых имеет до десяти разных субтипов. В Российской Федерации среди 5 известных генотипов ВГС (1a, 1b, 2a, 2b и 3a) доминирующим в циркуляции является генотип 1b, который, как известно, чаще других генотипов ВГС является причиной цирроза или первичного рака печени. Попадая в организм человека, ВГС подвергается дальнейшей изменчивости; возникают так называемые квазивиды ВГС, которые теряют способность связываться с ВГС специфическими антителами. Вот почему в крови людей одновременно определяют как антитела к ВГС методом иммуноферментного анализа (ИФА), так и РНК ВГС — методом полимеразной цепной реакции (ОТ ПЦР). Это основные специфические маркеры инфекции, известные в настоящее время.

До настоящего времени в лечении ВГС препараты α -интерферона не имеют альтернативы. Более эффективной, но и значительно более дорогостоящей считается комбинированная терапия интерферона с виразолом (рибавирином). Однако только у 30–40% инфицированных ВГС после длительного лечения наблюдается положительный эффект при лечении этими препаратами. Наиболее трудно поддаются лечению больные ВГС, вызванным генотипом вируса 1b. В этой связи представляется важным и необходимым поиск новых более дешевых и более эффективных препаратов для лечения вирусного гепатита С. Из-за отсутствия экспериментальных лабораторных моделей ВГС-инфекции работа по скринингу противовирусных соединений в отношении вирусного гепатита С еще недавно была невозможна. Было известно, что лишь обезьяны шимпанзе чувстви-

тельны к инфекции ВГС. Однако из-за дороговизны этих животных и ухода за ними исследования во всем мире значительно ограничены. В НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН впервые в мире были разработаны модели инфекции, вызванной ВГС, как в культурах клеток, так и в организме инфицированных животных. В результате этих исследований из крови ВГС-инфицированных людей были выделены и идентифицированы цитопатогенные варианты ВГС, относящиеся к разным генотипам вируса. Таким образом, была реализована возможность исследований по изучению противовирусной активности фармакологических веществ в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С.

6.3.1. Изучение противовирусной активности фармакологических соединений в отношении ВГС инфекции *in vitro*

Получены данные о том, что изолированные варианты ВГС могут размножаться и индуцировать цитопатогенный эффект в различных видах культур клеток:

а) в перевиваемых клеточных линиях:

СПЭВ (клетки почки эмбриона свиньи), ВНК-21 (культуры клеток почки сирийского хомячка), Vero (культуры клеток почки зеленой мартышки), клон 6 клеток Vero, SW-13 (культуры клеток аденокарциномы надпочечника человека), ПТП — клетки тестикул поросенка, МТ-4 — культуры клеток человека лимфобластоидного происхождения) и др.;

б) в первичных культурах клеток:

ФЭК (фибробласты куриного эмбриона), первичные лимфоциты, первичные культуры клеток головного мозга новорожденных мышей (ГМС).

Все упомянутые культуры клеток могут быть использованы для изучения противовирусной активности фармакологических препаратов в отношении инфекции, вызванной ВГС. Однако если речь идет об исследовании индукторов интерферона, то лучше всего использовать ВГС-инфицированные культуры клеток SW-13, ФЭК. Следует отметить, что для изучения противовирусного эффекта предпочтительнее использовать однодневный монослой первичных клеток или одно-двухдневный монослой перевиваемых культур клеток как наиболее чувствительных к репликации ВГС.

Культуры клеток выращивают в 24-луночных панелях и на первой стадии их используют для определения цитотоксических свойств изучаемого препарата. В дальнейших исследованиях используют нетоксичные для клеток дозы препарата.

Для изучения противовирусного действия препаратов, как правило, используют одну дозу вируса, равную 10,0 ТЦД₅₀/клетка. Поэтому в исследованиях используют ВГС с известным титром инфекционной активности для культур клеток. Заражение культур клеток проводят по классическому типу: монослой клеток освобождают от питательной среды, промывают средой Хэнкса, удаляют культуральную жидкость и наносят по 20–40 мкл вирусосодержащего материала в дозе 10,0 ТЦД₅₀/клетка. После 20-минутного контакта неадсорбированный вирус удаляют и вносят по 0,4 мл ростовой.

Обработка клеток препаратом проводится следующим образом: готовятся нетоксичные для клеток дву- или десятикратные разведения препарата, по 40 мкл каждого разведения вносят в среду-поддержку инфицированных культур клеток. В исследованиях на культуре клеток, инфицированной ВГС, используется разное время для внесения препарата и изучения его противовирусного действия: а) за 24 ч до инфекции клеток, б) в момент инфекции, в) через 24 ч после инфекции. Во всех случаях используют адекватные контроли, которыми служат: 1) ВГС инфицированные культуры клеток без добавления препарата; 2) неинфицированные культуры клеток, обработанные препаратом, как в случаях а), б) и в); 3) неинфицированные культуры клеток. Культуры клеток наблюдают в течение 6–7 дней. Через 6–7 дней, когда в контрольных культурах клеток, инфицированных ВГС, развивается максимальный цитопатогенный эффект, определяют жизнеспособность (%) клеток во всех вариантах опыта, окрашивая клетки метиленовой синькой. При этом жизнеспособность незараженных культур клеток и культур клеток,

обработанных препаратом, должна быть максимальной (до 100%), жизнеспособность ВГС инфицированных культур клеток (контроль вируса) — минимальной (менее 20%). В этом случае статистически достоверное увеличение жизнеспособности ВГС инфицированных клеток, «леченных» препаратом, может свидетельствовать о противовирусном действии того или иного фармакологического препарата.

Однако в исследованиях по изучению противовирусной активности препаратов в отношении ВГС инфекции обязательным является и 2-й этап изучения противовирусной активности, который позволяет дать количественную оценку влияния противовирусного эффекта препарата на проявления инфекционных свойств ВГС.

С этой целью через 2–3 дня после заражения клеток ВГС пробы среды отбирают из лунок всех вариантов опыта для определения инфекционной и антигенной активности ВГС. Инфекционную активность ВГС определяют титрованием проб среды в чувствительных культурах клеток, каковыми могут быть культуры клеток СПЭВ, Vero-E6, ПТП, ВНК-21 или другие из вышеперечисленных. Главное, чтобы в этих культурах клеток ВГС мог индуцировать отчетливый цитопатогенный эффект. Титрование проб, содержащих ВГС, проводят на 24- или 96-луночных панелях, используя для каждой пробы по крайней мере, по три лунки. Обязательными являются контрольные лунки с неинфицированными культурами клеток. Учет титрования вируса проводят на 6–7-й дни, когда в культурах клеток, зараженных пробами среды, отобранными из лунок с ВГС-инфицированными клетками (контроль вируса), развивается максимальный цитопатогенный эффект. Учет результатов проводят на основании сравнительного расчета инфекционных титров ВГС по формулам Рида и Менча или Кербера во всех вариантах опыта (Леннет-30). В случае, если препарат подавляет репликацию ВГС в этих культурах на 2,0–3,0 lg и более, полученные данные свидетельствуют о его антивирусном действии.

Следует отметить, что ВГС, как и многие представители семейства Flaviviridae, обладает способностью агглютинировать эритроциты гуся. Эта способность вируса к гемагглютинации может быть проверена в реакции гемагглютинации (РГА) в классической постановке (Clarke и Casals, 1954).

Именно этот тест (РГА) может быть использован в первую очередь как экспресс-метод для оценки противовирусной активности фармакологического препарата на первом этапе исследований в динамике, когда необходимо определить жизнеспособность ВГС инфицированных клеток. РГА может служить и как дополнительный метод оценки противовирусной активности препарата.

Количественный метод ОТ ПЦР, широко используемый для диагностики ВГС в крови и в материалах, полученных при биопсии печени людей, в настоящее время в доклинических исследованиях препаратов вряд ли может быть применим, так как является дорогостоящим. Однако, когда препарат полностью подавляет ЦПД ВГС, ОТ ПЦР может быть использован как тест, подтверждающий высокую активность препарата.

6.3.2. Изучение противовирусной активности фармакологических соединений в отношении ВГС инфекции у животных

Известно, что цитопатогенными вариантами ВГС, выделенными из сыворотки инфицированных людей, при внутривенном заражении можно инфицировать мышей и кроликов. Несмотря на то, что у зараженных ВГС животных, как правило, не развиваются клинические симптомы заболевания, в различных органах и тканях происходит интенсивная репликация ВГС, подтверждая пантропные свойства вируса. Эта особенность и легла в основу изучения противовирусной активности препаратов при ВГС инфекции у животных, которая заключается в том, чтобы определить инфекционную и антигенную активность ВГС в органах и тканях ВГС инфицированных лабораторных животных. Для работы с лабораторными животными требуется разрешение этического комитета по работе с лабораторными животными и использованию их для заражения ВГС. Спустя неделю после внутривенного введения ВГС содержащего материала и после лечения

препаратами, у мышей забирают кровь, печень, головной мозг, а также селезенку и лимфатические узлы (иногда исследования ограничиваются кровью или сывороткой крови, печенью и головным мозгом). У кроликов чаще всего отбирают сыворотку крови и лимфоциты. Далее органы и ткани отдельно от каждого инфицированного животного гомогенизируют, полученные гомогенаты центрифугируют при 4000 об/мин, после чего надосадочная жидкость используется для определения инфекционной и антигенной концентрации ВГС методом титрования в чувствительных для ВГС культурах клеток. Учет и сравнительный анализ, а также оценку действия препарата(ов) проводят по аналогичной схеме, описанной при изучении противовирусной активности препаратов в отношении ВГС инфекции в культурах клеток. Полученные данные могут быть дополнены результатами изучения ВГС специфической антигенной активности в органах и тканях леченых и нелеченых ВГС инфицированных животных (методы ИФА и РГА).

Нередко при оценке противовирусного действия препарата на ВГС инфекцию у животных определяют уровни ВГС-специфических антител в крови лабораторных животных. Изменение титра антител, спектра антител могут свидетельствовать в пользу действия препарата. Особенно важно определение вируснейтрализующих антител в крови ВГС инфицированных животных в реакции биологической нейтрализации, которую следует ставить в культурах клеток, чувствительных к цитопатогенному действию вируса. Сыворотки перед определением вируснейтрализующих антител разводят до 1:5–1:10, предварительно прогревают на водяной бане при 56 °С в течение 20 мин. Реакцию биологической нейтрализации можно ставить как с целью определения титра вируснейтрализующих антител (в этом случае используют одну дозу вируса и серию двукратных разведений сыворотки), так и для определения индекса нейтрализации, когда используют одно разведение сыворотки и серию десятикратных разведений ВГС.

Увеличение титра вируснейтрализующих антител к ВГС или индекса нейтрализации (частное от деления титров ВГС до и после нейтрализации сыворотками) может свидетельствовать об иммуностимулирующем действии противовирусного препарата, используемого в исследованиях с животными, инфицированными ВГС.

Таким образом, доклиническое изучение противовирусной активности фармакологических препаратов в отношении инфекции, вызванной вирусом гепатита С, может слагаться из двух этапов: исследования противовирусной активности *in vitro*, т.е. в культурах чувствительных к репродукции ВГС клеток, и исследования противовирусной активности *in vivo*, на уровне организма лабораторных животных.

6.4. Вирус клещевого энцефалита

Возбудитель клещевого энцефалита (КЭ) — вирус из семейства Flaviviridae, переносимый иксодовыми клещами и вызывающий тяжелые заболевания человека и животных. Это — природно-очаговое заболевание, пик которого приходится на весенне-осенний период.

На сегодняшний день КЭ является одним из наиболее опасных природно-очаговых инфекций на территории Российской Федерации. За последние 15 лет заболеваемость КЭ значительно возросла. Так, если в 1980–1986 гг. число заболевших КЭ не превышало 700–1200 человек ежегодно, то в 2000–2003 гг. эта цифра возросла до 8000–11000 случаев в год. При этом половина из них приходится на жителей крупных городов, а 40% составляют дети до 12 лет. Несмотря на то, что летальность при КЭ не превышает 2–4%, в районах Урала, Восточной Сибири и Дальнего Востока ежегодно наблюдаются вспышки КЭ, вызываемые высокопатогенными для человека штаммами КЭ. В этих случаях смертность может увеличиваться до 30% за счет преобладания тяжелых двухволновых очаговых менинго-энцефалических форм КЭ.

Очаги КЭ, различающиеся по тяжести заболевания, распространены в европейской и азиатской частях России и ряде европейских стран и стран СНГ. Последнее время число случаев заболевания КЭ увеличивается. Заболевание характеризуется острым нача-

лом, лихорадкой, сильной головной болью, тошнотой, рвотой, фотофобией, параличом шейно-плечевого отдела. Есть легкие и бессимптомные формы.

В целях профилактики КЭ используют несколько вариантов инактивированных вакцин, однако их применение не решает всех проблем профилактики этой инфекции. Основными причинами недостаточной эффективности вакцинации населения инактивированными вакцинами являются: 1) частые нарушения инструкций по применению вакцин (не проводятся необходимые трехкратные инъекции при первичной вакцинации и своевременная ревакцинация); 2) аллергические реакции; 3) вторичные иммунодефициты, связанные с воздействием на организм внешних факторов (стресс и т.п.). В настоящее время не разработаны эффективные лечебно-профилактические препараты против вируса КЭ, а также средств этиотропной терапии при клинически выраженном КЭ. Это связано с тем обстоятельством, что вирус КЭ обладает способностью длительно персистировать в ЦНС и органах иммунной системы (от нескольких месяцев до нескольких лет). Основная опасность использования противовирусных препаратов при КЭ заключается в часто наблюдаемой трансформации острых форм КЭ в хронические формы на фоне применения таких средств. Существенным ограничением для поиска и внедрения в практику противовирусных препаратов является развитие в организме при КЭ целого ряда иммунопатологических реакций, что препятствует применению иммуномодуляторов. В связи с этим разработка лечебно-профилактических ЛС против КЭ является весьма актуальным.

Существует широкая антигенная вариабельность этого вируса. Чаще всего при химиотерапевтических исследованиях используют штаммы Соффин и Абсеттаров, а также штаммы вируса КЭ, недавно изолированные в ходе полевых исследований. Вирус КЭ обладает цитопатогенным действием в культуре клеток почки эмбриона свиньи СПЭВ, ВНК-21, культуре клеток почек зеленой мартышки (Vero, 4647), хорошо размножается в фибробластах куриного эмбриона (ФЗК).

6.4.1. Подавление ЦПД вируса КЭ in vitro

Клетки выращиваются в микропанелях. Вирус титруется обычным способом и в присутствии различных концентраций противовирусного препарата. Учет проводится в присутствии витального красителя.

6.4.2. Подавление бляшкообразования

Вирус КЭ образует характерные бляшки под агаровым покрытием при репродукции в культуре клеток СПЭВ. Противовирусный препарат может быть добавлен в агаровое покрытие. Учитывается число бляшек при титровании вируса КЭ с добавлением и без добавления препарата в агаровое покрытие.

6.4.3. Подавление репродукции вируса КЭ в клетках СПЭВ

Вирус КЭ выращивается в культуре клеток СПЭВ без добавления и в присутствии противовирусного препарата в 2–3 концентрациях. Репродукция вируса оценивается по цитопатогенному действию на клетки, иммуноферментным методом и по инфекционности вируса с помощью последующего титрования вирусного потомства методом бляшек.

6.4.4. Подавление вирулентности вируса в исследованиях на мышях

При интрацеребральном заражении вирус КЭ вызывает гибель белых беспородных мышей массой 5–6 г. Вирус титруется в присутствии и в отсутствие противовирусного препарата. Оценивается удлинение времени жизни и летальность животных. В работу берутся не менее 2–3 концентраций противовирусного препарата. Одним из ведущих критериев безопасности препарата является отсутствие у выживших животных (после введения вируса и препарата) инфекционного вируса в ЦНС, селезенке и лимфоузлах

через 30–60 сут после заражения вирусом и введения препарата. Наличие или отсутствие инфекционного вируса определяют традиционными методами *in vivo* (на 2–3-дневных сосунках беспородных белых мышей) или *in vitro* (на культуре клеток СПЭВ).

Заключение

Таким образом, перечисленный комплекс методов позволяет выявить специфическую противовирусную активность нового соединения, в определенной степени выяснить механизм его действия и рекомендовать для клинического изучения.

Относительно требований, характеризующих токсичность новых противовирусных веществ: изучение их влияния на функциональное состояние ряда органов и систем, определение острой и хронической токсичности проводится по программе, предусмотренной официальными документами Минздравсоцразвития России для всех новых веществ, представляемых для получения разрешения на клиническое изучение.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Андреева О.Т., Амбросьева Г.В. Модели экспериментального герпеса и их применение для изучения антивирусных веществ // Методические проблемы экспериментальной химиотерапии вирусных инфекций. — Минск, 1980. — С. 89–96.
2. Вотяков В.И., Бореко Е.И., Владыко Г.В. и др. Первичное изучение антивирусных свойств синтетических и природных соединений. — Минск, 1986. — 25 с.
3. Галабов А.С., Галегов Г.А. Методические аспекты химиотерапии вирусных инфекций // Acta Virol. — 1978. — Т. 22. — С. 343–348.
4. Галегов Г.А., Пушкарская Н.Л., Леонтьева Н.А. и др. Программа экспериментального изучения антивирусных (антигриппозных) препаратов и критерии их поэтапной оценки // Вопр. вирусологии. — 1976. — № 4. — С. 503–507.
5. Дерябин П.Г., Львов Д.К. Высокопродуктивный вариант вируса гепатита С. Выделение, характеристика, идентификация. Доклады Академии наук РФ, 1998. — Т. 358, № 5. — С. 688–691.
6. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты (2-ое издание). — М.: Геотар Медиа, 2006 г.
7. Ильенко В.И. Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа. — Л., 1977. — 34 с.
8. Ларина Г.И., Левкович Е.И. Взаимосвязь генотипа животного и штаммовых особенностей вируса с течением экспериментального клещевого энцефалита // Вопр. вирусологии. — 1983. — № 3. — С. 345–348.
9. Леннет Э. и Шмидт Н. Лабораторная диагностика вирусных и риккетсиозных заболеваний, М.: Медицина, 1974 г.
10. Ленева И.А., Фадеева Н.И., Федякина И.М., Гуськова Т.А. и др. Применение иммуноферментной индикации вирусспецифических антигенов в изучении нового противовирусного препарата арбидола. ХФЖ, 1994, №9, 4–8.
11. Методы испытания и оценки противовирусной активности химических соединений в отношении вируса гриппа (Методические указания). Ленинград: МЗ СССР, 1977.
12. Чижов Н.П., Лукьянова Р.И. Модель экспериментальной инфекции Пиксуна у белых мышей // Вопр. вирусологии. — 1985. — № 2. — С. 214–215.
13. Шашихина М.Н., Челнов В.М., Жаврид С.В. Применение микрометода тканевых культур для массового отбора антивирусных средств // Методические вопросы научной разработки противовирусных средств. — Минск, 1977. — С. 55–61.
14. Aparecida M., Brito V.P., Carmo L. et al. Emprego di microtecnica na triagem de substancias antivirais // Rev. Microbiol. — 1981. — Vol. 12, № 3. — P. 65–69.
15. Berenbaum M. C. A method for testing for synergy with anv number of agents // J. Infectious Diseases. — 1978. — Vol. 137. — P. 122–130.

16. Finter №. B. Methods for screening *in vitro* and *in vivo* for agents active against mvxoviruses // Ann. № Y. Acad. Sci. – 1970. – Vol. 173, \ 1. – P. 131–138. Heider H., Adamczyk B., Richter B. Evaluation of antiviral substances against influenza A virus strains by the haemadsorption reduction test // Acta Virol. – 1980. – Vol. 21, № 5. – P. 373–376.
17. Langlois M., Rasset S., Denis 1., Aymard M. A micromethod for evaluating the sensitivity of ocular herpes stains to antiviral drugs // Pathol. Biol. – 1983. – Vol. 31, № 6. – P. 555–559.
18. Lloyd R.E., Weigent D. A., Stanton G. S. Microassay for Sindbis virus and interferon activity// J. Clin. Microbiol. – 1983. – Vol. 18. – P. 296–299.
19. Oxford J.S. Specific inhibitors of influenza virus replication as potential chemoprophylactic agents // J. Antimicrobial Chemotherapy. – 1975. – Vol. 1, № 1. – P. 7–23.
20. Schwobel W., Strelssle G., Kiefer G. Attempts to standardize the screening for antiviral drugs *in vitro* tests // Chemotherapy. – 1979. – Vol. 25. – P. 268–278.
21. Schwobel W., Strelssle G., Kiefer G. Attempts to standardize the screening for antiviral drugs *in vitro* tests // Chemotherapy. – 1979. – Vol. 25. – P. 268–278.
22. Stanberry L.R. Evaluation of herpes simplex virus vaccines in animals: the guinea pig vaginal model // Rev. Infect. Dis., 1991, Vol. 13, Suppl. 11, S 920–923.

Список сокращений

БОЕ – бляшкообразующие единицы
 ВГС – вирус гепатита С
 ВПГ – вирус простого герпеса 1-го и 2-го типа
 ИЛД – индекс лечебного действия
 ИФА – иммуноферментный анализ
 КЭ – клещевой энцефалит
 ЛД – летальная доза
 МПК – максимально переносимая доза
 МФА – метод флуоресцирующих антител
 МЭК – максимально эффективная концентрация
 ОТ-ПЦР – обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция
 РГА – реакция гемагглюцинации
 СПЖ – средняя продолжительность жизни
 ТЦД – тканевое цитопатогенное действие
 ЭМ – электронная микроскопия
 ЦПД – цитопатогенное действие
 ЦТД – цитотоксическое действие
 ХТИ – химиотерапевтический индекс

ГЛАВА 33

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ИНДУКТОРОВ ИНТЕРФЕРОНОВ

*Составители: академик РАМН, проф. Ф.И. Ершов; д. б. н. Э.Б. Тазулахова;
д. м. н. А.Н. Миронов; д. м. н., проф. В.А. Меркулов; к. б. н. А.Н. Васильев*

Введение

В последние годы среди различных форм патологии резко возрос удельный вес вирусных инфекций, таких как грипп, герпес и гепатиты, ВИЧ и многие другие. В связи с этим все большее значение приобретает создание и использование новых препаратов, пригодных для неспецифической терапии и профилактики вирусных инфекций. Особый интерес представляют интерфероны (ИФН) и их индукторы (ИИ), которые обладают одновременно прямым антивирусным действием (этиотропный эффект) и иммуномодулирующей активностью.

Отобранные нами ранее индукторы интерферонов (ИИ), некоторые из которых (циклоферон, полудан, ридостин, кагоцел) в настоящее время широко используются в медицинской практике, представляют собой весьма разнообразное по составу семейство высоко- и низкомолекулярных соединений, обладающих высокой способностью синтезировать собственный (эндогенный) ИФН в организме животных и человека (таблица 1).

Таблица 1

Классификация ранее отобранных индукторов интерферонов

Химическая природа	Препарат
Синтетические соединения	
Низкомолекулярные (ароматические углеводороды)	
Флуореноны Акриданоны	Амиксин Циклоферон, неовир
Полимеры (дсРНК)	
Поли(А).поли(У) Поли(Г).поли(Ц)	Полудан Полигуацил
Природные соединения	
Низкомолекулярные (полифенолы)	
Производные госсипола	Мегасин, рагосин
Полимеры	
ДсРНК	Ларифан, ридостин
Продукты конденсации производных госсипола и водорастворимой ацетилцеллюлозы	Кагоцел, саврац, гозалидон

Ниже приводятся итоги КИ ранее полученных ИИ, показывающие, что эта группа препаратов пригодна для профилактики и лечения ряда вирусных инфекций, а также некоторых заболеваний невирусной **этиологии** (таблица 2).

Клиническое применение индукторов интерферона

Название препарата	Клинические показания
Амиксин	Герпес, вирусные гепатиты, энтеровирусные инфекции, грипп и др. ОРВИ, бактериальные заболевания
Кагоцел	Грипп и др. ОРВИ, генитальный герпес
Ларифан	Грипп и др. ОРВИ, различные формы герпеса (генитальный, офтальмогерпес, опоясывающий), гепатит В
Мегосин	Герпес 1 и 2 типа, опоясывающий лишай
Неовир	Герпесвирусные инфекции, острый вирусный гепатит А, хронические вирусные гепатиты В и С, грипп и др. ОРВИ
Полудан	Герпетический кератит и кератоконъюнктивит
Ридостин	Арбовирусные инфекции, герпес, хламидиоз
Циклоферон	Гепатит, герпес, ВИЧ-инфекция, хламидиоз

1. Цели и задачи исследования

В настоящих методических рекомендациях суммированы методы, используемые для доклинической оценки специфической активности новых клинически перспективных ИИ.

Специальные разделы рекомендаций посвящены определению динамики продукции интерферонов в ответ на введение этих фармакологических веществ *in vitro* и *in vivo*, определению противовирусной, интерферониндуцирующей, иммуномодулирующей, антитуморогенной и радиопротективной активности ИИ, способности ИИ синтезировать интерферон и цитокины в различных органах и тканях, определению гипореактивной фазы при повторном введении ИИ и ряд других свойств этих препаратов.

2. Первичный скрининг индукторов интерферонов *in vitro*

Первичный этап изучения ИИ включает определение *in vitro* токсичности и максимально переносимой концентрации препарата, его противовирусной и интерферониндуцирующей активности.

Основные материалы и методы

Вирусы. Для первичного отбора ИИ целесообразно использовать вирусы, которые отличаются высокой чувствительностью к действию интерферонов и имеют короткий цикл размножения – венесуэльского энцефаломиелита лошадей (ВЭЛ), Синдбис (ВС), везикулярного стоматита, штамм Индиана (ВВС) и энцефаломиокардита мышей (ЕМС).

Клетки. В работе могут быть использованы клетки, чувствительные к действию ИФН: первично трипсинизированные клетки – фибробласты эмбрионов кур (ФЭК) и человека (ФЭЧ), почки и легкие эмбрионов человека (ПЭЧ и ЛЭЧ), а также перевиваемые клетки диплоидных фибробластов человека (ДФЧ) и культуры мышинных (L929) и обезьяньих (BSC-1) клеток.

Поскольку огромное большинство индукторов ИФН, к числу которых относятся многие низкомолекулярные вещества (акриданоны, флуореноны и др.), неспособны индуцировать синтез ИФН в фибробластах, с целью определения интерферониндуцирующей способности таких препаратов в работе могут быть использованы клетки периферической крови мышей. Методы выделения клеток периферической крови описаны в разделе «Определение интерферониндуцирующей активности препарата *in vivo*».

Культивирование клеток. В работе используют 24-часовой монослой клеток, выращенных в 96-луночных плоскостонных планшетах в среде RPMI 1640 или двойной среде; иглу с добавлением 10% прогретой бычьей (для первичных клеток) или 10% телячьей

эмбриональной сыворотки, глутамина (0,3 мг/мл) и гентамицина (0,08 мг/мл) в термостате с CO_2 .

Иммунокомпетентные клетки культивируют в круглодонных 96-луночных планшетах в среде RPMI 1640 с добавлением 10% телячьей эмбриональной сыворотки, глутамина (0,3 мг/мл) и гентамицина (0,08 мг/мл) в термостате с CO_2 .

Эталонные индукторы ИФН. В качестве эталона может быть использован комплекс поли (И)- поли(Ц) фирмы «Calbiochem», а также амиксин, ридостин и циклоферон.

2.1.1. Определение токсичности индуктора ИФН in vitro

Готовят 10-кратные разведения препарата, в культуральной среде, обычно от 1000 до 0,01 мкг/мл и вносят в культуры клеток, достигших монослоя (по 4 повтора на каждое разведение). Контакт препарата с клетками осуществляют 4 и 24 ч при 37°C, после чего планшеты микроскопируют для определения цитодеструктивного действия, отмечаемого по 4-крестовой системе, по методу Финтера, где 100% деструкция клеток обозначается 4+, 25% — 1+. Минимальная концентрация препарата, вызывающая цитотоксический эффект на 50% (++) , рассматривается как цитопатогенная доза (ТЦД₅₀). На основании полученных данных определяют максимально переносимую концентрацию препарата (МПК), которая составляет ¼ ТЦД.

2.1.2. Исследование интерферониндуцирующей активности препарата in vitro

ИФН обладают видовой специфичностью. Поэтому первичную оценку интерферониндуцирующей активности препарата проводят в культуре первично трипсинизированных или диплоидных клеток человека и животных (в зависимости от условий эксперимента). Пробы культуральной жидкости (по 4 повтора на каждое разведение) берут через 4 и 24 ч после контакта изучаемого препарата с клетками. Параллельно (в качестве контроля) используют стандартные индукторы ИФН в максимальной интерферониндуцирующей концентрации, рекомендованной для каждого эталонного индуктора ИФН. Собранные пробы хранят при температуре –20°C.

Титрование ИФН проводят в 96-луночных плоскодонных планшетах с культурой диплоидных фибробластов человека (ДФЧ) или животного, выращенных в ростовой среде до образования монослоя. В качестве индикаторного тест-вируса используют вирус энцефаломиокардита мышей (ЕМС). За единицу активности ИФН (Ед/мл) принимают величину, обратная его максимальному разведению, которая защищает 50% клеток от цитопатогенного действия 100 ТЦД₅₀ вируса. В каждом титровании используется также референс-препарат ИФН для перевода полученной активности ИФН в международные единицы (МЕ).

2.1.3. Определение противовирусной активности исследуемого препарата

После удаления из опытных планшет культуральной жидкости для определения уровня ИФН, индуцированного различными концентрациями исследуемых препаратов, клетки заражают тест-вирусом в дозе, вызывающей 100% поражение клеток (ТЦД₅₀) через 24–48 ч после заражения. В качестве контроля используют клетки, не обработанные препаратами.

Определение противовирусного действия препарата проводят методом титрования проб, собранных через 24 ч после заражения вирусом культуры клеток, чувствительных к данному вирусу, выращенных в плоскодонных планшетах. Исследование противовирусной активности препаратов в иммунокомпетентных клетках не проводят.

2.1.4. Оценка результатов исследования препаратов in vitro

При оценке результатов исследования препаратов в культуре клеток основным следует считать их способность индуцировать продукцию интерферона.

Противовирусная активность учитывается в том случае, если у препарата обнаруживается интерферониндуцирующая активность. Для оценки противовирусной актив-

ности пригодны параметры, разработанные для широкого круга химиотерапевтических препаратов, обладающих этим свойством. Противовирусная активность соединения оценивается по степени ингибиции размножения тест-вируса. Препаратом, обладающим выраженным антивирусным эффектом, следует считать соединение, подавляющее размножение вируса в культуре клеток на 1,7–2,0 lg.

При обнаружении способности препарата индуцировать в клетках ИФН следует определить минимально эффективную концентрацию препарата (МЭК), что позволит вычислить химиотерапевтический индекс (ХТИ) исследуемого вещества *in vitro*. ХТИ представляет собой отношение максимально переносимой концентрации (МПК) к минимально эффективной концентрации (МЭК):

$$\text{ХТИ} = \frac{\text{МПК}}{\text{МЭК}}.$$

Схема первичной оценки препаратов *in vitro*, таким образом, включает три основных параметра (интерферониндуцирующая способность, антивирусное действие и ХТИ).

Таблица 3

Оценка эффективности индукторов интерферона *in vitro*

Показатель эффективности	Неактивные, слабоактивные	Активные	Высокоактивные
Титры ИФН МЕ/мл	<4–8	>16–32	>32–64
Снижение титра вируса, lg	<1,78	>1,78	>3–6
ХТИ	<4	>8	>16

2.2. Первичный отбор индукторов интерферона *in vivo*

Первичная оценка индукторов ИФН *in vivo* проводится, как правило, на белых беспородных мышах или мышах линии СВА и включает несколько этапов.

1. Определение ЛД₅₀ препарата при внутрибрюшинном введении.
2. Определение индукции сывороточного ИФН через 6 и 24 ч после внутрибрюшинного введения препарата.
3. Определение противовирусной активности на мышах по показателю защиты от смертельной вирусной инфекции.
4. Определение безвредности препарата.

Основные материалы и методы

Вирусы. При изучении ИИ *in vivo* целесообразно использовать вирусы, отличающиеся высокой чувствительностью к действию интерферонов, одним из них может, в частности, служить вирус энцефаломиокардита мышей (ЕМС).

Животные. В работе используются мыши линии СВА и нелинейные белые мыши, массой 10–12 г и 16–18 г.

Эталонные индукторы ИФН.

В качестве эталонных могут быть использованы известные индукторы ИФН с коммерческими названиями — амиксин, ридостин и циклоферон в максимально эффективных концентрациях *in vivo*.

Титрование ИФН осуществляется по методике, описанной выше, в культуре мышечных перевиваемых клеток L 929 с использованием индикаторного тест-вируса — ЕМС.

2.2.1. Определение ЛД₅₀ препарата *in vivo*

ЛД₅₀ препарата определяют на белых нелинейных мышах, массой 10–12 г. Животным внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл вводят препарат в различных концентрациях. Каждый день в течение 2 недель регистрируют смертность животных и затем вычисляют ЛД₅₀ препарата по одному из общепринятых методов.

2.2.2. Определение интерферониндуцирующей активности препарата *in vivo*

Для определения интерферониндуцирующей активности препарата используют мышей массой 18–20 г, которым внутрибрюшинно вводят разные концентрации исследуемого препарата, меньшие 1/4–1/16 ЛД₅₀. Через 6 и 24 ч после введения препарата у животных собирают кровь. Эти сроки рекомендуется использовать для того, чтобы в испытываемой зоне учесть препараты с различной динамикой продукции стимулируемого ИФН. Для забора крови и приготовления сыворотки используются обычные методы. Для каждой пробы используют не менее 4–5 животных. Пробы ИФН титруют параллельно с контролем и стандартом мышиноного ИФН по ЦПД, вызываемому ЕМС на перевиваемой линии мышинных клеток L 929, выращенных на пластиковых плоскостонных 96-луночных планшетах описанным выше способом.

2.2.3. Определение противовирусной активности препарата по выживаемости животных

Определение противовирусной активности *in vivo* производят на белых беспородных мышях массой 10–12 г. На каждое условие эксперимента используют по 10 животных. Предварительно выбирают инфицирующую дозу вируса. С этой целью вирус, используемый для моделирования экспериментальной инфекции, титруют на мышах и высчитывают инфицирующую дозу вируса, которая должна вызывать от 80 до 95% погибших животных. Препарат в ранее определенных *in vivo* интерферониндуцирующих дозах вводят мышам внутрибрюшинно в объеме 0,2 мл за 24 и 2 ч до заражения вирусом. На каждое условие эксперимента используют не менее 10 животных. Наблюдение проводят в течение 14 дней ежедневно, отмечая количество погибших животных, и высчитывают количество оставшихся живыми в %. Если выживаемость составляет менее 30% — препарат считается слабоактивным, от 30 до 60% — активным и более 60% — высокоактивным.

2.2.4. Определение химиотерапевтического индекса

ХТИ представляет собой отношение минимальной токсической дозы (МТД) к минимальной эффективной дозе (МЭД).

$$ХТИ = \frac{МТД}{МЭД} \times МТД = \frac{ЛД_{50}}{4}.$$

Соединения, имеющие ХТИ < 4, считаются слабоактивными, > 8 — активными и > 16 — высокоактивными.

Таблица 4

Оценка эффективности индукторов ИФН *in vivo*

Показатель эффективности	Неактивные, слабоактивные	Активные	Высокоактивные
Титры ИФН МЕ/мл	<32	>32–100	>100
Выживаемость в %	<30	>30–60	>60
ХТИ	<4	>8	>16

Следующим этапом в изучении отобранных в результате скрининга индукторов интерферона является исследование безвредности индукторов интерферонов (отсутствие острой и хронической токсичности, аллергенности, эмбриотоксичности, мутагенности, карцерогенности). Безвредность препаратов изучают в следующих тестах:

2.2.5. Определение токсичности на животных

Острая токсичность ИИ исследуется на мышах и собаках, которым исследуемый препарат вводится в виде водного раствора однократно. Выбирается оптимальный спо-

соб введения препарата (перорально, внутривенно или подкожно). Каждая доза испытывается не менее, чем на 6 животных. Токсической дозой считается та, при которой погибает 50% животных. Препарат проходит исследования на токсичность, если токсическая доза превышает оптимальную интерферониндуцирующую по крайней мере в 10 раз.

Переносимость и безвредность ИИ исследуется на собаках, которым препарат вводится однократно в разных дозах. Оценка производится по поведению экспериментальных животных.

Хроническая токсичность препарата исследуется на крысах. Отмечается потребление корма и воды, состояние волосяного покрова, слизистых оболочек, показателей всех систем организма (ССС, ЦНС, выделительной). После окончания эксперимента (обычно через 15 дней) проводятся патологоанатомические исследования.

2.2.6. Определение аллергизирующих свойств препарата

Изучение местнораздражающего и кожно-резорбтивного действия исследуемых препаратов проводится на кроликах породы Шиншилла массой тела 2,5–3,0 кг при однократном нанесении препарата на кожу и введении в конъюнктивальный мешок глаза.

Сенсибилизирующее действие препарата испытывается в реакциях кожной анафилаксии и гиперчувствительности замедленного типа на мышах.

Исследование реакций прямой дегрануляции тучных клеток — на крысах.

Конъюнктивальная проба изучается на морских свинках.

Препарат считается не обладающим аллергенными свойствами, если в дозе, превышающей в 10 раз терапевтическую, он не выявляет анафилактических реакций, положительных реакций конъюнктивальных проб, реакции дегрануляции тучных клеток и гиперчувствительности замедленного типа.

2.2.7. Эмбриотоксическое действие препарата

Эмбриотоксическое действие препарата изучается на крысах (линейные самки), разделенных на 4 группы. Препарат вводится ежедневно в терапевтических дозах и превышающих в 10 раз терапевтический уровень в течение всего периода беременности. Исследуются показатели:

Гибель эмбрионов в получающей препарат и контрольной (в качестве плацебо вводится дистиллированная вода) группах.

Размер плодов, состояние внутренних органов плодов, аномалии развития, дефекты скелета.

2.2.8. Мутагенные свойства препарата

Учет аббераций хромосом в клетках костного мозга мышей СВА, которым препарат вводят однократно в дозе, превышающей терапевтическую по крайней мере в 10–15 раз, и многократно в течение 8 дней.

Учет доминантных летальных мутаций в зародышевых клетках мышей при однократном введении препарата.

Учет генных мутаций на микроорганизмах в тесте Эймса.

При отсутствии токсичности, эмбриотоксичности и мутагенности исследуемых препаратов приступают к углубленному исследованию биологических свойств ИИ.

3. Углубленное доклиническое изучение индукторов интерферонов

Отобранные в результате первичного скрининга наиболее высокоактивные и малотоксичные индукторы интерферона подвергаются углубленному исследованию, которое включает следующие тесты:

— исследование способов введения и определение динамики продукции ИФН;

- определение интерферонпродуцирующей способности иммунокомпетентных клеток (спленоцитов, тимоцитов, клеток периферической крови и костного мозга) в ответ на индукцию исследуемым препаратом;
- определение способности синтезировать ИФН различными органами и тканями мышей в ответ на индукцию исследуемым препаратом;
- определение гипореактивной фазы *in vitro* и *in vivo*;
- определение иммуномодулирующего эффекта;
- определение антитуморогенной и радиопротективной активности;
- определение спектра противовирусного действия;
- отработка оптимальных схем введения.

Основные материалы и методы

Вирусы. При изучении противовирусного эффекта препаратов *in vivo* целесообразно использовать вирусы, вызывающие заболевания животных, сходные с соответствующими инфекционными заболеваниями человека (вирусы гриппа, герпеса, гепатита, бешенства, энцефалита).

Животные. В работе используют мышей линии СВА и нелинейных белых мышей, массой 10–12 г и 16–18 г.

Эталонные индукторы ИФН. В качестве эталонных могут быть использованы следующие индукторы ИФН: амиксин, ридостин и циклоферон в максимально эффективных концентрациях при исследованиях *in vivo*.

Культивирование клеток и титрование ИФН осуществляется по методикам, описанным выше.

3.1. Определение динамики продукции ИФН и способов введения препарата *in vivo*

Исследование способов введения и определение динамики продукции ИФН в ответ на индукцию тестируемого препарата является необходимым этапом для оптимизации схем его введения. Исследования желательно проводить на мышах линии СВА, т. к. эти животные обладают высокой способностью к продукции ИФН.

Для определения динамики продукции ИФН используются мыши, массой 18–20 г, которым препарат вводят в объеме 0,2 мл разными способами (внутрибрюшинно, внутривенно, внутримышечно, подкожно, перорально, интраназально и ректально). При внутрибрюшинном, внутривенном, внутримышечном и подкожном способах препарат вводят в максимально эффективной дозе, установленной в ходе доклинического отбора препарата *in vivo*. При внутримышечном, пероральном, интраназальном и ректальном способах введения, кроме этой дозы используют еще одну концентрацию препарата, равную 1/10 максимально эффективной дозы, поскольку в ряде случаев при этих способах введения индукторов максимальный эффект достигается при использовании вещества в концентрациях в 5–10 раз меньших, чем при внутрибрюшинном его применении. Через 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72 и 96 ч после введения препарата у животных собирают кровь и определяют концентрацию ИФН в сыворотке. В связи с тем что у линейных мышей результаты колеблются в незначительном диапазоне, можно использовать по 4 мыши на каждую точку.

Для забора крови, приготовления сыворотки и титрования ИФН используют стандартные методы.

3.2. Определение интерферонпродуцирующей способности иммунокомпетентных клеток в ответ на индукцию исследуемым препаратом

Индукторы ИФН обладают уникальной способностью «включать» синтез ИФН в определенных популяциях клеток и органов, что в ряде случаев имеет определенные

преимущества перед мультипотентной стимуляцией иммуноцитов интерферонами. При этом надо иметь в виду, что при разных способах введения препарата в продукции ИФН могут принимать участие различные органы, ткани и клетки иммунной системы.

Одним из важных этапов доклинического исследования индукторов ИФН является определение интерферонпродуцирующей способности иммунокомпетентных клеток (спленоцитов, тимоцитов, клеток периферической крови, лимфоузлов и костного мозга) в ответ на индукцию исследуемым препаратом. Этот тест может помочь установить какие клетки иммунной системы принимают участие в продукции ИФН в ответ на индукцию исследуемым препаратом. Исследование проводят 3-мя методами.

1. Интерферонпродуцирующая способность различных клеток иммунной системы, выделенных от интактных животных в ответ на индукцию исследуемым препаратом. Этот эксперимент позволяет ответить на вопрос: способны ли и в какой степени те или иные клетки иммунной системы синтезировать ИФН в ответ на индукцию исследуемым препаратом. С этой целью обескровливают 5 интактных животных линии СВА, массой 18–20 г, собирая кровь в центрифужную пробирку с 1–2 каплями гепарина. Затем животных препарируют, собирая в отдельные емкости со средой (RPMI 1640 с добавлением 0,08 мг/мл гентамицина) берцовые кости, тимусы, подмышечные лимфоузлы и селезенки. Клетки из тимуса, лимфоузлов и селезенки выдавливают в стерильные чашки Петри при помощи шпателя, а из костей — при помощи шприца с тонкой иглой, дважды отмывают центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин в растворе Хенкса, суспендируют в малом объеме среды RPMI, подсчитывают концентрацию клеток в камере Горяева и разводят средой инкубирования до конечной концентрации $5-10 \times 10^6$ кл/мл. Кровь разводят в 10 раз той же средой. Клетки индуцируют максимально эффективной дозой препарата, установленной *in vitro*, и инкубируют в 96-луночных круглодонных планшетах (по 3 лунки на условиях эксперимента). Пробы культуральной жидкости собирают через каждые 24 ч в течение 3–5 сут. Титры ИФН исследуют в гомологичной культуре клеток L929 методами, описанными выше.

2. Интерферонпродуцирующая способность клеток иммунной системы, выделенных от животных, индуцированных различными способами. Данный метод позволяет ответить на вопрос: какие клетки иммунной системы принимают участие в продукции ИФН при разных способах введения исследуемого препарата?

Клетки выделяют из животных, индуцированных разными способами, описанными выше. Для эксперимента используют максимально эффективные *in vivo* концентрации препарата. Выделение и культивирование клеток, а также отбор проб и титрование ИФН осуществляют так же, как в предыдущем эксперименте.

3. Определение способности синтезировать ИФН различными органами и тканями мышей в ответ на индукцию исследуемым препаратом.

Метод позволяет уточнить эффективность разных способов введения вещества и наметить круг инфекций, при которых данный препарат может оказаться эффективным.

Для определения динамики продукции ИФН в различных органах используют мышей, массой 18–20 г, которым препарат вводят в объеме 0,2 мл разными способами, описанными выше, в максимально эффективной концентрации для данного способа введения вещества. Через 4, 24, 48, 72, 96 и 120 ч животных (по 4–5 на каждую точку) подвергают эвтаназии и стерильно извлекают в отдельные емкости мозг, легкие, кишечник, печень, мышцы.

Собранные органы взвешивают, растирают в стерильных ступках, предварительно обработанных хромпиком, чтобы остатки детергента не влияли на определение активности ИФН. Для снижения активности протеаз в тканях все процедуры осуществляют на холоде в кратчайшие сроки. Ступки предварительно охлаждают при 4 °С, помещая в ледяную баню. Выделение ИФН осуществляют в буфере Нерес 10 mM. Для предотвращения протеолитического гидролиза ИФН в элюирующий буфер добавляют контрикал до конечной концентрации 500 ЕД/мл. Для получения 20% взвеси добавляют 4 мл

раствора на 1 г ткани. Разрушение клеток осуществляют трехкратным замораживанием и оттаиванием образцов жидким азотом, который приливают прямо в ступки. Для более полной элюции ИФН, связанного с мембранами, пробы обрабатывают $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$, которую добавляют до конечной концентрации 10 мМ. Пробы инкубируют при 4°C 2 ч, после чего удаляют нерастворимый осадок центрифугированием (500 об/мин в течение 30 мин). Титры ИФН в надосадочной жидкости определяют методами, описанными выше.

Нейтрализацию $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ в пробах проводят непосредственно перед титрованием ИФН, для чего добавляют в раствор соли двухвалентных катионов Ca^{++} и Mg^{++} . Молярное соотношение $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ /двухвалентные катионы составляет 1:0,6 или 1:0,8.

Ниже приводятся примеры, иллюстрирующие эффективность метода.

Таблица 5

Влияние химической обработки тканей на уровень тестируемого ИФН (Ед/мл)

Исследуемый орган	Химические добавки			
	–	$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$	Контрикал	$\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ + контрикал
Мозг	160	10000–25000	10	200
Селезенка	10	640	10	400
Мышцы	10	100	10	100
Кишечник	10	10	5000–10000	10000

Из представленных данных видно, что добавление $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ к пробам мозга, селезенки и мышц существенно повышает выход тестируемого ИФН, в то время как добавление $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ к пробам кишечника не влияет на биологическую активность выделенного ИФН. Наоборот, контрикал не повышает выход ИФН из тканей мозга, селезенки и мышц, в то время как его добавление существенно увеличивает выход ИФН из кишечника.

Поскольку комплексная обработка в ряде случаев оказывается менее эффективной, для определения биологической активности ИФН в кишечнике рекомендуется применять контрикал, а $\text{Na}_2\text{ЭДТА}$ — для определения в других органах и тканях.

4. Определение гипореактивной фазы *in vitro* и *in vivo* при введении индукторов интерферонов

Долгое время считалось, что индукторы ИФН активны только при профилактическом применении. Циркуляция ИФН в организме животных и человека в ответ на введение индуктора ИФН ограничена, как правило, 2-я сутками. Это ограничение связано с тем, что ИФН, образовавшийся в организме животных и человека в ответ на введение исследуемого препарата, быстро выводится из кровотока. Кроме того, вслед за индукцией ИФН, параллельно с продукцией, происходит быстрое включение контрольных механизмов синтеза ИФН, которое влечет за собой период рефрактерности (неспособности синтеза ИФН в ответ на повторную индукцию тем же препаратом как *in vitro*, так и *in vivo*). Эта фаза наступает после достижения максимума продукции ИФН. Рефрактерность развивается в ответ на первое введение препарата. Повторное введение индуктора только помогает выявить фазу гипореактивности. Рефрактерное состояние организма необходимо учитывать при разработке схем применения индуктора (кратности и сроков повторного введения исследуемого препарата).

Рефрактерность до последнего времени была одним из ограничений применения индукторов ИФН, поскольку повторное введение индуктора в организм, находящийся в состоянии гипореактивности по меньшей мере нецелесообразно.

Рефрактерное состояние клеток (организма) обусловлено механизмами, ограничивающими способность клеток синтезировать ИФН и, в частности, образованием белков-репрессоров, контролирующих продукцию ИФН. Белок-репрессор, образовавшийся в ответ на индукцию конкретным индуктором, обладает тканевой специфичностью и специфичностью по отношению к индуктору.

Поэтому длительность фазы рефрактерности зависит как от клеток, так и от использованного индуктора и места введения препарата в организм.

4.1. Определение гипореактивной фазы *in vitro*

Удобным методическим приемом для определения гипореактивной фазы является повторное внесение индуктора ИФН в культуральную жидкость через определенные интервалы времени.

С этой целью используют культуру первично-трипсинизированных или диплоидных клеток человека и животных, выращенных в 96-луночных плоскодонных планшетах. Степень ИФН ответа клеток оценивают по титрам ИФН, регистрируемым в культуральной жидкости, собранной (по 3 лунки на условие) через 18 ч после повторного использования индуктора. Титрование ИФН осуществляют в гомологичной культуре методами, описанными выше.

4.2. Определение гипореактивной фазы *in vivo*

Для определения рефрактерной фазы *in vivo* используются мыши линии СВА и нелинейные белые мыши, массой 16–18 г. Животным вводят препарат внутривенно в максимально эффективной концентрации. Повторное введение препарата в той же концентрации осуществляется через определенные интервалы времени. Животных обескровливают через интервал времени, необходимый для осуществления полноценного синтеза, индуцированного данным препаратом. ИФН в сыворотке крови исследуют, титруя пробы ИФН в культуре клеток L 929, методами, описанными выше.

5. Определение иммуномодулирующей активности индукторов интерферонов

Помимо этиотропного действия, индукторы ИФН обладают, подобно ИФН, выраженной иммуномодулирующей активностью. Индукторы стимулируют образование не только ИФН, но и ряда других цитокинов, контролирующих гемопоэз и процессы иммуногенеза. Поэтому следующим этапом является изучение иммуномодулирующей активности исследуемых препаратов. Исследование включает следующие тесты:

1. Определение влияния препарата на абсолютное число лейкоцитов и лимфоцитов периферической крови.
2. Оценка эффективности воздействия препарата на клеточный иммунный ответ (влияние препарата на абсолютное и относительное число Т- и В-лимфоцитов с помощью Е-розеткообразования и иммунофенотипирования).
3. Оценка функционального состояния клеток иммунной системы в ответ на воздействие исследуемого препарата.
4. Определение цитокининдуцирующей активности препарата.

5.1. Оценка эффективности влияния препарата на клеточный иммунитет

Исследуют влияние препарата на относительное и абсолютное число Т- и В-лимфоцитов, ЕК (естественных киллерных клеток), нейтрофилов.

Для определения относительного и абсолютного числа Т- и В-лимфоцитов используют известные тесты иммунофенотипирования, а также Е-розеткообразования.

5.1.1. Определение субпопуляций Т-лимфоцитов

Основано на выявлении теофиллинчувствительных и теофиллинрезистентных лимфоцитов. Определение Т-супрессоров и Т-хелперов проводят в тесте розеткообразова-

ния. Оно основано на том, что Т-супрессоры имеют рецепторы к теофиллину, в то время как Т-хелперы не имеют. При добавлении в среду инкубирования раствора теофиллина он взаимодействует с чувствительными к его действию Т-супрессорами и ингибирует реакцию спонтанного розеткообразования этих клеток с ЭБ. Т-хелперы таких рецепторов не содержат, поэтому при взаимодействии с ЭБ они образуют «розетки» в присутствии теофиллина.

5.1.2. Использование метода проточной цитофлюориметрии для определения субпопуляций лимфоцитов

В последние годы для определения субпопуляций Т-лимфоцитов используют добавление к взвеси лимфоцитов моноклональных антител и комплемента, что приводит к лизису соответствующей фракции лимфоцитов. С помощью моноклональных антител можно выявить все известные субпопуляции Т-, В- и О-лимфоцитов, а также ЕК (естественных киллеров). Для определения поверхностных антигенов лимфоцитов применяются моноклональные антитела, меченные флюорохромом, и проточный цитофлюориметр.

5.2. Оценка эффективности воздействия препарата на гуморальный иммунный ответ

Концентрацию сывороточных иммуноглобулинов основных классов (IgA, IgM, IgG) определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА).

Число IgM-антителобразующих клеток (АОК) селезенки определяют методом локального гемолиза в агаре по Jerne N.K. & Norbin A.A. (1968). Исследования проводят на мышах СВА, массой 18–20 г, иммунизированных внутрибрюшинным введением эритроцитов барана (Э.Б.) в дозе 2×10^8 клеток в объеме 0,5 мл. Препараты вводят внутрибрюшинно в разные сроки по отношению к антигену (Э.Б.). Контрольным животным вводят физиологический раствор в те же сроки и в том же объеме. Селезенки извлекают на 4 сутки после иммунизации животных. Количество прямых АОК подсчитывали по числу зон гемолиза в геле. Число подсчитанных АОК в контроле в расчете на 106 ядросодержащих клеток исследуемого пула клеток селезенки принимают за 100%.

Для определения субпопуляций В-лимфоцитов используют метод иммунофлюоресценции с мембранными иммуноглобулинами.

5.3. Оценка функционального состояния клеток иммунной системы в ответ на воздействие исследуемого препарата

Для характеристики состояния клеточного иммунитета важно оценить не только количество различных популяций лейкоцитов, Т- и В-лимфоцитов и их субпопуляций, но и функциональную активность иммунокомпетентных клеток. Для этой цели используют следующие методы:

- реакцию торможения миграции лейкоцитов (РТМЛ),
- реакцию бластной трансформации (РБТЛ),
- определение хемотаксической активности нейтрофилов,
- определение фагоцитарного индекса нейтрофилов.

5.4. Определение цитокин-индуцирующей способности препаратов

Отражением функциональной активности индукторов ИФН является продукция цитокинов и, в первую очередь, разных антигенных типов ИФН, поскольку известно, что все без исключения антигенные типы ИФН являются иммуномодуляторами.

Определение цитокин-индуцирующей способности препаратов проводят *in vitro* в 24-луночных планшетах. Для этого в планшеты вносят кровь доноров или мышей линии СВА, разведенную в 10 раз в среде RPMI-1640 (с глутамином, 2% телячьей сыворотки и антибиотиками). Затем в планшеты вносят индукторы ИФН в различных

концентрациях, а так же стандартные индукторы ИФН (ВБН, СЭА, ФГА, ЛПС, КонА). Планшеты инкубируют 24 ч в CO₂-инкубаторе при 37 °С. Оставшуюся кровь центрифугируют. Полученную плазму крови и культуральную жидкость после индукции тестируют на присутствие ИФНов, определение их видовой специфичности, а также на наличие других цитокинов.

Количественное содержание цитокинов (ИФН, ИЛ, ФНО, рецепторов цитокинов и др.) в плазме/сыворотке и пробах цельной крови, индуцированных исследуемыми цитокинами и индукторами ИФН, а также антигенный состав ИФН, образованных в результате индукции исследуемым препаратом, определяют методом иммуноферментного анализа (ИФА) с использованием коммерческих тест-систем. Описание метода ИФА приводится выше.

5.5. Определение мРНК цитокинов

Определение наличия или отсутствия синтеза мРНК цитокинов (ИФН, ИЛ, ФНО, рецепторов цитокинов и др.) в мононуклеарах периферической крови (МПК) в ответ на индукцию исследуемым препаратом проводят с использованием методов обратной транскрипции и полимеразной цепной реакции (ОТ-ПЦР).

ОТ-ПЦР представляет собой метод амплификации (увеличение числа копий) фрагмента рибонуклеиновой кислоты, специфической для данного цитокина.

На первом этапе (реакция первой цепочки) одноцепочечную молекулу РНК превращают в комплементарную ДНК (сDNA) в реакции обратной транскрипции с помощью фермента обратной транскриптазы. С этой целью компоненты реакции смешивают с ДНК-праймером и буфером с обратной транскриптазой и инкубируют 1 ч при 37 °С.

На втором этапе (реакция второй цепочки), после того, как обратная транскрипция завершена и на матрице мРНК образована сDNA, далее амплифицируют уже молекулу ДНК, используя традиционный метод ПЦР. Подробное описание метода изложено в главе «изучение противовирусной активности лекарственных средств».

После 30 циклов амплификации образуются миллионы копий нужной последовательности.

6. Определение антитуморогенной и радиопротективной активности индукторов интерферонов

6.1. Исследование антипролиферативного эффекта препаратов

Одним из основных путей реализации биологической, в том числе и противоопухолевой, активности препаратов является их действие на биосинтез, структуру и функцию нуклеиновых кислот. Поэтому задача поиска противоопухолевых веществ сводится к скринингу препаратов, активно подавляющих пролиферацию опухолевых клеток (Raji) и не оказывающих влияния на метаболизм нормальных клеток.

Выраженный антипролиферативный эффект препаратов создает предпосылки для изучения их антиканцерогенной активности. Исследование проводят на различных экспериментальных моделях. Используют экспериментальные модели, вызывающие образование опухолей легких, лимфосаркомы, лейкоза и др.

6.1.1. Экспериментальный канцерогенез, вызванный уретаном

Индукцию опухолей вызывают по методу Шабад Л.М. введением мышам уретана в дозе 1 г/кг массы тела. Препараты вводят внутривентриально или перорально в различных концентрациях за 6 ч до введения уретана, через 1, 3, 6, и 8 сут после инъекции уретана и далее 2 раза в неделю с учетом фазы гипореактивности. Для подсчета новообразований в легких мышей подвергают эвтаназии на 36 день после введения уретана. Интенсивность антиканцерогенного действия уретана определяют по снижению частоты возникновения аденом, количеству аденом на одно животное в контрольной и получавшей препарат группах с последующим расчетом процента торможения развития аденом.

6.1.2. Исследование влияния препаратов на рост перевиваемых опухолей

Влияние препаратов на рост асцитного варианта карциномы Эрлиха. 0,2 мл асцитной жидкости карциномы Эрлиха вводят мышам NMRI массой 18–20 г подкожно. В качестве сравнения животным вводят известный цитостатик **циклофосфан**. Препарат в различных интерферониндуцирующих дозах вводят мышам на 3, 4, 8, 12, 15-й и 19-й день, а цитостатик в дозе 50 мг/кг — однократно на 3-й день после перевивки опухоли. Контрольные животные вместо препаратов получают в те же сроки физиологический раствор. Исследуют объем опухоли в получавшей препарат группе и контроле и средней продолжительность жизни животных. Эффективность исследуемого препарата определяют по разнице результатов в получавшей препарат и контрольной группе: снижению среднего объема опухоли (в мм³) в получавшей препарат группе по сравнению с контролем и увеличению средней продолжительности жизни (СПЖ).

Исследование влияния исследуемых препаратов на рост асцитного варианта лейкоза L1210. Мышам DBA/2, зараженным внутрибрюшинно 0,2 мл асцитной жидкости лейкоза L1210, вводят препарат в те же сроки, что и в предыдущем тесте. В группе сравнения мышам вводят цитостатик. Критериями оценки служит изменение объема опухоли и СПЖ в получавшей препарат и контрольной группах.

Исследование влияния препарата на рост лимфосаркомы Плисса у крыс. Асцитный вариант опухолевой ткани лимфосаркомы Плисса вводят крысам подкожно в объеме 0,2 мл. Препарат в интерферониндуцирующих дозах — на 3, 4, 8, 12, 15-й и 18-й дни после перевивки животным лимфосаркомы. Животным группы сравнения на 3-й день перевивки вводили однократно циклофосфан в дозе 50 мг/кг. Результаты эксперимента оценивают по изменению объема опухоли (мм³) и СПЖ животных.

6.2. Изучение радиопротективного действия исследуемых препаратов

Стимулируя пролиферацию и дифференцировку стволовых клеток костного мозга, индукторы ИФН могут обладать радиопротективными свойствами.

Мышам линии СВА вводят препарат в интерферониндуцирующей дозе за 24 ч до облучения (6,0 Гр.). Исследуют увеличение общего количества клеток в костном мозге по сравнению с контролем облученных животных, количество клеток костного мозга мышей без хромосомных aberrаций, содержание в костном мозге колониеобразующих единиц (КОЕс) и гранулоцитарно-макрофагальных предшественников (КОЕ-ГМ) на 9 сутки после облучения, когда вследствие воздействия радиации содержание их в контроле значительно снижается и, кроме того, количество клеток тимуса и тромбоцитов в крови. Исследуют также выживаемость мышей в получавшей препарат группе по сравнению с контролем.

7. Определение спектра антивирусного действия препарата

Исследование антивирусного эффекта препаратов подробно изложено в «Методических рекомендациях по изучению специфической противовирусной активности лекарственных средств».

8. Отработка оптимальных схем введения индукторов интерферонов

Оптимизация схем введения индуктора состоит из нескольких этапов и включает:

1. Определение оптимальной концентрации препарата (минимальной дозы, при которой достигается максимальный интерферониндуцирующий эффект).
2. Определение наиболее эффективного способа введения.
3. Определение сроков повторного введения препарата.
4. Возможность сочетанного применения исследуемого препарата с другими препаратами.

Определение оптимальной интерферониндуцирующей концентрации препарата и наиболее эффективных способов его введения описаны в соответствующих разделах рекомендаций.

Определение сроков повторного введения препарата.

Целесообразность повторного введения препарата зависит от гипореактивной фазы организма. Существует несколько способов, позволяющих преодолеть кратковременность действия индукторов.

Самым простым способом, иллюстрирующим возможность многократного применения индукторов ИФН, является попытка «обойти» рефрактерную фазу.

Он заключается в использовании способности организма через определенный интервал времени восстанавливать синтез ИФН в ответ на конкретный индуктор. Этот способ широко применяется для разработки схем применения индукторов в клинической практике.

Для того, чтобы разработать схему применения индуктора ИФН по этому принципу необходимо прежде всего определить длительность рефрактерной фазы, которая в каждом конкретном случае будет различна.

Второй способ преодоления гипореактивности как *in vitro*, так и *in vivo* основан на специфичности репрессора по отношению к индуктору и заключается в чередовании введения индукторов, относящихся к различным классам соединений и отличающихся по своей химической структуре. Чередование введения 2-х или более индукторов ИФН разной природы с учетом рефрактерной фазы каждого из них позволяет получать относительно высокие титры ИФН, циркулирующие в кровотоке в течение длительного времени.

Третьим оригинальным способом преодоления рефрактерности к продукции ИФН является смена места введения индуктора. Этот способ основан на том, что при разных способах доставки ИИ синтез ИФН осуществляется локально. В его продукции принимают участие разные тканевые системы организма, и могут быть задействованы различные клеточные популяции.

Методы определения титров ИФН, циркулирующего в кровотоке животных описаны в разделе («Определение гипореактивной фазы *in vivo*»).

9. Возможность комбинации индукторов ИФН с другими медикаментозными средствами

Одним из важных этапов доклинического углубленного исследования индукторов ИФН является изучение способности исследуемых препаратов сочетаться с другими медикаментозными средствами. С этой целью исследуют возможность сочетанного применения исследуемого препарата с:

1. Другими ИИ. Описание метода изложено в разделе определение гипореактивной фазы *in vivo*.

2. Различными цитокинами, включая ИФН.

Исследуются дозы и время введения цитокинов и изучаемых препаратов по отношению друг к другу. Оценка эффективности схем производится по противовирусному действию (аддитивный или синергидный эффект). Методы определения противовирусной активности описаны в соответствующем разделе методических рекомендаций.

3. Иммуномодуляторами.

Для усиления интерферониндуцирующей и иммуномодулирующей активности ИИ рекомендуется их сочетанное применение с иммуномодуляторами. Исследуются дозы и время введения препаратов животным по отношению друг к другу. Эффективность схем определяется по стимуляции интерферонообразования *in vitro* и *in vivo*. Определение титров индуцируемого ИФН описано выше, в соответствующем разделе.

4. Вакцинами.

Поскольку ИИ, как отмечалось выше, способны активировать гуморальный ответ организма, сочетанное их применение с вакцинами, является перспективным для лечения вирусных заболеваний. Исследования проводят на мышах, массой 18–20 г. Вакцины и индукторы ИФН вводят в разные промежутки времени по отношению друг к другу за 24,

4 ч до заражения животных соответствующей дозой вируса (профилактическая схема) и через 4 и 24 ч после заражения (лечебная схема).

5. Традиционными противовирусными препаратами (химиопрепаратами).

В схемах сочетанного применения ИИ противовирусных препаратов обрабатываются дозы и время введения препаратов животным.

Эффективность схем применения исследуемых препаратов с вакцинами и химиопрепаратами определяют по % выживаемости животных. Описание метода изложено в соответствующем разделе: «Изучение специфической противовирусной активности фармакологических веществ».

6. Антибиотиками.

Это исследование может быть полезным при терапии осложненных форм вирусных инфекций и при лечении бактериальных инфекций.

Заключение

В таблице 6 суммированы данные многолетнего доклинического исследования эффективности способов применения, органов-мишеней и спектра активности, **отобранных ранее** ИИ (см. таблицу 1) с помощью описанных выше методов, при различных экспериментальных инфекциях и неинфекционных заболеваниях.

Таблица 6

Результаты доклинического изучения индукторов ИФН

Индуктор	Применение	Органы-мишени	Спектр активности
Аллоферон	Системное (в/м)		Герпес
Амиксин	Системное (в/в, в/м, п/к, п/о)	Кровь, кишечник, печень, лимфоидные органы, мозг	Острые и хронические энцефалиты, бешенство, гепатит, новообразования
	Местное		Герпес, грипп, ОРВИ
Кагоцел	Системное (в/в, в/м, п/о, п/к, рек.)	Кровь, печень, селезенка, почки, кишечник, лимфоидные органы	Грипп, ОРВИ, бешенство, гепатит, клещевой энцефалит, урогенитальные хламидиозы
Неовир	Местное		ОРВИ, урогенитальные хламидиозы
Ларифан	Системное (в/в, в/м, в мозг, п/к, и/н, аэр.)	Кровь, селезенка, мозг, печень, легкие, лимфоидные органы	Грипп, ОРВИ, острые энцефалиты, герпетический менингит, бешенство, новообразования
	Местное		Грипп, ОРВИ, герпетический кератоконъюнктивит, опоясывающий лишай
Мегасин	Местное		Герпетический кератоконъюнктивит, опоясывающий лишай
Полигуацил	Системное (в/в, в/м, п/к, и/н, аэр.)	Кровь, печень, селезенка, легкие, мышцы, лимфоидные органы	Грипп, острые энцефалиты, гепатит, бешенство
Полудан	Местное		Герпетические кератиты, кератоконъюнктивиты

Индуктор	Применение	Органы-мишени	Спектр активности
Ридостин	Системное (в/в, в/м, п/к)	Легкие, мышцы, лим- фоидные органы	Грипп, ОРВИ, хламидиоз, бешенство
	Местное		Кератоконъюнктивиты, грипп, ОРВИ
Рагосин	Системное (в/в, в/м, п/к, п/о)	Кровь, печень, селе- зенка, кишечник	Гепатиты А и В, новообразования
Саврац	Системное (в/в, в/м, п/к, п/о, рект.)	Кровь, селезенка, печень, кишечник, мозг, мышцы, лим- фоидные органы	Бешенство, гепатит А, новообра- зования, энтеровирусные инфек- ции, урогенитальные хламидиозы
	Местное		Грипп, ОРВИ
Циклоферон	Системное (в/в, в/м, п/к)	Кровь, печень, селезенка, легкие, мышцы, мозг	ОРВИ, хламидиозы, гепатиты, бешенство, ВИЧ-инфекции, энцефалиты

В/в – внутривенное, в/м – внутримышечное, п/к – подкожное, п/о – пероральное, и/н – интраназальное, аэр. – аэрозольное, рект. – ректальное.

Полученные с помощью изложенных выше методов результаты экспериментальных исследований разрешенных для медицинского применения ИИ, указывают на возможный спектр клинической активности данных фармакологических веществ. Как оказалось, эти результаты хорошо согласуются с данными проведенных позже КИ тех же ИИ, как это видно при сравнении данных, приведенных в таблицах 2 и 3. Сказанное служит основанием для заключения о информационной ценности рекомендуемых выше методик.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Ершов Ф.И. Антивирусные препараты. Справочник, 2-е издание. – М.: Геотар Медиа, 2006. – 312 с.
2. Ершов Ф.И. Система интерферона в норме и при патологии. – М.: Изд. «Медицина», 1996. – 240 с.
3. Ершов Ф.И., Киселев О.И. Интерфероны и их индукторы (от молекул до лекарств), Москва, «Геотар Медиа», 2005.
4. Ершов Ф.И., Новохатский А.С. Интерферон и его индукторы. – М.: Медицина, 1980. – 173 с.
5. Индукторы интерферона / Под редакцией В.М. Жданова и Ф.И. Ершова. – Москва, 1982. – 185 с.
6. Интерферон – 1989. Сборник научных трудов НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи АМН СССР / Под редакцией Ф.И. Ершова и С.В. Прозоровского, М., 1989. – 158 с.
7. Садыков А.С., Ершов Ф.И., Новохатский А.С. и др. Индукторы интерферона. – Ташкент: Фан, 1978. – 304 с.

ГЛАВА 34

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВОТУБЕРКУЛЕЗНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: проф. В.И. Гольшевская; член.-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова;
д.б.н. М.В. Шульгина; к. б. н. Л.П. Мартынова; д. м. н. Г.Н. Можожкина;
д. м. н., проф. Г.Б. Соколова*

Введение

В связи с расширяющейся эпидемией, проблема борьбы с туберкулезом продолжает сохранять свое значение для здравоохранения России и всего мира. Эффективность лечения больных туберкулезом во многом зависит от разработки, освоения и промышленного производства новых ЛС, обладающих повышенной бактериостатической активностью по отношению к микобактериям туберкулеза (МБТ). Эти исследования являются частью Программы ВОЗ по борьбе с туберкулезной инфекцией. Несмотря на имеющийся в клинике набор противотуберкулезных средств, эффективность их применения снижается из-за быстрого приобретения лекарственной устойчивости микобактерий туберкулеза к наиболее активным противотуберкулезным препаратам. Резистентные к действию известных ЛС МБТ могут длительное время находиться в остаточных очагах инфекции, сохраняя способность к размножению, что приводит к реактивации инфекционного процесса. В этой связи поиск новых противотуберкулезных препаратов, активно воздействующих непосредственно на микобактерий туберкулеза и не вызывающих побочных реакций, является необходимым условием в борьбе с туберкулезной инфекцией. Большое значение здесь имеют микробиологические исследования, при которых изучается эффективность лечения экспериментального туберкулеза с учетом изменения бактериальной популяции, определение бактериостатической и бактерицидной активности новых препаратов в сравнении с традиционно применяемыми. Принципиальные подходы к изучению противотуберкулезной активности различных синтетических и природных соединений не отличаются от методов экспериментальной антимикробной терапии в отношении других микроорганизмов, однако имеют важные особенности, обусловленные биологией микобактерий туберкулеза.

1. Изучение бактериостатической и бактерицидной активности новых противотуберкулезных лекарственных средств в опытах *in vitro*

1.1. Штаммы

В связи с выраженной специфичностью многих ЛС по отношению к *M. tuberculosis*, исследование веществ на бактериостатическую активность должно проводиться, в первую очередь, с использованием лабораторных тест-штаммов *M. tuberculosis* человеческого типа — Academia, H₃₇Rv. Кроме того, в случае обнаружения выраженной антибактериальной активности веществ, целесообразно изучить чувствительность к ним клинических штаммов, т.е. выделенных из патологического материала больных туберкулезом, как чувствительных к основным противотуберкулезным препаратам, так и имеющих различные спектры устойчивости к ним. В случае соединений, гомологичных применяемым

противотуберкулезным препаратам, обязательно тестирование их активности в отношении клинических штаммов, устойчивых к гомологу изучаемого вещества. Целесообразно также изучить действие соединений на микобактерии бычьего и птичьего типа.

Лабораторные (*M. tuberculosis* H₃₇Rv, Academia), а также клинические, штаммы микобактерии туберкулеза с различной степенью резистентности к противотуберкулезным препаратам, могут быть получены из Музея культур и Национальной коллекции штаммов *M. tuberculosis* (ЦНИИТ РАМН, Москва, Яузская аллея, 2 или в НИИ фтизиопульмонологии ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова, Москва, ул. Достоевского, 4).

1.2. Питательные среды и условия культивирования микобактерий

Питательной средой для культивирования микобактерий согласно международным стандартам является плотная яичная среда Левенштейна–Йенсена. Для повышения эффективности культуральных исследований используют плотную питательную среду Финн-2. Использование двух сред одновременно повышает процент выявления МБТ из патологического материала. Штаммы должны регулярно пересеиваться раз в 4 недели. Время роста культуры на плотных яичных средах в среднем составляет 21 день (18–28 дней).

1.2.1. Приготовление сред для культивирования микобактерий

1. Среда Левенштейна–Йенсена.

Состав:

Солевой раствор:

калий фосфорнокислый однозамещенный — 2,4 г

магний сернокислый — 0,24 г

магний лимоннокислый — 0,6 г

L-аспарагин — 3,6 г

глицерин — 12 мл

вода дистиллированная — 600 мл

Реактивы растворяют в указанной последовательности при подогревании, не доводя до кипения, и стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 20 мин. Срок хранения стерилизованной солевой основы — 3–4 недели.

Яичная масса: 24–27 штук (в зависимости от величины) свежих диетических яиц моют в теплой проточной воде щеткой с мылом, погружают на 30 мин в 70% этиловый спирт. Затем яйца разбивают стерильным пинцетом в стерильную посуду с бусами над пламенем горелки, хорошо гомогенизируют, добавляют 600 мл солевого раствора и 20 мл стерильного 2% водного раствора малахитового зеленого. Смесь фильтруют через марлевый фильтр.

Питательную среду разливают в пробирки по 5 мл и свертывают в наклонном положении при 85 °С в течение 45 мин в электросвертывателе с автоматической регулировкой температуры.

2. Среда Финн-2.

Состав:

Солевой раствор:

магний сернокислый — 0,5 г

натрий лимоннокислый — 1,0 г

квасцы железосаммиачные — 0,05 г

калий фосфорнокислый однозамещенный — 20 г

аммоний лимоннокислый однозамещенный — 5,0 г

натрий глутаминовокислый однозамещенный — 10 г

вода дистиллированная — до 1 л

Ингредиенты растворяют в указанном порядке в теплой дистиллированной воде, стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 20 мин.

Яичная масса: 24–27 штук (в зависимости от величины) свежих диетических яиц обрабатывают, как для среды Левенштейна–Йенсена, смешивают с солевой основой и малахитовым зеленым, в тех же объемах, что и для приготовления среды Левенштейна–Йенсена. Питательную среду разливают в пробирки по 5 мл и свертывают при температуре 85 °С в течение 45 мин.

В опытах in vitro кроме плотных питательных сред используется жидкая синтетическая питательная среда Школьниковой.

3. Жидкая среда Школьниковой.

Состав среды:

калий фосфорнокислый однозамещенный — 1,5 г

натрий фосфорнокислый двузамещенный — 2,5 г

магний сернокислый — 0,5 г

натрий лимоннокислый — 1,5 г

железо лимоннокислое аммиачное зеленое, водное — 0,05 г

L-аспарагин — 1,0 г

глицерин — 30 мл

дистиллированная вода — до 1 л

Реактивы последовательно растворяют в теплой дистиллированной воде, подводят рН до 7,0, используя для этого 40% раствор натрия гидроксида. Стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 30 мин.

Перед посевом суспензии микобактерий в среду вводят 10% раствор стерильной плазмы крови человека или инактивированной при 70 °С сыворотки крупного рогатого скота.

1.3. Приготовление стандартного раствора бактериальной суспензии

Культура микобактерий (14–21-дневная), выращенная на плотной яичной среде, в стерильных условиях снимается с косяка платиновой лопаточкой, растирается в пробирке и суспензируется в 0,9% растворе NaCl (физиологический раствор). Далее крупным частицам культуры дают осесть, выдерживая пробирку 20 мин при комнатной температуре. Взвесь бактерий отбирается пипеткой и переносится в другую пробирку. Необходимая оптическая плотность, или мутность, соответствующая 5 стандарту, достигается добавлением в пробирку физиологического раствора. В 1 мл суспензии, соответствующей 5 стандарту оптической плотности, содержится 500 млн микробных тел (5×10^8 микробных тел). Суспензию микобактерий засевают в жидкую среду из расчета 0,2 мл на 2 мл среды. Такой способ засева обеспечивает равномерное внесение посевного материала в пробы.

1.4. Приготовление разведений изучаемых соединений

Исходный раствор испытуемого соединения обычно готовится с использованием стерильного физиологического раствора или дистиллированной воды. В случае низкой растворимости вещества применяют этиловый спирт, диметилсульфоксид (ДМСО) или растворитель, предложенный разработчиками препарата. Навеску вещества растворяют в минимальном объеме растворителя и после этого разводят водой или физиологическим раствором до нужной концентрации. Например, к навеске 10 мг вещества добавляют 1, 2, 3 мл этилового спирта или ДМСО, встряхивают, при необходимости подогревают в теплой водяной бане или в термостате при 37 °С. После этого полученный раствор или гомогенную взвесь доводят водой или физиологическим раствором до необходимой концентрации.

При применении высоких концентраций растворителей необходимо контролировать эффект воздействия этих веществ на рост микобактерий.

В случае изучения веществ — гомологов известных противотуберкулезных препаратов при выборе испытуемых концентраций целесообразно ориентироваться на данные о минимальных подавляющей (МПК) и бактерицидной (МБК) концентрациях этих препаратов.

В случае изучения веществ, относящихся к новым химическим группам, следует испытывать широкий спектр концентраций.

Пример расчета необходимых концентраций для исследования новых соединений в жидкой среде Школьниковой:

I разведение: 10 мг вещества + 10 мл жидкости (дистиллированная вода или другой растворитель) = 10 мл — концентрация 1000 мкг/мл;

II разведение: 1 мл I разведения + 9 мл среды Школьниковой = 10 мл — концентрация 100 мкг/мл. Это и есть исходное рабочее разведение.

1.5. Определение бактериостатической активности

Для выявления бактериостатической активности изучаемых веществ применяют метод серийных разведений. В пробирки разливают по 2 мл питательной среды Школьниковой. Для получения серий необходимых концентраций изучаемых препаратов в первую опытную пробирку наливают 4 мл исходного рабочего разведения. Ряд серийных разведений получают, перенося последовательно из каждой пробирки в следующую по 2 мл жидкости. Из последней, 10-й пробирки, 2 мл жидкости удаляют. Концентрации в данном случае уменьшаются от 100 до 0,195 мкг/мл. Кроме того, в каждом опытном ряду необходимо наличие 2-х контрольных пробирок, содержащих 2 мл среды без препаратов. Далее во все пробирки ряда засевают по 0,2 мл бактериальной суспензии, приготовленной по 5 стандарту оптической плотности. Пробирки закрывают силиконовыми пробками или парафинируют и инкубируют в термостате при 37 °С. В качестве контрольного ряда необходимо применять известные противотуберкулезные препараты.

Рост культуры штамма *Academia* в пробирках без препарата может быть определен визуально на 7–8 день в виде пленки на поверхности среды; рост *H₃₇Rv* — на 10 день как хлопьевидный или зернистый осадок на дне пробирки. Из этого осадка готовятся мазки и окрашиваются по Цилю–Нильсену. Результаты оцениваются на 14 день как по количеству МБТ в полях зрения, так и по интенсивности «косообразования» при микроскопии мазков по следующей схеме:

0 — нет МБТ на 100 полей зрения;

± — 1–9 МБТ — на 100 полей зрения;

+ — от 10 до 100 МБТ на 100 полей зрения;

++ — от 1 до 9 МБТ в одном поле зрения;

+++ — от 10 и более МБТ в одном поле зрения, образование «кос».

Описанный выше метод позволяет определить МПК, т. е. концентрацию вещества, приводящую к частичному (±) или полному (0) подавлению роста МБТ в жидкой среде.

1.6. Определение бактерицидной активности

Вещества с высокой бактериостатической активностью изучаются более подробно, определяется способность их к бактерицидному действию.

Культивирование микобактерий и приготовление разведений веществ в этом случае проводится, как описано выше. Испытуемые концентрации выбираются в соответствии с определенными ранее значениями МПК.

Проверяется различная продолжительность воздействия соединения на культуру микобактерий: 1, 3, 6, 24 ч и 2, 5 и 10 сут. Действие соединения останавливают путем отмывания культуры от изучаемого вещества. Для этого пробирки с культурой центрифугируют при 3000 об/мин в течение 10 мин, надосадочную жидкость сливают, а осажденные микобактерии дважды отмывают 0,9% раствором NaCl.

Отмытые от антибактериального вещества микобактерии суспензируют в 1,0 мл 0,9% раствора NaCl. Из полученной суспензии берут по 0,2 мл и засевают на 2 пробирки с

плотной яичной средой Левенштейна–Йенсена и Финна-2, а также готовят мазки и окрашивают по Цилю–Нильсену.

Результат микроскопии мазков оценивают как по количеству микобактерий в полях зрения, так и по интенсивности «косообразования» в соответствии с приведенной выше схемой.

Учет результатов культуральных исследований проводят через 21–28 дней и 2,5 месяца культивирования в термостате при 37 °С по следующей схеме:

0 — отсутствие колоний МБТ на косяке;

+ — единичные, до 20 колоний;

++ — от 20 до 100 колоний;

+++ — более 100 колоний МБТ.

Жизнеспособность микобактерий в питательной среде можно также оценить при окрашивании мазков по Мурахаши.

1.6.1. Окраска мазков по Цилю–Нильсену

Приготовленные мазки покрывают фильтровальной бумагой и наносят 1,5 мл карболового фуксина на один мазок, затем медленно нагревают предметное стекло с мазком над пламенем горелки до появления пара. При этом не допускают кипение фуксина и высушивание материала. Мазок с прогретым раствором оставляют на 5 мин. Затем удаляют фильтровальную бумагу и аккуратно смывают остатки краски со стекла проточной водой.

Обесцвечивание проводят 25% раствором серной кислоты (2 мл на мазок) в течение 3 мин. Затем промывают препарат проточной водой и дополнительно обрабатывают 96% этиловым спиртом (2 мл на мазок) в течение 5 мин. Гашение фона достигается обработкой 0,3% раствором метиленового синего в течение 30–60 с.

Приготовление растворов:

Все растворы готовятся с использованием дистиллированной воды

1. Насыщенный спиртовой раствор фуксина:

основной фуксин — 3 г,

96% этиловый спирт — 100 мл.

2. Рабочий раствор фуксина:

кристаллы фенола — 5 г,

медленно нагревают до расплавления, доливают 90 мл воды, затем в полученный раствор фенола добавляют 10 мл насыщенного раствора фуксина.

3. 25% раствор серной кислоты:

в 300 мл воды доливают 100 мл 98% (концентрированной) серной кислоты. Данная манипуляция проводится с крайней осторожностью!

4. 0,3% метиленовый синий:

0,3 г метиленового синего растворяют в 100 мл воды.

1.6.2. Окраска люминесцентными красителями (ауромином, родамином)

Мазок фиксируют в сухожаровом шкафу при 80 °С в течение 1 ч, затем окрашивают, нанося 1,5 мл раствора флюорохромов на стекло на 40–50 мин. После окраски мазок промывают проточной водой, обесцвечивают 3% солянокислым спиртом (2 мл) в течение 3 мин и снова промывают водой. Гашение фона достигается обработкой 0,3% водным раствором метиленового синего в течение 30 с, после чего мазок промывают водой.

Приготовление растворов:

Все растворы готовятся с использованием дистиллированной воды.

1. Раствор флюорохромов:

1,0 г аурумина 00 и 0,1 г родамина С отечественного производства, либо родамин В (тетраэтилродамин С26 Н31 СL N2 03- Sigma) растворяют в небольшом объеме воды, затем доводят объем раствора водой до 1000 мл. **Все растворы флюорохромов хранят во флаконах из темного стекла !!!**

2. 3% солянокислый спирт:

8,5 мл концентрированной соляной кислоты добавить в 91,5 мл 96% этилового спирта.

3. 0,3% раствор метиленового синего:

0,3 г метиленового синего растворить в воде и довести до 100 мл водой.

Для микобактерий туберкулеза характерно золотисто-желтое свечение, в то время как кислотоустойчивые сапрофиты при окраске ауромином-родамином имеют свечение зеленоватого оттенка.

1.6.3. Окраска мазков по Мурахаши

Фиксированные мазки погружают в метанол на 10 мин, и после высушивания в вытяжном шкафу, помещают в 1% раствор малахитового зеленого в ацетатном буфере (рН 4,1), затем подогревают на водяной бане при температуре 50–60 °С в течение 20 мин. После охлаждения в растворе малахитового зеленого мазки промывают проточной водой, подсушивают в вытяжном шкафу и помещают в 1% раствор карболового фуксина на 3–4 мин. После обработки фуксином мазки промывают проточной водой, сушат в вытяжном шкафу и обесцвечивают 2% азотной кислотой, после чего повторно промывают проточной водой. Живые микобактерии окрашиваются в зеленый цвет, мертвые — в красный.

Приготовление растворов:

все растворы готовятся с использованием дистиллированной воды.

1. Насыщенный спиртовой раствор фуксина:

основной фуксин — 10 г,

96% этиловый спирт — 100 мл.

2. Рабочий раствор фуксина (1%):

кристаллы фенола — 5 г

медленно нагревают до расплавления, доливают 90 мл воды, в полученный раствор фенола добавляют 10 мл насыщенного раствора фуксина.

3. 1% раствор малахитового зеленого в ацетатном буфере (рН 4,1–4,2):

0,1 Н уксусная кислота — 820 мл

(60 мл ледяной уксусной кислоты довести до 1000 мл),

0,1 Н уксуснокислый натрий — 180 мл

(16,4 г уксуснокислого натрия в 200 мл воды),

малахитовый зеленый — 10 г.

4. 2% раствор азотной кислоты:

к 65 частям воды добавляют 2 части 67% (концентрированной) азотной кислоты.

Все пробирочные опыты должны иметь трехкратную повторность.

2. Изучение химиотерапевтической эффективности противотуберкулезных лекарственных средств в исследованиях *in vivo*

Вещества с выраженным противотуберкулезным действием, определенным в опытах *in vitro*, должны быть изучены на модели экспериментальной туберкулезной инфекции.

2.1. Лабораторные животные

Для экспериментальных исследований рекомендуется использовать мышей и морских свинок. Высокая восприимчивость к туберкулезу этих животных позволяет создать эффективную модель туберкулезной инфекции для изучения химиотерапевтического эффекта исследуемых соединений.

Предпочтение отдается мышам линии BALB/с или СВА с повышенной чувствительностью к туберкулезу, но в эксперименте могут быть использованы и нелинейные белые мыши. Установлено, что резистентность к туберкулезу у мышей повышается

ется с возрастом и массой, поэтому группа животных должна быть стандартизована по этим параметрам: в исследование включаются половозрелые самцы и самки массой 18–25 г.

В эксперименте допустимо использование морских свинок разной массы. Однако желательно использовать молодых животных массой 250–300 г.

2.2. Модель туберкулезной инфекции у лабораторных животных

Генерализованный туберкулез, как экспериментальная модель для изучения эффективности химиотерапии, характеризуется выраженными и легко тестируемыми патологическими изменениями у мышей и морских свинок. Развитие процесса у экспериментальных животных протекает достаточно быстро, но вместе с тем позволяет контролировать процесс химиотерапии.

Заражение лабораторных животных проводится двухнедельной вирулентной культурой *M. tuberculosis* H₃₇Rv или клинических штаммов, выделенных от больных туберкулезом, чувствительных или устойчивых к традиционным противотуберкулезным препаратам. Для этого с косяка снимают культуру, просушивают при помощи стерильной фильтровальной бумаги, переносят в пробирку и взвешивают на аналитических весах. После этого культуру переносят в стерильную фарфоровую ступку, а пробирку взвешивают. В разнице двух взвешиваний находят вес культуры.

Морских свинок заражают подкожно в правую паховую область. Для «острого» исследования доза заражения составляет 0,1 мг в 0,5 мл физиологического раствора на одну особь. При такой дозе заражения гибель 95–100% животных происходит к концу 1 мес от момента заражения. Для хронического эксперимента, длящегося 3 мес и более, инфицирующая доза составляет 0,025 мг в 0,5 мл.

Мышей заражают внутривенно в хвостовую вену в дозе 0,5 мг культуры в 0,5 мл физиологического раствора или в венозный синус глаза в дозе 0,1 мг в 0,2 мл раствора.

Для заражения животных используют и другой метод расчета доз. Двухнедельную вирулентную культуру выбранного для заражения штамма снимают с косяка плотной среды и готовят бактериальную суспензию по 5 стандарту оптической плотности. Титр полученной суспензии — 5×10^8 микробных тел в 1 мл. Исходную суспензию разводят в 10 раз и получают титр — 5×10^7 микробных тел в 1 мл. К 4 мл полученной суспензии добавляют 1 мл физиологического раствора с целью получения суспензии титром 4×10^7 микробных тел в 1 мл или $2,0 \times 10^7$ в 0,5 мл (для мышей). Инфицирующая доза для морских свинок составляет 5×10^7 микробных тел в 1 мл или $2,5 \times 10^7$ микробных тел в 0,5 мл.

Животных делят на группы в зависимости от режима химиотерапии и штамма, которым проводилось заражение. Для статистической обработки данных эксперимента количество животных в группе должно быть:

морских свинок — от 6 до 10 особей,

мышей — от 10 до 20 особей.

В каждом эксперименте должны быть предусмотрены контрольные группы:

1-я контрольная группа — незараженные животные,

2-я контрольная группа — зараженные животные, не получающие лечение,

3-я контрольная группа — зараженные животные, получающие лечение гомологом нового соединения или любым традиционным ПТП.

2.3. Проведение эксперимента

Лечение животных, зараженных штаммом H₃₇Rv для острого исследования, начинают после развития туберкулезного процесса, который тестируется по общему состоянию животных (снижение активности, затрудненное дыхание, снижение веса). В контрольной группе через 2–4 дня у мышей и 12–14 дней у морских свинок проводится эвтаназия с помощью эфирного наркоза, после чего паренхиматозные органы (легкие, печень, селе-

зенка) нескольких особей из любой группы зараженных животных подвергаются макро-скопическому и микробиологическому исследованию.

У животных при вскрытии обнаруживаются очаги туберкулезного воспаления. При бактериоскопическом исследовании в мазках присутствуют кислотоустойчивые МБТ. Из гомогенатов паренхиматозных органов высевает *M. tuberculosis*.

Введение изучаемого соединения начинают через 4 дня после заражения для мышей и 14 дней для морских свинок. Вещества вводят ежедневно, перорально. ЛП, полностью растворимые в физиологическом растворе и предназначенные в дальнейшем для внутримышечного или внутривенного введения, могут вводиться экспериментальным животным внутримышечно.

Изучаемые дозы новых соединений выбираются соответственно дозам гомологов этих соединений, используемых для лечения больных туберкулезом. Они могут быть ниже (если вещество проявляет в опытах *in vitro* более высокую активность) или выше установленных клинических доз, но не должны превышать $1/5$ ЛД₅₀ испытуемого вещества.

Длительность лечения может варьировать от 4-х до 12 недель. Лечение заканчивается, когда в контрольной (без лечения) группе смертность достигает 70 или 100%. При необходимости, можно продолжать лечение животных до их полного излечения, даже в случае гибели 100% животных в контрольной группе.

По окончании лечения животных подвергают эвтаназии, проводят макроскопическое исследование, определяя индекс поражения внутренних органов, и забирают образцы легкого, печени и селезенки для микробиологических исследований. Из указанных органов готовят гомогенаты, которые исследуют на наличие микобактерий микроскопически и путем посева на плотную питательную среду. Помимо микробиологического исследования желательны проводить гистологическое исследование паренхиматозных органов животных.

Эффективность лечения определяется по продолжительности жизни животных, разнице в массе тела животных в начале и конце исследования, по массе легких и других паренхиматозных органов, наличию специфических изменений в паренхиматозных органах, индексу высеваемости и бактериоскопическому показателю.

Макроскопическая оценка изменения внутренних органов животных представляется индексом поражения, который определяется для каждой группы по балльной системе.

2.3.1. Пораженность паренхиматозных органов

1–3 мелких очага в легких — +/- (0 баллов)

4–10 мелких полупрозрачных очагов в легких при отсутствии видимой патологии в печени и селезенке — + (1 балл)

10–20 хорошо выраженных очагов в легочной ткани и наличие единичных очагов в печени и селезенке — ++ (2 балла)

20 и более крупных очагов в легких (до 0,5 см в диаметре), множественные очаги в печени и селезенке — +++ (3 балла)

кавернозно-некротические поражения легких, кахексия, гибель животного — ++++ (4 балла)

2.3.2. Индекс высеваемости микобактерий

Индекс высеваемости микобактерий туберкулеза определяют как среднее от общего количества колониеобразующих единиц (КОЕ) в каждой группе животных. Равновеликие кусочки легкого, печени и селезенки каждого животного растирают в фарфоровой ступке, заливают 5 мл 6% раствора серной кислоты, гомогенизируют. Полученную массу центрифугируют в течение 10 мин при 3000 об/мин. Время контакта микобактерий туберкулеза с серной кислотой не должно превышать 15–20 мин. Серную кислоту сливают, осадок дважды отмывают 0,9% раствором NaCl, растворяют в 1,0 мл физ. раствора и засевают на 5 пробирок с плотной яичной средой Финн-2 или Левенштейна–

Йенсена. Пробирки с посевами инкубируют в термостате при 37 °С в течение 10–12 недель. Интенсивность роста культуры учитывается по балльной системе, предложенной Г.Н. Першиным:

- 1–3 колонии на 1 косяке +/- (0 баллов)
- 4–10 колоний на 1 косяке + (1 балл)
- 11–30 колоний на 1 косяке ++ (2 балла)
- 31–100 колоний на 1 косяке +++ (3 балла)
- сплошной рост колоний на 1 косяке ++++ (4 балла)

Из гомогената органов также делают мазки и окрашивают их по Цилю–Нильсену или люминесцентными красителями.

2.3.3. Бактериоскопический показатель

Бактериоскопический показатель определяют как среднее значение общего количество микобактерий на группу. Результат бактериоскопии учитывается по четырехбалльной системе, предложенной Г.Н. Першиным:

- +/- (0) — от 1 микобактерии на 100 полей зрения до 10 микобактерий в 10 полях зрения
- + (1) — от 1 микобактерии в 10 полях зрения до 1 микобактерии в 1 поле зрения
- ++ (2) — 2–10 микобактерий в 1 поле зрения
- +++ (3) — 11–50 микобактерий в 1 поле зрения
- ++++ (4) — свыше 50 микобактерий в 1 поле зрения

2.3.4. Индекс эффективности

Эффективность каждого режима химиотерапии выражается индексом эффективности, исчисляющимся по формуле А.Н. Тогуновой, усовершенствованной в ЦНИИТ РАМН (отдел патоморфологии и микробиологии):

$$\text{Индекс эффективности} = 100\% - \frac{I_{\text{гop}}^1}{I_{\text{гop}}^2} \times 100,$$

где $I_{\text{гop}}^1$ — индекс поражения исследуемой группы, $I_{\text{гop}}^2$ — индекс поражения контрольной группы.

Противотуберкулезное действие новых соединений в первую очередь изучается на мышах в связи с тем, что эта модель не требует больших материальных затрат. При получении положительных результатов проводится дальнейшее исследование на морских свинках.

Следует иметь в виду, что экспериментальный туберкулез у морских свинок имеет некоторые отличия от инфекционного поражения мышей. При генерализованном туберкулезном процессе у мышей воспалительные изменения локализуются в основном в легких, тогда как у морских свинок этот показатель отступает на задний план по сравнению с поражением печени и селезенки. В связи с этим приведенная выше схема оценки поражения внутренних органов должна быть адаптирована для морских свинок, отдавая приоритет поражению селезенки и печени.

Высокоактивные соединения с низкой токсичностью должны быть изучены на модели туберкулеза еще на одном виде животных, например, на модели туберкулеза легких у кролика.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Mitchison D.A. The search for new sterilizing anti-tuberculosis drugs. *Front Biosci.* 2004 May 1; 9: 1059–72.
2. Paramasivan C.N., Sulochana S., Kubendiran G., Venkatesan P., Mitchison D.A. Bactericidal action of gatifloxacin, rifampin, and isoniazid on logarithmic- and stationary-phase cultures of *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2005 Feb; 49(2): 627–31.
3. Basaraba R.J. Experimental tuberculosis: the role of comparative pathology in the discovery of improved tuberculosis treatment strategies. *Tuberculosis (Edinb).* 2008 Aug; 88 Suppl 1: S35–47.
4. Nuermberger E. Using animal models to develop new treatments for tuberculosis. *Semin Respir Crit Care Med.* 2008 Oct; 29(5): 542–51. Epub 2008 Sep 22.
5. Lenaerts A.J., Degroote M.A., Orme I.M. Preclinical testing of new drugs for tuberculosis: current challenges. *Trends Microbiol.* 2008 Feb; 16(2): 48–54. Epub 2008 Jan 7.
6. Nikonenko B.V., Sacksteder K.A., Hundert S., Einck L., Nacy C.A. Recent Pat Preclinical study of new TB drugs and drug combinations in mouse models. *Antiinfect Drug Discov.* 2008 Jun; 3(2): 102–16.
7. Vaddady P.K., Lee R.E., Meibohm B. *In vitro* pharmacokinetic / pharmacodynamic models in anti-infective drug development: focus on TB. *Future Med Chem.* 2010 Aug; 2(8): 1355–69.

ГЛАВА 35

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВОГРИБКОВОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: акад. РАМН, проф. А.А. Кубанова; д. м. н. Ж.В. Степанова;
член-корр. РАМН, проф. Т.А. Гуськова; к. б. н. Т.В. Пушкина; к. б. н. Л.Ю. Крылова;
к. м. н. И.Б. Шилова; к. б. н. А.С. Тренин*

Введение

Грибковые заболевания человека — микозы делятся на 4 большие группы: 1) кератомикозы (отрубевидный или разноцветный лишай, узловая трихоспория); 2) дерматомикозы (эпидермофития, рубромикоз, трихофития, микроспория и фавус) — наиболее распространенная группа, занимающая в общей дерматологической структуре заболеваемости второе место после пиодермитов; 3) кандидоз (кожи, слизистых оболочек и внутренних органов); 4) глубокие (системные) микозы, составляющие относительно редко встречающуюся группу грибковых заболеваний [5].

Учитывая различную чувствительность патогенных грибов этих четырех групп к фармакологическим веществам, необходимо проводить изучение активности веществ в отношении грибов каждой группы.

1. Изучение противогрибковой активности веществ *in vitro*

В настоящих Методических рекомендациях изложены стандартные методы изучения противогрибковой активности веществ (методы серийных разведений и диско-диффузионный метод). Различают два основных варианта метода серийных разведений в бульоне: макрометод (в пробирках) и микрометод (в планшетах).

1.1. Изучение активности веществ в жидкой питательной среде с помощью макрометода

Изучение активности веществ методом двукратных серийных разведений в жидкой питательной среде в пробирках (макрометод) следует считать наиболее распространенным. Для постановки таких экспериментов чаще всего используются среды: Сабуро, или RPMI 1640 [4].

В пробирках готовят два параллельных ряда разведений испытуемого вещества в жидкой среде Сабуро, в которую засевают затем соответствующую культуру патогенного гриба. Засеянные пробирки инкубируют в термостате при 27 °С 14 дней. Чувствительность к веществу определяется его минимальной дозой, при которой роста гриба по окончании периода инкубации не наблюдается.

Разведение веществ производится следующим образом. Жидкую среду Сабуро разливают стерильно по 3 мл в каждую пробирку; в первую пробирку ряда наливают 4,5 мл. Всего в ряду 10–12 пробирок; из них последняя — контрольная. В качестве стандартной навески берут 10 мг испытуемого вещества в 10 мл дистиллированной воды. Если вещество нерастворимо в воде, его растворяют в 1 мл соответствующего растворителя, а затем добавляют 9 мл дистиллированной воды. Если при этом выпадает осадок, растворение принимают как условное и опыт ставят так же, как с водорастворимым веществом при условии постоянного встряхивания пробирки при его разливе.

Таким образом, исходное разведение содержит испытуемое вещество в концентрации 1000 мкг/мл. Затем 0,5 мл этого разведения вносят в первую пробирку ряда (с 4,5 мл среды), разводя тем самым концентрацию вещества еще в 10 раз. Следовательно, первая пробирка ряда содержит 100 мкг/мл испытуемого вещества. В дальнейшем из первой пробирки берут 3 мл раствора и, перенося его во вторую пробирку, тщательно продувают, берут снова 3 мл и переносят его в третью пробирку и т. д.; из предпоследней пробирки 3 мл выливают. В последнюю пробирку как в контрольную вещество не вносится. Таким образом, в каждом ряду первые пробирки содержат по 2 мл раствора, а все последующие — по 3 мл. В каждой последующей пробирке концентрация вещества уменьшается вдвое; при этом получается ряд следующих разведений в мкг/мл гаммах на 1 мл—100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,5; 0,75; 0,38; 0,19.

Если приготовленных разведений недостаточно и даже в последней пробирке, содержащей вещество, рост отсутствует, то опыт повторяют, удлиняя ряд до 15–20 пробирок. Если же во всех пробирках, включая первую, имеется рост, то ряд удлиняют влево, т.е. берут навеску вещества, в 10 раз большую.

Инокулят для засева готовят по-разному в зависимости от точности опыта и поставленных целей. Обычно берут смыв культуры с агарового косяка в жидкой среде Сабуро значительной мутности. Плотность суспензий контролируется спектрофотометрически. Поглощение при использовании кюветы 1 см должно составить 0,08–0,10 при длине волны 625 нм.

Кожистые культуры, не содержащие конидий, необходимо предварительно растереть в ступке. Оттитрованной пипеткой, содержащей 25 капель в 1 мл, вносят по одной капле взвеси в каждую пробирку с разведенным веществом, включая контрольную.

Для точного учета вносимого инфекта плотность взвеси гриба, определяют по бактериальному стандарту Мак-Фарланда, учитывая, что величина грибковых элементов примерно в 10 раз превышает величину бактерий (например, 2 млрд микробных тел в 1 мл по стандарту соответствует 200 000 000 грибковых тел в 1 мл). Конечная концентрация клеток в опыте составляет $1-5 \times 10^3$ клеток/мл для дрожжевых грибов и $0,4-5 \times 10^4$ клеток/мл для дерматофитов. Для более высокой точности просчитывают грибковые элементы в счетной камере или путем высева на агар Сабуро и подсчета выросших колоний.

После засева штатив энергично встряхивают и помещают в термостат на указанный срок.

При исследовании веществ в отношении возбудителей трихомикозов (трихофитии, микроспории, фавуса) в качестве посевного материала лучше использовать не культуры, а волосы, пораженные соответствующими грибами. Патогенные грибы в культуре представлены вегетативными формами (мицелием, микроконидиями), чувствительными к воздействию внешней среды. В пораженных же волосах патогенные грибы существуют преимущественно в виде спор сохранения, защищенных от внешних воздействий мощной двухконтурной оболочкой, следовательно, устойчивость дерматофитов (трихофитов) к одним к одним и тем же веществам в волосах в 20–30 раз выше, чем их устойчивость к культуре.

Принимая во внимание, что при проведении лечения или дезинфекции вещей больных грибковыми заболеваниями приходится иметь дело именно с паразитической, а не сапротитной формой дерматофитов, целесообразнее производить отбор химиотерапевтических препаратов, используя не культуры, а пораженные волосы. На основании макроскопического вида отбирают волосы, заведомо пораженные патогенными грибами (коротко обломанные, тусклые, изогнутые, покрытые чехлом), и по 2–3 таких волоса помещают в каждую пробирку ряда, включая контрольную. Волосы следует помещать в раствор вещества полностью, чтобы они не всплыли, иначе остается не смоченные раствором участки, которые могут дать рост.

Указанной методикой устанавливают фунгистатическое действие вещества. По окончании регистрации опыта по фунгистатическому действию испытуемых веществ можно

произвести проверку их фунгицидных свойств. Для этого из пробирок, в которых не отмечено роста дерматофитов (трихофитов), извлекают волосы, тщательно отмывают их в стерильной дистиллированной воде и сеют на чистую жидкую среду Сабуро. Наблюдение за посеянным материалом производят в течение 1,5–2 месяцев. Отсутствие роста грибов свидетельствует о фунгицидных свойствах вещества.

Исследование фунгицидной активности проводится также и другим способом. Измельченные волосы, пораженные патогенными грибами, погружают в раствор вещества на тот или иной срок, после чего отмывают их в растворителе, в котором растворялось вещество (спирт, ДМСО и др.), споласкивают в стерильном физиологическом растворе и высевают на жидкую среду Сабуро.

При этом для более полной характеристики вещества необходимо варьировать как концентрацию, так и длительность экспозиции.

1.2. Изучение активности веществ

в жидкой питательной среде с помощью микрометода (в планшетах)

Методика изучения активности веществ методом двукратных серийных разведений в жидкой среде микрометодом (в планшетах) [3] не имеет отличий от макрометода за исключением используемых объемов питательного бульона с разведениями испытуемых веществ и инокулята культуры. Но требует дополнительного оснащения лаборатории многоканальными пипетками, 96-луночными планшетами для иммунологических исследований (с плоским дном) со стерильными крышками.

Разведение вещества производится следующим образом. Навеску тестируемого вещества растворяют в среде RPMI 1640, получая исходную концентрацию 1,6 мг/мл (1600 мкг/мл). При отсутствии растворимости испытуемых веществ в воде их растворение проводят в диметилсульфоксиде (DMSO). Далее, готовят серии двукратных разведений от 1600 и далее используя среду RPMI 1640.

Для постановки эксперимента используют стерильные 96-луночные плоскодонные планшеты, в которые вносят вначале по 100 мкл растворов серийных разведений тестируемых веществ, а затем по 100 мкл раствора инокулята культуры.

Для приготовления инокулята используют суспензию клеток из дрожжевых грибов или спор патогенных грибов в стерильном физиологическом растворе, доводя ее до определенной плотности. Конечная концентрация клеток в опыте составляет $1-5 \times 10^3$ клеток/мл для дрожжевых грибов и $0,4-5 \times 10^4$ клеток/мл для патогенных грибов. Для более высокой точности просчитывают грибковые элементы путем посева на агар Сабуро и подсчета выросших колоний.

Тестирование проводят при величине конечного объема 0,2 мл, что позволяет значительно сократить количество расходных материалов.

Планшеты инкубируют в термостате при 27 °С без встряхивания в течение 24 ч для дрожжей и 48 ч для патогенных грибов. Оценку роста культур проводят визуально, применяя 4-ступенчатую шкалу: 0 = оптическая прозрачность, полное отсутствие роста, 1 = слабый рост (25% от уровня контроля), 2 = существенное подавление роста (50% от уровня контроля), 3 = слабое подавление роста (75% от уровня контроля), 4 = отсутствие подавления роста.

МПК определяют как минимальную концентрацию вещества, полностью предотвращающую рост тест-организма (шкала роста = 0).

При постановке опытов методом серийных разведений проводят контроль роста культуры на питательной среде без вещества, а качество среды контролируют с использованием референтных штаммов. Контролируется также чистота суспензии культуры, использованной для инокуляции, путем посева на не селективные среды.

1.3. Изучение активности веществ методом диффузии в агар

Используется метод диффузии в агар (чашечный метод), имеющий несколько вариантов постановки. В расплавленную и остуженную до 40–42 °С твердую среду Сабуро

вливают 2 мл определенной взвеси культуры гриба в физиологическом растворе, смесь хорошо перемешивают и выливают в чашки Петри.

По другому варианту на застывшую среду наносят взвесь культуры патогенного гриба и равномерно растирают ее шпателем по поверхности агара. Число чашек определяется количеством испытуемых веществ и; 1–2 чашки контрольные, с которыми не производят дальнейших опытов. При застывании агара на его поверхность накладывают 1–3 алюминиевых кольца, в которые затем помещают дозированное количество испытуемого вещества.

Другой вариант постановки подразумевает приготовление в агаре с помощью стерильного металлического сверла полых круглых отверстий диаметром 9 мм. В этом случае испытуемые вещества вносят непосредственно в агаризованную среду в подготовленные лунки.

По величине зоны задержки роста вокруг кольца судят о противогрибковом действии вещества. Размеры зон подавления роста указывают на степень чувствительности (или устойчивости) патогенного гриба к испытуемым веществам и, соответственно, наличие, или отсутствие противогрибковой активности.

Однако метод серийных разведений в жидкой питательной среде является более точным.

Для более полной характеристики испытуемых веществ и подтверждения результатов их противогрибковой активности полученных в опытах *in vitro* на стадии доклинического изучения необходимо провести исследование веществ на экспериментальных моделях грибковых инфекций воспроизведенных на животных *in vivo*.

2. Изучение противогрибковой активности лекарственных средств в экспериментах *in vivo*

Все исследования *in vivo* должны проводиться в соответствии с этическими принципами обращения с животными.

2.1. Изучение эффективности фармакологических веществ на моделях дерматомикозов морских свинок

*2.1.1. Дерматомикозы морских свинок, вызываемые зоофильными дерматофитами (*Trichophyton gypsum*, *Microsporium canis*)*

Для приготовления материала для возбуждения инфекции у животных 10–12-дневную культуру гриба вместе с агаром растирают в ступке до получения однородной кашицы. У морской свинки на спине или боковой поверхности туловища (лучше на участке с белой или светлой шерстью) выстригают волосы на площади 5×5 см². Участок протирают спиртом, а затем острым скальпелем скарифицируют до появления сукровицы. Следует избегать появления крови, которая тормозит рост дерматофитов. В подготовленный таким образом участок кожи втирают в течение 1–2 мин кашицу из культуры патогенного гриба.

Заболевание протекает остро с образованием инфильтратов, корок, резких воспалительных явлений. Инфекция длится 4–5 недель и заканчивается самоизлечением. Наличие грибковой инфекции подтверждается микроскопическим исследованием корок. При появлении инфекционного процесса начинается применение препарата в той лекарственной форме и при том способе введения (местно, внутрь или парентерально), который будет впоследствии рекомендован в клинику. Критерием эффективности препарата служит различие в сроках освобождения от грибов и излечения получавших препарат и контрольной групп животных.

*2.1.2. Дерматомикозы, вызываемые антропофильными дерматофитами (*Trichophyton violaceum*, *Trichophyton crateriforme*, *Microsporium ferrugineum*, *Achorion Schonleinii*)*

Поскольку животные менее чувствительны к антропофильным дерматофитам, чем к зоофильным, для заражения используются не культуры, а пораженные волосы. Волосы

растирают в ступке с кусочками агара Сабуро и по методике, описанной выше, прививают животным. Первые признаки заболевания возникают на 5–7 день в виде гиперемии и шелушения, в дальнейшем развивается инфильтрат с корками на поверхности, в которых заключены обломившиеся пораженные волосы. Через 2,5–3 недели корки отпадают, обнажая эрозированные поверхности, которые в течение 2–3 недель полностью эпителизируются и зарастают новой шерстью.

При прививке антропофильных возбудителей клинические явления менее выражены, но длительность патологического процесса остается в тех же пределах. Наличие грибкового процесса подтверждается микроскопическим исследованием корок и обломившихся волос. При заражении микроспорами в целях диагностики можно использовать люминесцентную лампу (лампу Вуда), в свете которой пораженные только этими возбудителями волосы светятся зеленым светом. Однако этот очень удобный и быстрый метод диагностики имеет ту особенность, что при смазывании некоторыми лечебными препаратами люминесценция гаснет. Поэтому лучшим методом контроля является микроскопическое исследование.

При установлении наличия грибкового поражения можно начинать соответствующее лечение. Испытуемые вещества для наружного применения можно готовить в виде мазей на основах, легко «отдающих» препарат, спиртовых растворов и других лекарственных форм. Методики лечения отрабатываются в зависимости от эффективности препарата.

Критерием излеченности является отсутствие специфического свечения и отсутствие грибов при микроскопическом исследовании.

Лечебную эффективность вещества оценивают 1 раз в 7 дней на протяжении всего периода наблюдения по следующим параметрам [7]:

— специфическое свечение очагов поражения в лучах лампы Вуда при наличии возбудителя, в баллах, в зависимости от площади и интенсивности свечения: 0 — нет свечения; 1 балл — свечение 1–25% площади; 2 балла — 26–50%; 3 балла — 51–75%; 4 балла — 76–100% площади;

- посев и микроскопическое исследование материала (чешуйки, волоски);
- время восстановления шерстного покрова;
- местнораздражающее действие (язвы, струпья, их количество, размеры).

Разница в сроках излечения у получавших препарат и контрольных животных дает возможность оценить эффективность терапевтического действия препарата. Для количественной оценки химиотерапевтической эффективности определяют показатели: индекс поражения (ИП) и терапевтический эффект (ТЭ).

$$ИП = \frac{\Sigma \text{баллов}}{n},$$

Σ — сумма баллов свечения в группе, n — число животных в группе.

$$ТЭ = \frac{ИП_{к} - ИП_{л}}{ИП_{к}} \times 100\%,$$

где ТЭ — показатель химиотерапевтической эффективности в %, по отношению к контрольным нелеченым животным. $ИП_{к}$ — индекс поражения нелеченых животных; $ИП_{л}$ — индекс поражения леченых животных.

2.1.3. Дерматомикоз морских свинок, вызванный трихофитом рубрум

Для инфицирования лучше использовать порошкообразную культуру *Trichophyton rubrum* [6]. Инокулят втирают в боковую поверхность тела морской свинки, после проведенной эпиляции и скарификации кожи (трихофития волосистой части), или в безволосую кожу подошв и межпальцевых складок лапок (трихофития гладкой кожи), или в ногтевую пластинку (онихомикоз), для чего коготок морской свинки размягчают онихо-

лизином или каким-либо другим средством, делают глубокий надрез, в который вносят кусочек культуры гриба и заливают коготок коллодием.

В случае инфицирования волосистой кожи животных на 5 день на месте инокуляции гриба появляется гиперемия и небольшое шелушение. Затем образуются пустулы и корочки с тусклыми обламывающимися волосками. В коже и волосках определяются элементы гриба. Процесс длится 20–30 дней и заканчивается самоизлечением.

В случае инфицирования морских свинок в лапку, гиперемия, инфильтрация и крупнопластинчатое шелушение появляется на 12–15 день. В коже обнаруживаются многочисленные нити мицелия. Инфекционный процесс также заканчивается самоизлечением, однако он продолжается более длительный срок, чем при инфицировании в боковую поверхность тела морской свинки, примерно 1,5–2 месяца.

При онихомикозе инфекционный процесс развивается через 2 недели после инфицирования в виде деформации ногтя, появления желтоватого пятна, позже ногтевая пластинка начинает крошиться. В отделяемом субстрате определяются элементы гриба.

Применение фармакологического вещества может начинаться одновременно с заражением, то есть профилактически, или после появления первых признаков развития инфекции.

Об эффективности препарата судят по различию в сроках излечения или освобождения от возбудителя между получавшими препарат и контрольными животными.

2.2. Изучение эффективности фармакологических веществ на моделях кандидоза

Грибы рода *Candida* поражают слизистые оболочки, кожу и различные внутренние органы (легкие, кишечник и др.), иногда может развиваться кандидозный сепсис. В связи с этим можно использовать несколько моделей экспериментального кандидоза для определения эффективности фармакологического вещества.

Грибы рода *Candida* являются условно патогенными организмами, всегда присутствующими на коже и слизистых оболочках человека и животных. Их способность вызывать патологические явления зависит не столько от свойств гриба, сколько от вида животного, его состояния и др. Наиболее чувствительны к грибам рода кандиды кролики, затем белые крысы и мыши, очень мало чувствительны морские свинки.

Свежевыделенные у больших культуры вирулентнее музейных штаммов. Легче всего удаются модели острого генерализованного или кожного кандидамикоза, труднее всего — модели висцерального кандидамикоза.

2.2.1. Сепсис у мышей, вызванный *Candida albicans*

Белых мышей инфицируют путем введения в хвостовую вену взвеси гриба *Candida albicans* [4]. Заражающая доза может варьировать в зависимости от степени вирулентности возбудителя, в среднем она составляет 25 млн микробных тел гриба (подсчет в камере Горяева). Инфекция протекает остро и заканчивается 100% летальностью через 5–9 дней после заражения. У животных отмечается резкая потеря веса, заторможенность движений. При вскрытии наблюдается поражение всех паренхиматозных органов с наличием беловато-сероватых узелков на их поверхности, содержащих скопления гриба.

Вещества вводят одновременно с заражением или в различные сроки после инфицирования в зависимости от поставленной задачи. Однако, учитывая тяжесть и быстрое течение инфекционного процесса, целесообразно начинать лечение одновременно с заражением. Об эффективности судят по выживаемости мышей в группе леченных животных, а также по различию в средней продолжительности жизни получавших препарат и контрольных мышей. В качестве оценки эффективности могут быть использованы данные патоморфологических и микробиологических исследований внутренних органов, однако их следует проводить только у выживших животных.

2.2.2. Менингоэнцефалит у мышей, вызванный *Candida albicans*

Интрацеребральное введение мышам различных штаммов *Candida albicans* вызывает развитие инфекционного процесса, который по данным микологического и патоморфологического исследований можно охарактеризовать как кандидозный энцефаломенингит, осложненный генерализованным кандидозом [2]. Свежевыделенные клинические штаммы вирулентнее лабораторных. Вирулентность их не зависит от локализации выделения возбудителя (кожа, слизистая оболочка полости рта, гениталии, ликвор).

Инфицирующую дозу (40–60 млн грибковых клеток на мышь) в виде взвеси гриба в физиологическом растворе вводят в мозг в объеме 0,05 мл. Область заражения — около средней линии черепа на 2–3 мм выше глазницы. Инфекционный процесс характеризуется хроническим течением.

Вещества вводят одновременно с заражением или в различные сроки после инфицирования в зависимости от поставленной задачи. За животными ведут наблюдение в течение 30 сут от момента заражения. Об эффективности проведенной химиотерапии судят на основании выживаемости мышей в группе леченых животных, а также по различию в средней продолжительности жизни получавших препарат и контрольных мышей. В качестве оценки эффективности могут быть использованы данные патоморфологических и микробиологических исследований внутренних органов, однако это следует проводить только у выживших животных.

2.2.3. Кандидамикоз легких у крыс, вызванный *Candida albicans*

Крысам (массой 80–90 г) интраназально под эфирным наркозом вводят не менее 1 млрд. клеток гриба в 0,5 мл физиологического раствора. Для стимулирования патологического процесса животным вводят антибиотик (пенициллин по 1000 ЕД в сутки в 0,2 мл физиологического раствора один день внутримышечно и 2 дня подкожно) или внутрь раствор эстрадиола валерата в масле (0,02 мг/крысу в 100 мкл 1раз в неделю, в течение 3-х недель).

При этом в легких наблюдается выраженная синюшность и наличие серовато-беловатых узелков разных размеров. В течение 2–12 дней погибает до 80% животных [4].

Препараты вводят одновременно с заражением или в различные сроки после инфицирования в зависимости от поставленной задачи.

Об эффективности судят по выживаемости в группе леченых животных по сравнению с контрольной группой, а также по различию средней продолжительности жизни получавших препарат и контрольных животных. В качестве оценки эффективности могут быть использованы данные патоморфологических и микробиологических исследований внутренних органов, однако это следует проводить только у выживших животных.

2.2.4. Кандидамикоз кожи кроликов, вызванный *Candida albicans*

Кроликов заражают внутрикожно взвесью 2-суточной культуры *Candida albicans* в дозе 8000 клеток гриба в количестве 0,5 мл физиологического раствора в несколько близко расположенных участков кожи до появления «лимонной корочки» [4]. Образующийся через 24 ч воспалительный инфильтрат через 2 дня превращается в узел величиной с фасоль. Затем у кроликов процесс развивается по-разному: у одних этот узел постепенно рассасывается в течение 20–30 дней, у других на 8–10-е сутки появляется флюктуация и наступает изъязвление с выделением густого сливкообразного гноя. С 15–20 дня начинается образование постепенно отпадающих корок и к 25–40-му дню кожный покров восстанавливается, иногда с образованием атрофического рубца. У мышей реакция на введение *Candida* в кожу слабее, чем у кроликов; у морских свинок она отсутствует.

Применение фармакологического вещества может начинаться одновременно с заражением, то есть профилактически, или после появления первых признаков развития инфекции.

Об эффективности вещества судят по различию в сроках излечения или освобождения от возбудителя между получавшими препарат и контрольными животными.

2.3. Изучение эффективности фармакологических веществ на моделях глубоких микозов

Работа с возбудителями глубоких микозов представляет опасность для экспериментатора, поэтому изучение на экспериментальных моделях должны проводиться в специальных лабораториях с соблюдением всех мер, обеспечивающих безопасность людей.

2.3.1. Кожный споротрихоз мышей

Белым мышам подкожно вводят суспензию дрожжевой фазы гриба *Sporotrichum* в объеме 1 мл. Инфицирующая доза зависит от вирулентности гриба, которая определяется предварительно.

Кожные поражения характеризуются некрозом с образованием абсцессов и разрушением мышц. В некротических очагах обнаруживаются характерные для *Sporotrichum* сигаровидные тельца и дрожжевые клетки. Грибы высеваются из пораженных участков спустя 2–3 и даже 6–7 недель после заражения. Гибели животных не наблюдается. Препараты вводят в различные сроки после заражения в зависимости от поставленной задачи (профилактический или лечебный эффект). Об эффективности судят по различию клинической картины инфекции в получавших препарат и контрольной группах, а также по высеваемости возбудителя из пораженных участков кожи.

При необходимости можно повысить тяжесть течения инфекции у мышей введением им кортизола. В этом случае инфекционный процесс заканчивается летальностью, и об эффективности можно судить по разнице в показателях выживаемости и продолжительности жизни животных в получавших препарат и контрольной группах.

2.3.2. Криптококкоз у мышей

Поскольку *Cryptococcus neoformans* часто поражает ЦНС, Sittman [1] использовал интрацеребральный метод заражения белых мышей, вводя через «родничок» шприцем 3 млн. клеток гриба в 1–2 каплях физиологического раствора. У мышей развивались явления менингоэнцефалита, и животные погибали в течение 3–73 дней.

Генерализованный криптококкоз с поражением печени, почек, легких можно получить, вводя внутривенно или интратрихомно или интратрихомно соответственно по 0,5 и 0,2 мл двухмиллиардной взвеси гриба в физиологическом растворе (по бактериальному стандарту).

Способы введения ЛС и их дозировки должны быть предварительно отработаны на здоровых животных. Контролем излеченности должны служить сроки выживаемости (при смертельных инфекциях), культуральные и гистологические исследования органов и микроскопирование отпечатков с разрезов внутренних органов.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Sittman M. J. Hyg., 1959, 69, 49.
2. Бакланова О.В. Моделирование и экспериментальная химиотерапия кандидозной инфекции мышей, вызванной интрацеребральным заражением. Дисс. — М., 1995.

3. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам (Методические указания). МУК 4.2.1890—04.
4. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии. — М.: Медицина, 1971. — С. 538.
5. Скрипкин Ю.К. Кожные и венерические болезни. — М.: Медицина, 1980. — С. 164.
6. Умнова И.И. Клиника и дифференциальная диагностика поражений кожи, вызываемых красным эпидермофитомом. Дисс. — М., 1954.
7. Шилова И.Б. Изучение производного тиазолидин-2,4-диона (микозидина) в качестве потенциального противогрибкового средства. Дисс. — Купавна, 2007.

ГЛАВА 36

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ АНТИПРОТОЗОЙНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: к. м. н. Т.В. Продеус; к. м. н. С.А. Рабинович; к. м. н. Е.Н. Морозов;
д. м. н., проф. Э.Е. Шуйкина; д. м. н., проф. Ф.П. Коваленко;
д. м. н., проф. М.Н. Лебедева; акад. РАМН, проф. В.П. Сергиев;
к. м. н. О.А. Ириков; к. б. н. Л.В. Федянина; д. б. н., проф. Е.А. Черникова*

Введение

Протозойные инфекции — заболевания, вызываемые одноклеточными эукариотными микроорганизмами подцарства *Protozoa* [10], занимают значительное место в патологии человека и животных. Подцарство *Protozoa* охватывает большое количество разнообразных микроорганизмов, различающихся по своим морфологическим и физиологическим свойствам и по чувствительности к химиотерапевтическим средствам. Поэтому для оценки эффективности новых фармакологических веществ необходимы доклинические исследования в отношении каждого возбудителя, представляющего опасность для человека и относящихся к данному подцарству.

1. Изучение противоамебной активности фармакологических веществ

Наибольшее значение имеет амебная дизентерия, которая вызывается *Entamoeba histolytica*.

1.1. Изучение противоамебной активности лекарственных средств *in vitro*

Изучение противоамебной активности фармакологических веществ в опытах *in vitro* проводят с культурой *Entamoeba histolytica*.

Для исследований могут быть использованы как свежие штаммы энтамеб, выделенные от больных, так и лабораторные. Чистые культуры *Entamoeba histolytica* получить и поддерживать сложно, поэтому используют смешанные культуры, в которых рост амёб происходит в присутствии бактерий, сопутствующих амёбам в кишечнике больного. Наиболее простой средой для роста такой культуры является среда Павловой Е.А. [4], основой которой служит буферный раствор солей — $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ (0,59 г) и KH_2PO_4 (0,45 г) — в 1 литре физиологического раствора. рН раствора в пределах 6,5–6,8, его стерилизуют в автоклаве при 1 атм. в течение 30 мин. К охлажденному раствору добавляют нативную стерильную сыворотку крупного рогатого скота в соотношении 1:20, затем при соблюдении правил асептики производят разлив жидкой части среды по 5–8 мл в стерильные пробирки с рисовым крахмалом.

Для приготовления крахмала вымытый рис замачивают на 24 ч в водопроводной воде. Затем растирают в ступке и отмывают крахмал через сложенную в 3–5 слоев марлю. Крахмалу дают осесть, сливают воду и высушивают в термостате. Растертый в порошок крахмал рассыпают по пробиркам по 5–10 мг и стерилизуют сухим жаром при 180 °С в течение 25–30 мин до слегка розовато-коричневого тона.

Культуры амёб выделяют от больных амёбиазом. Посев кусочка слизи или кала больного производят на среду Павловой Е.А. В первые дни пересевы делают ежедневно. Амёбы вырастают на дне пробирки. Для наблюдения за ростом культуры со дна пробир-

ки пастеровской пипеткой берут каплю осадка и закрывают покровным стеклом (раздавленная капля). Амебы хорошо видны среди зерен крахмала при увеличении в 100 и 400 раз. Вегетативные формы в препарате сохраняют подвижность. Отчетливо видны внутренний и наружный слой цитоплазмы, вакуоли и включения (зерна крахмала, бактерии и т.д.). Цисты в культуре встречаются редко.

Штаммы поддерживают постоянными пересевами на свежую питательную среду. Пересевы рекомендуется производить каждые 72–96 ч.

Для определения концентрации препарата подавляющей рост амебы в культуре, пользуются различными модификациями метода серийных разведений. В качестве стандартных препаратов можно использовать эметин (активная концентрация 0,06 мкг/мл), фентролин (0,12 мкг/мл). Для контроля заражения в каждый опыт берут 3–5 пробирок без препаратов.

Для заражения готовят взвесь амеб. На 10–15 пробирок опыта берут 1–3 пробирки с 48-часовой культурой амеб. Взвесь приготавливают из осадков культур с таким расчетом, чтобы в препарате содержалось 15–20 амеб в поле зрения при увеличении в 100 раз. В каждую пробирку опыта вносят 0,25 мл взвеси амеб.

Учет результатов опыта проводят через 48, 72 и 96 ч. Определяют, есть ли амебы в капле из осадка на дне пробирки. Активной концентрацией считается то максимальное разведение препарата, при котором нет роста амеб.

При определении активности препарата следует учитывать, что действие изучаемого вещества может быть направлено не только на амеб, но и на сопутствующую бактериальную флору, гибель которой повлечет за собой исчезновение амеб из культуры. Столь существенного недостатка можно избежать, используя в эксперименте чистую культуру *Entamoeba histolytica*.

Для поддержания аксенической культуры дизентерийной амебы предложена и широко апробирована среда TYI-S-33 Diamond (1978), которая имеет ряд модификаций на основе замены триптиказы (гидролизата казеина) на перевар печени или полного отказа от указанных ингредиентов. Приготовление 1 литра модифицированного варианта LYI-S среды, содержащей перевар печени, дрожжевой экстракт, соль с ионом железа и сыворотку, включает следующие этапы: 1) растворение в 870 мл бидистиллированной или деионизированной воды 10 г нейтрального перевара печени; 10 г экстракта кормовых или пекарских дрожжей; 10 г глюкозы; 1,0 г L-цистеина гидрохлорида; 0,2 г аскорбиновой кислоты; 1 г K_2HPO_4 ; 0,6 г KH_2PO_4 ; 1 мл железозаменимой соли лимонной кислоты (коричневая форма — 22,8 мг/мл); 2) доведение pH до 6,8 путем добавления 1N NaOH; 3) разлив в колбы и автоклавирование при 121 °C 20 мин.; 4) внесение антибиотиков из расчета на 1 мл среды 1500 ЕД пенициллина и 100 ЕД стрептомицина.

Стерильную среду можно хранить при –20 °C несколько месяцев. Перед использованием в среду добавляют предварительно инактивированную сыворотку крупного рогатого скота в объеме 10–15%.

Для культивирования используют флаконы из стекла, объемом от 2 до 6 мл (инсулиновые), которые заполняют средой до «плечиков». Режим пересева через 48–72 ч. Рост амеб оценивают при микроскопии поверхности внутренней стенки флакона при малом увеличении микроскопа.

1.2. Изучение противоамебной активности лекарственных средств в исследованиях *in vivo*

Entamoeba histolytica патогенна для многих экспериментальных животных — кошек, собак, кроликов, морских свинок, крыс, хомяков и т.д., причем молодые животные значительно чувствительнее взрослых. У этих животных можно получить в эксперименте амебиаз кишечника и внекишечные поражения типа амебного абсцесса.

Для изучения активности новых химиотерапевтических средств при кишечном амебиазе удобной моделью следует считать кишечный амебиаз белых крыс, воспроизводимый путем интрацекального заражения крысят-отъемышей массой 21–25 г.

Для заражения крысят готовят взвесь амёб так же, как и для исследований *in vitro*. На одно животное берут 0,1–0,2 мл взвеси амёб.

Крыс нумеруют и взвешивают. Затем животных наркотизируют эфиром. Для этого их помещают в закрытую стеклянную банку, на дне которой находится смоченная эфиром вата. Как только животное принимает боковое положение, его вынимают и фиксируют на операционном столике брюшком вверх. В середине брюшка ближе к левой стороне выщипывают или выбривают шерсть. Затем смазывают брюшко йодом. В стерильных условиях послойно вскрывают кожу и мышцы живота. Для этого несколько левее средней линии живота делают разрез длиной примерно 0,5 см. С помощью хирургического пинцета (лучше применять глазные пинцеты) отыскивают червеобразный отросток, в конец которого через иглу шприца вводят инфицирующий материал в количестве 0,1–0,2 мл, затем иглу вынимают и рану зашивают послойно. На мышечный слой накладывают швы из шелка или кетгута, а края кожного разреза фиксируют шелком или скобами. Рана быстро заживает. У зараженных животных в слепой кишке, а иногда и в прилежащих отделах толстого кишечника, развивается специфический воспалительный процесс. Воспалительные изменения в слепой кишке достигают своего максимума на 5–7 день, после чего начинается обратное развитие процесса.

Изменения, наблюдающиеся в слепой кишке крыс, касаются ее слизистой оболочки, подслизистого и мышечного слоев, содержимого кишки и окружающих ее тканей, а также мезентериальных желез.

При максимально выраженных изменениях со стороны слепой кишки наблюдается значительное уменьшение ее размеров и изменение формы, вследствие образования перетяжек, вздутия и т.д. Спайки с подлежащими тканями наблюдаются редко. Мезентериальные железы увеличены.

При вскрытии кишки отмечается изменение характера содержимого. Вместо каловых масс имеется жидкое содержимое слизеподобного характера, где находятся отдельные гноевидные комочки, в которых при микроскопии обнаруживается большое количество амёб.

В ряде участков уплотненной, не имеющей складок слизистой оболочки слепой кишки видны изъязвления, покрытые гноевидными желтыми пробками, иногда с примесью крови. При гистологическом изучении язв установлено, что они располагаются в сложенной слизистой, инфильтрированной воспалительным экссудатом. В подслизистом и мышечном слоях также развиваются явления воспаления и обнаруживаются амёбы. Гноевидные пробки, покрывающие язвы, содержат остатки лейкоцитов и вегетативные амёбы. В некоторых амёбах встречаются фагоцитированные остатки лейкоцитов, эритроцитов и бактерий.

Состояние кишечной стенки, содержимого слепой кишки оценивают по четырехбалльной системе:

«4» — максимальные изменения, захватывающие всю стенку слепой кишки. Имеется резкое изменение в характере содержимого. Вместо каловых масс — слизисто-гнойное содержимое с большим количеством амёб;

«3» — изменения стенок кишки выражены слабее. Одновременно со слизисто-гнойным содержимым имеются и жидкие каловые массы;

«2» — слепая кишка изменена мало; имеются отдельные более уплотненные участки, жидкие каловые массы, содержащие отдельные гноевидные комочки с большим количеством амёб;

«1» — слепая кишка несколько уменьшена; уплотнения слизистой единичны. В содержимом отдельные амёбы;

«0» — отсутствие изменений и амёб в содержимом. Если амёбы в кишке при микроскопии не найдены, производится посев содержимого кишки на питательную среду Павловой Е.А. для подтверждения отсутствия амёб. Результат посева просматривается под микроскопом через 24 и 48 ч.

Исследуемые вещества вводят в различных дозах внутрь или парентерально. Начинают лечение через один час после инфицирования. Курс лечения, как правило, 5 дней. Животных подвергают эвтаназии на 6–7 день от начала исследования. Эффективность исследуемого вещества оценивают по различию показателей нарастания массы тела и патологической картине в кишечнике, а также по отсутствию возбудителя в кишечнике.

В качестве препарата сравнения можно использовать зметин, который в дозе 4 мг/кг при 5-дневном введении внутрь дает полное излечение животных, или биомицин, обеспечивающий 100% излечение животных при таком же курсе в дозе 59 мг/кг. Биомицин в дозе 100 мг/кг при однократном введении в день заражения также обеспечивает полное излечение животных.

2. Изучение противоямблзийной активности лекарственных средств

Возбудитель лямблиоза человека – *Lamblia (Giardia) intestinalis* – представляет собой одноклеточный организм, относящийся к отряду Diplomonadida. Лямблии обитают в двенадцатиперстной кишке и верхней трети тонкого отдела кишечника. Организм существует в вегетативной форме (трофозоит) и в виде цист, выделяющихся во внешнюю среду.

2.1. Изучение активности фармакологических веществ в отношении лямблий (*L. intestinalis*, *L. duodenalis*) в опытах *in vitro*

Рост *Lamblia intestinalis* в аксенических условиях обеспечивает среда TYI-S-33 в модификации Keister (1983). Состав и способ приготовления аналогичны описанному для *Entamoeba histolytica* с изменениями за счет внесения 50 мг/100 мл среды порошка натуральной желчи крупного рогатого скота; увеличения количества L-цистеина гидрохлорида до 0,2 г на 100 мл среды. рН среды колеблется в пределах 7,0–7,1.

Предпочтительна стерилизация среды фильтрованием под давлением с использованием фильтра с размером пор 0,22 мкм.

Штамм *L. intestinalis* поддерживают в термостате при 36,6 °С в наклонном положении флакона с постоянным пересевом на свежую среду каждые 48–72 ч.

Учитывая сложность постановки экспериментов *in vitro* для оценки противоямблзийной активности веществ используют сразу исследования *in vivo*.

2.2. Изучение противоямблзийной активности фармакологических веществ в исследованиях *in vivo*

Лабораторные животные не чувствительны к заражению *L. intestinalis*, но чувствительны к *L. muris*. Наиболее простой, но достаточно информативной моделью для оценки химиотерапевтической активности веществ при лямблиозе является экспериментальный лямблиоз белых мышей.

Для исследований используют белых мышей массой 13–15 г. Заражают животных взвесью, содержащей вегетативные формы лямблий и их цисты. Взвесь готовят из содержимого тонкой кишки спонтанно зараженных мышей. В дальнейшем регулярными пассажами можно специально поддерживать штамм лямблий.

Содержимое кишки спонтанно зараженных мышей выдавливают в емкость с физиологическим раствором и выдерживают при температуре 37 °С в течение 1–2 ч. В приготовленной взвеси, помимо цист, должно содержаться не менее 5–12 трофозоитов в поле зрения (увеличение 100×). Мышей заражают этой взвесью в объеме 0,3–0,5 мл через рот. Уже с 3 дня после заражения лямблии обнаруживаются в содержимом кишечника у всех мышей; с 10–15 дня количество лямблий в кишечнике уменьшается.

В тонком кишечнике лямблии распространены неравномерно. Наибольшее количество лямблий находится в верхней трети тонкой кишки. При применении ЛС возможен сдвиг в распределении лямблий по кишечнику. В связи с этим при оценке результатов

исследования необходимо готовить не менее трех препаратов из различных участков тонкой кишки, например из верхней, средней и нижней трети. Для обнаружения лямблий можно применять нативные препараты (например, раздавленную каплю) и окрашенные мазки. Следует учитывать, что помимо лямблий в кишечнике мыши (особенно в нижней трети тонкой кишки и верхнем отделе толстой) встречаются другие простейшие и гельминты. Наиболее часто обнаруживаются трихомонады, энтеромонас, хиломастикс, амёбы и их цисты, яйца гельминтов.

Введение лямблий существенно не влияет на общее состояние мышей. В первые 10 дней у них может быть жидкий кал. При вскрытии мышей кишечник выглядит вздутым, полнокровным; в толстой кишке — неоформленный кал, в тонкой — обильное количество масс творожистого вида. На ворсинках кишки и в ее содержимом при микроскопии обнаруживают в большом количестве вегетативные формы лямблий. Количество их колеблется от единичных в препарате до 50–70 в поле зрения при увеличении в 100 раз.

Изучаемое вещество начинают вводить с 3-го дня после заражения. Курс лечения составляет 5 дней. На 2-й день по окончании лечения всех мышей подвергают эвтаназии; исследуют содержимое их тонкого кишечника. О химиотерапевтической эффективности веществ судят по отсутствию лямблий при просмотре не менее 3-х препаратов, приготовленных из разных участков тонкого кишечника.

В качестве препаратов сравнения можно использовать акрихин или аминохинол, которые в дозе 400 мг/кг при 5-дневном введении внутрь приводят к 100% излечению животных.

При отсутствии в лаборатории культуры лямблий и их цист можно получить модель лямблиоза у мышей путем активации латентной инфекции левомецетином. Для воспроизведения модели используют белых мышей массой 30–40 г. Животным вводят в желудок по 1,0–2,5 мл 2% водной суспензии официального левомецетина 1–2 раза в сутки в течение 30 дней с интервалами в 3–4 дня в средней суточной дозе 1,0 г/1 кг.

Изучаемое вещество начинают вводить в желудок через 3 нед. после начала введения левомецетина, когда у всех животных развивается инфекция *L.muris*, подтверждаемая прижизненной микроскопией фекалий на наличие цист лямблий. Курс лечения составляет 5 дней. На 2-й день после окончания лечения всех животных (пролеченных и контрольных) подвергают эвтаназии. Об эффективности препарата судят по интенсивности выделения цист и количеству трофозоитов лямблий в соскобах слизистой тонкой кишки. Для определения интенсивности выделения цист лямблий исследуют фекалии от каждого животного. Пробу фекалий весом 40 мг суспендируют в 10 каплях физиологического раствора. Каплю суспензии окрашивают раствором Люголя и исследуют под микроскопом при увеличении 10×40. Подсчитывают число цист лямблий в 30 полях зрения. Для определения количества трофозоитов тонкую кишку каждой мыши разделяют на 8 равных отрезков, начиная от гастродуоденального соединения. С каждого отрезка кишки, разрезанного продольно, делают соскоб слизистой, который суспендируют в 3-х мл физиологического раствора. В камере Горяева подсчитывают в суспензии общее количество трофозоитов лямблий и число трофозоитов на 1 см длины в каждом из 8 отрезков, а затем — во всей тонкой кишке.

3. Изучение противотрихомонадной активности лекарственных средств

Трихомонады, простейшие жгутиковые микроорганизмы, относятся к семейству *Trichomonadidae*. Эти жгутиконосцы обитают в ЖКТ различных животных и человека. Только два представителя этого семейства — *Trichomonas vaginalis* и *Trichomonas foetus* — паразитируют в мочеполовых органах. Передача заболевания происходит половым путем. Трихомонады обнаруживаются на слизистой оболочке половых органов и могут быть выделены в чистой культуре. У человека наибольшее значение имеет *Trichomonas vaginalis*, которая вызывает уrogenитальный трихомониаз (трихомонадоз, трихомоноз).

3.1. Изучение противотрихомонадной активности фармакологических веществ в опытах *in vitro*

Определение противотрихомонадной активности веществ можно проводить в опытах с культурой трихомонад в пробирках, в культуре тканей, на куриных эмбрионах. Наибольшее распространение получили методы оценки активности препаратов в опытах с трихомонадами, растущими в чистой культуре [8] или в ассоциации с бактериями.

Штаммы трихомонад в ассоциации с бактериями, в частности с кишечной палочкой, можно культивировать на среде Павловой Е.А. (см. выше), перевивая такие культуры каждые 2–3 дня.

Активную концентрацию препарата, задерживающую рост трихомонад в культуре (трихомоноостатическую концентрацию), определяют методом серийных разведений. Объем среды 5 мл. Исходная концентрация препарата 1:1000, каждая последующая в 2 раза ниже, чем предыдущая. Одновременно с изучаемым, ставят ряд опытов со стандартным препаратом. В качестве стандартных применяют различные противотрихомонадные средства: метронидазол (активная концентрация 0,4–1,9 мкг/мл), трихомонацид (1,9–3,8 мкг/мл), осарсол — (500–1000 мкг/мл). В качестве контроля заражения берут 3–5 пробирок со средой, не содержащей химиотерапевтических препаратов.

Для опытов применяют культуру, содержащую не менее 80% подвижных трихомонад, что соответствует стадии логарифмического роста. Такая культура может быть получена через 24–48 ч после внесения в 10 мл среды 0,5–3 млн простейших. Заражающая доза в среднем составляет 10000–25000 трихомонад в 1 мл среды. Учет результатов опыта проводят в течение 2–5 дней.

Рост трихомонад заметен визуально, однако более точные результаты можно получить при микроскопическом исследовании содержимого пробирок. Его тщательно перемешивают и определяют количество трихомонад в препарате раздавленной капли в 125 полях зрения или в счетной камере. Активной концентрацией препарата считают такую минимальную концентрацию, которая полностью задерживает рост трихомонад.

Трихомоноцидное действие препарата определяется методом субкультур. Опыты ставят по методике для определения трихомоноостатического действия. После учета результатов эксперимента делают пересевы из каждой пробирки на свежую питательную среду. Объем пересеваемого материала — 0,25 мл. Через 48 ч для бактериальных и 96 ч для безбактериальных культур проводят учет результатов. Трихомоноцидной считается та минимальная концентрация, при которой рост простейших отсутствует как в культуре, так и в субкультуре.

При непосредственном контакте противотрихомонадных средств с простейшими наступает их гибель, которой предшествует остановка движения жгутиков и ундулирующей мембраны. Действие препаратов можно оценить по времени, которое необходимо для обездвиживания трихомонад. Для опытов заражающую взвесь трихомонад смешивают в равных количествах с раствором или взвесью химиопрепаратов в физиологическом растворе. Контролем является взвесь трихомонад с физиологическим раствором. Начальная концентрация вещества 10 мг/мл.

После тщательного смешивания из полученной культуры готовят висячие капли. Наблюдение за состоянием трихомонад проводят через 5, 10, 15, 20, 30, 45 мин и затем — каждый час. Опыты позволяют определить время наступления обездвиживания трихомонад при различных концентрациях препарата.

3.2. Изучение химиотерапевтической противотрихомонадной активности препаратов в исследованиях *in vivo*

Для оценки противотрихомонадной активности препаратов *in vivo* существует много моделей. В качестве инфицирующего агента для воспроизведения заболевания животных применяют не только *T. vaginalis*, но и другие виды трихомонад: *T. foetus*, *T. gallinae*, *T. muris* и др. Но, учитывая наибольшее значение *T. vaginalis* в заболеваемости человека,

целесообразно использовать в качестве инфицирующего материала именно этот возбудитель.

В зависимости от области введения *T. vaginalis* у животных развиваются местные воспалительные процессы; при подкожном или внутримышечном введении у мышей развиваются абсцессы, при внутрибрюшинном введении простейших — перитонит; при внутривлагалищном введении крысам, хомякам и морским свинкам можно вызывать трихомоноз половых органов. Наиболее простой в исполнении и достаточно информативной можно считать экспериментальную модель абсцесса у белых мышей, вызванную *T. vaginalis*. При обнаружении высокой активности препарата на этой модели целесообразно провести исследование на экспериментальной модели трихомонадного вагинита белых крыс.

4. Изучение противолейшманиозной активности лекарственных средств

Инфекции, вызванные лейшманиями, чаще развиваются в странах с жарким климатом и имеют для России значение завозных инфекций.

В лабораторных условиях чаще всего используют следующие виды лейшманий:

Leishmania donovani, *L. infantum* — возбудители висцерального лейшманиоза;

L. major, *L. tropica* — возбудители кожного лейшманиоза Старого Света;

L. braziliensis — возбудитель кожно-слизистого лейшманиоза.

Перечисленные виды лейшманий патогенны для человека и потому требуют при работе соответствующих мер предосторожности.

Возбудители разных нозологических форм лейшманиозов имеют большое морфологическое сходство. В жизненном цикле лейшманий имеются две стадии развития. Одна из них развивается в организме млекопитающих как внутриклеточный паразит моноцитарных клеток кожи (кожные формы инфекции) и внутренних органов (печень, селезенка, костный мозг и др.) при висцеральном лейшманиозе. Это лейшманиальная форма — амастигота. Она неподвижна и не имеет жгута. Промастигота (лептомонада) (жгутиковая форма) развивается в организме москита (флеботомуса), переносчика данной группы инфекций, а также в культурах на искусственных питательных средах при температуре в интервале 20–28 °С и в переживающих культурах перитонеальных макрофагов при 37 °С.

4.1. Изучение противолейшманиозной активности веществ в исследованиях *in vivo*

4.1.1. Метод серийных разведений со жгутиковыми формами

Промастиготные формы лейшманий легко культивируются на плотной кровяной среде, оптимальный температурный режим 22–25 °С, в темноте. В исследованиях используют культуру на второй неделе роста (6–12 дней) в виде суспензии паразитов, полученной из смыва культуры с поверхности питательной среды. Поддержание музейных препаратов на плотных кровяных средах осуществляют перевивкой культур петлей в возрасте 21–24 дня. Общеизвестна кровяная среда NNN (Novy-Neal-Nicolle), ее состав: агар-агар — 14,0 г, хлористый натрий — 6 г, дистиллированной воды — 900 мл. К сваренному и проавтоклавированному агару (1,5 атм.–20 мин) добавляют 20% по объему дефибринированной свежезятой кроличьей крови, при этом нужно учесть, чтобы кровь не свернулась, т.е. исходная температура агара не должна превышать 53 °С [2]. Агар перемешивают с кровью, быстро разливают по пробиркам и скашивают. Каждую порцию среды проверяют на стерильность при 37 °С в течение 24–72 ч. В дальнейшем с целью повышения урожайности культуры была предложена двухфазная среда. В качестве твердой фазы был взят кровяной агар NNN, жидкой фазой служила смесь среды 199 и 0,5% раствора гидролизата лактальбумина. Среды разливали в конические колбы объемом 0,75–1 л. В колбу наливали 60–75 мл агара, 0,7% хлористого натрия

(0,53 г). Агар автоклавировали при + 5 атм. 20 мин. В расплавленный агар, остуженный до 53 °С, вносили 7–10 свежевзятой дефибринированной кроличьей крови. Содержимое колбы перемешивали круговыми движениями, избегая образование пузырей на поверхности агара. Кровавый агар после застывания помещали в термостат при 37 °С на 24–48 ч для проверки на стерильность. По окончании инкубации на стерильный агар наслаивали по 25–30 мл как среды 199, так и гидролизата лактальбумина, т.е. объем жидкой фазы достигал 50–60 мл. Ватные тампоны заменяли на стерильные резиновые пробки. Вновь контролировали среду на стерильность. Для посева использовали смывы культур из пробирок или из колб из расчета не более 10×5–10×6 кл./мл свежей среды. Лейшманий выращивают в темноте при оптимальной для роста промастигот температуре 22–25 °С. Температура выше 28 °С отрицательно влияет на состояние культуры. Культура пригодна для исследований в возрасте с 5-го по 10–12 дни. Число паразитов в 1 мл культуры варьирует от 1×10⁷ до 30–50×10⁷, т.о. в 1 колбе можно получить 1,5–2,5 млрд. промастигот за несколько дней. Культуры лейшманий на кровяных средах поддерживают без применения антибиотиков. Лейшмании — относительно медленно растущие микроорганизмы. Кровавые среды — прекрасный субстрат для развития разнообразных микроорганизмов. Поэтому необходимо очень тщательное и высокопрофессиональное выращивание культуры этой группы протистов.

Для исследований по оценке противолейшманиальной активности изучаемых веществ готовят стерильную среду следующего состава: дефибринированной крови кролика 1 объем, 6,3%-ного раствора хлористого натрия — 1 объем, 6 объемов дистиллированной воды. Полученную среду центрифугируют, отсасывают жидкую фазу и хранят ее на холоде. Перед исследованием 2 объема среды смешивают с 1 объемом свежей кроличьей сыворотки. Рассчитывают объем среды для конкретного исследования. В контрольные пробирки вносят чистую среду. В опытные пробирки вносят среду, в которую предварительно добавляют суспензию промастигот лейшманий из расчета 1×10⁶ в мл и тщательно размешивают. Эту смесь разливают по мини-пробиркам в объеме 0,47 мл, затем в каждую опытную пробирку вносят двукратные разведения испытуемых веществ, в объеме 0,03 мл. Через 5 дней инкубации при 22–25 °С в темноте содержимое пробирок исследуют в свежем и окрашенном мазке и таким образом определяют минимальную концентрацию препарата, которая полностью подавляет рост промастигот, т.е. лейшманиястатическую концентрацию испытуемого вещества.

4.1.2. Метод «висячей» капли

Культура, приготовленная так, как описано в предыдущем разделе, может быть исследована методом «висячей капли». На ряд покровных стекол наносят по 1 стандартной капле взвеси паразитов любого вида и равной по объему капле испытуемого препарата в различных концентрациях. Стандартная заражающая взвесь должна содержать не менее 2×10⁶ промастигот в 1 мл. Препараты микроскопируют при ув. об. 40х. Для этого после смешивания раствора химиотерапевтического препарата со взвесью культуры стекла с каплями осторожно переворачивают каплей вниз и тщательно притирают к лунке предметного стекла. Края покровного стекла заливают разогретым парафином. Результаты регистрируют через разные временные интервалы (мин, ч, сут). Исследование проводят при температуре 22–25 °С. Контролем служит препарат, в котором капля культуры смешивается с физиологическим раствором. В подобных препаратах можно наблюдать изменения подвижности и морфологии жгутиконосцев под воздействием ЛС.

4.1.3. Метод серийных разведений с лейшманиальными формами

Исследование лейшманиястатической концентрации веществ в отношении к амастиготам лейшманий разных видов проводят на суспензии клеток печени и селезенки золотистых хомячков и мышей на последних стадиях развития висцерального лейшманиоза,

когда сформировался гепатолиенальный синдром и кахексия. Для работы используют стандартные сбалансированные солевые растворы (Эрла, Хенкса и пр.) или питательные среды (среда 199, 0,5 %-процентный раствор гидролизата лактальбумина, RPMI-1640 и др.). Важно не изменять состав сред при выполнении всей серии исследований. К любой из выбранных сред добавляют 10% (по объему) стерильной бычьей (коровьей) сыворотки. Все этапы исследования проводят с соблюдением стерильности. Выделенный орган от больного животного измельчают в одной из перечисленных сред, суспензию подвергают непродолжительному мягкому центрифугированию для осаждения крупных частиц и клеток. Надосадочную жидкость, содержащую основную массу паразитов, отсасывают. Под микроскопом определяют качество суспензии и число паразитов в поле зрения при ув. об. 40х, т.к. точный подсчет амастигот в гемоцитометре затруднен. Всю серию исследований стараются проводить примерно при одном и том же содержании паразитов в суспензиях органов. При постановке исследования в мини-пробирки разливают по 0,45 мл ряд разведений исследуемого препарата. Затем в каждую пробирку вносят по 0,05 стандартной суспензии паразитов. Исследование проводят при температуре 22–25 °С и постоянном встряхивании пробирок 60 раз в 1 мин в продолжении всего исследования. Через 24 ч содержимое пробирок исследуют под микроскопом. Через сутки повторяют микроскопический анализ состояния опытных культур и содержимое пробирок, в которых отмечено снижение активности роста культуры или его полное угнетение, высеивают в пробирки на косяки кровяного агара. В течение двух недель наблюдают за развитием культуры промастигот на среде с целью уточнения активности действия препарата — цитостатического или цитотоксического.

Более точный в количественном отношении и в физиологическом плане результат дает исследование действия препарата выполненное на переживающей культуре перитонеальных прилипающих клеток (макрофагов) грызунов. Эта методика позволяет проводить наблюдения за результатами действия препаратов по единой методике за видами лейшманий, возбудителями висцерального, кожного и кожно-слизистого лейшманиоза, а также на животных разных линий как чувствительных, так и устойчивых к лейшманиям. Последнее очень важно, т.к. известно, что лейшманиоз у линий мышей, чувствительных к нему, излечивается менее успешно, чем у устойчивых.

Работать целесообразнее на линейных мышах, так как можно получить достаточный по объему и числу пул генетически однородных клеток. Можно работать как с активированными макрофагами, так и с неактивированными. В первом варианте можно получить больший выход клеточной массы. Переживающая культура прилипающих перитонеальных клеток или тканевых макрофагов из печени и селезенки мышей и хомяков широко применяется в иммунологических, микробиологических и вирусологических исследованиях. Для изучения эффективности химиотерапевтических препаратов против лейшманий пригодна любая методика ведения культуры. Поэтому отметим ниже лишь особенности ведения культуры лейшманий на макрофагах *in vitro*. В естественных условиях *in vivo* у теплокровных лейшмании поражают именно зрелые клетки моноцитарного ряда, т.е. макрофаги, в которых развиваются и размножаются паразиты. Спустя сутки после выделения макрофагов, когда они уже хорошо распластаются на стекле, их заражают промастиготами из расчета: 1000 макрофагов на 1 стекло в пробирку с культурой и 5–10 тысяч промастигот на 1 пробирку с культурой макрофагов. Заражение клеток лейшманиями происходит в течение ближайших несколько часов инкубации, спустя 1–3 ч после заражения и инкубирования культуры при 37 °С проникшие в макрофаги промастиготы трансформируются в амастиготы. По окончании инкубации клеток с паразитами среду заменяют. Принципиальную важность имеет сохранение единообразия условий заражения на протяжении выполнения всей серии экспериментов. Препарат можно вводить одномоментно с заражением макрофагов или после заражения и смены среды. Это позволяет оценить действие препарата на процессы инвазии и фагоцитоза промастигот макрофагами и на внутриклеточное разви-

тие амастигот. Используя макрофаги мышей, оппозитных по чувствительности линий животных к лейшманиозу, можно оценить размах вариации эффективности препарата в генетически неоднородной популяции животных или человека. Интенсивность размножения паразитов можно оценить по активности включения трития или меченого углерода, а также путем микроскопического анализа. Подсчитывают число амастигот внутриклеточных и свободных — в культуре на 100 клеток моноцитарного ряда (или ядер). Далее определяют среднее число паразитов на 1 клетку хозяина. Продолжительность роста амастигот в монослое перитонеальных клеток мышей минимальна для возбудителей висцерального лейшманиоза и составляет 5–7 дней и более 10 дней — при заражении монослоя слабовирулентными штаммами дерматропных видов возбудителей. Следует учитывать различие активности роста паразитов в макрофагах мышей, оппозитных по чувствительности к лейшманиям, поэтому оптимально проводить одновременную оценку препарата по этим показателям.

Методика исследования химиотерапевтических препаратов в монослое перитонеальных прилипающих клеток позволяет отказаться от трудоемкого и мало информативного в количественном отношении метода культивирования *in vitro* кусочков ткани больного лейшманиозом животного.

4.2. Исследование противолейшманиальной активности веществ в исследованиях *in vivo*

Исследования проводят на моделях висцерального и кожного лейшманиозов.

4.2.1. Исследование химиотерапевтической активности препаратов при экспериментальном висцеральном лейшманиозе

Лечебное действие противолейшманиальных препаратов изучают преимущественно на золотистых хомяках в связи с их высокой восприимчивостью к висцеральному лейшманиозу. При заражении патогенным материалом у хомяков развивается генерализованный висцеральный лейшманиоз, и животные погибают от интенсивного поражения селезенки, печени системы кроветворения с явлениями пролиферации ретикуло-эндотелиальной системы. Важным показателем развития инфекции является спленомегалия, гепатомегалия и кахексия. Поэтому у зараженных животных необходимо оценить массу тела животных, а при эвтаназии и массу селезенки, чтобы определить селезеночный индекс (отношение массы селезенки к массе тела большого животного). Все эксперименты на хомяках нужно выполнять на животных 2-месячного возраста, масса которых около 30 г. После заражения, лучше в селезенку, хомяк продолжает расти около месяца. Затем рост прекращается, масса тела остается на одном уровне в течение 1–2 недель, а потом уменьшается. Это свидетельствует о становлении иммунного конфликта, о начале развития сплено- и гепатомегалии. В этот период инфекции число паразитов во внутренних органах становится достаточным для их обнаружения. Угнетение развития и размножения паразитов под влиянием химиотерапевтических препаратов продлевает период относительного благополучия в течении лейшманиоза, развитие спленомегалии и кахексии будет сдвинуто на более поздние сроки.

Для экспериментальной оценки эффективности фармакологических веществ используют метод исследования, позволяющий в течение 8 дней получить результат. Кратко этот метод состоит в следующем: животных заражают введением в селезенку (хомяков) или внутривенно (мышей) суспензии из селезенки инфицированного животного или промастиготами из культуры на второй неделе роста и вводят препараты внутривентально в течение 6 дней, начиная со дня заражения. На 8-й день исследования животных подвергают эвтаназии, подсчитывают число паразитов в отпечатках из внутренних органов на 1 ядерную клетку хозяина у леченых и контрольных животных. Сравнивая эти показатели, делают заключение об активности препарата.

4.2.2. Изучение химиотерапевтической активности препаратов при экспериментальном кожном лейшманиозе

Экспериментальный кожный лейшманиоз воспроизводят амастоготами на белых мышках. В качестве возбудителя заболевания используют следующие виды лейшманий: *L. major*, *L. tropica*.

Заражение животных промастиготами более близко к естественному, так как оно подобно укусу переносчика. Кроме того, эти формы легко культивировать на искусственных питательных средах и дозировать под контролем гемоцитометра. Однако в процессе длительного культивирования промастигот на искусственных питательных средах вирулентность их утрачивается. Чтобы предотвратить это явление, рекомендуют хранить паразитов в стеклянных капиллярах при низкой температуре (-70°C) в смеси с 7,5% глицерина. По мере необходимости выдержанные при низкой температуре клетки пересеивают на искусственную питательную среду.

При заражении животных амастиготами используют кусочки пораженной лейшманиозом кожи. Их измельчают, растирают с песком, добавляют физиологический раствор и антибиотики (пенициллин и стрептомицин по 100 ЕД на 1 мл физиологического раствора) и фильтруют через ватный фильтр. На каждое животное используют примерно 10–120 мг пораженной ткани. Патогенный материал вводят внутрикожно.

4.2.2.1. Экспериментальный кожный лейшманиоз белых мышей

Для исследований отбирают мышей массой 16–18 г. За 2 дня до заражения у животных выщипывают шерсть на спине у основания хвоста на участке диаметром $2 \times 2,5$ см. Заражение осуществляется культуральными формами высоковирулентных штаммов *L. major*, выделенных из язв человека или грызунов. Культуру лейшманий выращивают при температуре $20-25^{\circ}\text{C}$ на среде NNN. Для заражения используют 2-недельную культуру. Для получения взвеси культуру смывают с поверхности среды физиологическим раствором, переносят в стерильную колбу с бусами и тщательно встряхивают. Подсчет промастигот производят в гемоцитометре и готовят такую взвесь, которая содержит 10^6 паразитов в объеме 0,05 мл. Эту заражающую дозу вводят животным внутрикожно в область основания хвоста.

После короткого инкубационного периода (5–10 дней) у мышей на месте введения культуры образуется типичная лейшманиома: сначала появляется блестящий плотной консистенции бугорок, который через 5–7 дней подвергается эрозии. Эрозия начинается с центра, и постепенно на месте бугорка образуется язва, имеющая вначале небольшие размеры ($1-2 \text{ мм}^2$). В дальнейшем она увеличивается и приобретает характерный вид: округление контура, валикообразный край по периферии. В содержимом бугорка (при проколе его) или в отпечатках с поверхности язвы, сделанных в этот период, имеется большое количество расположенных в макрофагах и свободно лежащих лейшманий. Отделяемое язвы засыхает с образованием корки, которая плотно прилегает к краям язвы. При надавливании на корку по краям язвы выступает серозная жидкость, содержащая большое количество лейшманий. В течение 2–3 месяцев язва сохраняет свой первоначальный вид, затем инфильтрат, окружающий язву рассасывается и уплощается, исчезает валикообразный край, язва приобретает неправильную форму, корка становится все массивнее, и наконец язва теряет свой характерный вид. В ряде случаев процесс приводит к гангрене хвоста. Иногда он сопровождается появлением у мышей вторичных лейшманиом на мордочке, ушах, лапках и хвосте.

Введение испытуемого вещества можно начинать как в день заражения (профилактическое исследование), так и в разных стадиях развития инфекции (лечебное исследование). Для предварительного ориентировочного исследования химиотерапевтической эффективности вещества наиболее удобными сроками начала лечения мышей являются 12-е и 35-е сутки. На 12-е сутки, как правило, у мышей начинает образовываться язва. К 35-м суткам у всех мышей имеются развитые лейшманиомы. Препараты, оказавшиеся

эффективными, следует изучить при более позднем применении — через 3 и 6 месяцев после заражения.

Вводят препараты ежедневно один раз в сутки в течение 20 дней различными способами в зависимости от задачи исследования. Критерием эффективности препарата служат следующие показатели: 1) степень местного поражения; 2) размер лейшманиомы; 3) наличие лейшманий в язве; 4) гистологическая картина лейшманиомы.

Степень местного поражения определяют следующим образом: «0» — отсутствие поражения; «+» — инфильтрация; «++» — изъязвление; «+++» — образование язвы с коркой; «++++» — обширная язва; «++»- затихание процесса, начало эпителизации; «+» — дальнейшее заживление, сопровождающееся шелушением; «0» — полная эпителизация.

Сумма крестов в группе животных в каждый момент исследования, деленная на число животных в группе, составляет среднюю степень поражения для группы. Суммируя эти показатели по окончании исследования и деля полученную сумму на число наблюдений, получают среднюю степень местного поражения за все исследование.

Размер лейшманиомы определяют путем измерения ее длины и ширины и вычисления площади пораженного участка в мм². Сумма размеров отдельных язв, деленная на число животных в группе, составляет средний размер лейшманиомы для этой группы животных. Количество лейшманий в отпечатках из язв оценивается по следующей схеме: «0» — отсутствие лейшманий; «+» — 1 лейшмания на 1–9 полей зрения; «++» — от 2 до 10 лейшманий в 1-м поле зрения; «+++» — от 11 до 50 лейшманий в 1-м поле зрения; «++++» — более 50 лейшманий в 1-м поле зрения.

Степень местного поражения и площадь пораженного участка определяют каждую неделю, а наличие лейшманий в отделяемом язвы — 2 раза в месяц.

Показатель эффективности вычисляют по формуле:

$$\frac{(A - B)}{A} \times 100,$$

где A — средняя степень местного поражения за все исследование в группе контрольных мышей; B — средняя степень местного поражения за все исследование в группе леченых животных.

Вещества, имеющие показатель эффективности более 30%, следует отнести к группе активных. Однако практический интерес могут представлять лишь вещества с показателем эффективности, близким к 50%.

5. Изучение противомаларийной активности лекарственных средств

Возбудителями малярии человека являются плазмодии пяти видов: *P. vivax*, *P. malariae*, *P. falciparum*, *P. ovale* и *P. knowlesi*. Однако у мелких лабораторных животных эти виды плазмодиев не вызывают развитие инфекции. Поэтому в качестве модели применяется малярийная инфекция, вызванная другими видами плазмодиев, — возбудителями малярии птиц и грызунов. Отмечено большое сходство в цикле развития малярии у этих животных и у человека, а также в их отношении к лекарственным веществам.

Изучение противомаларийной активности различных соединений проводится, в основном, на следующих моделях: цыплятах, зараженных *P. gallinaceum* и мышах, зараженных *P. berghei*. Указанные виды животных при достаточном количестве введенных паразитов восприимчивы к малярийной инфекции в 100% случаев. Можно проводить исследования также на утках при заражении *P. cophurae* и обезьянах, зараженных разными видами плазмодиев (*P. cynomolgi*, *P. knowlesi* и др.), причем *P. cynomolgi* вызывает у обезьян рецидивирующий тип малярии.

Малярийный паразит в разных стадиях своего развития может обладать неодинаковой чувствительностью к одному и тому же препарату. Поэтому действие противомаларийных препаратов изучается применительно к разным стадиям развития плазмодия.

В развитии малярийного паразита в организме позвоночного хозяина существуют, как известно, эритроцитарный и тканевый (экзоэритроцитарный) циклы. Спорозоиты при укусе зараженного комара проникают у птиц в макрофагальные клетки тканей разных органов и в эндотелий сосудов, у млекопитающих — в паренхиматозные клетки печени, где размножаются шизогонией. Эти стадии развития паразитов обозначают как преэритроцитарные, или ранние тканевые, формы. Спустя определенный срок мерозоиты тканевых форм проникают в кровь и продолжают свое развитие в эритроцитах (эритроцитарная шизогония). В эритроцитах наряду с бесполовыми формами образуются также половые (гаметоциты, гамонты). В цикле развития некоторых видов малярийных паразитов, помимо преэритроцитарных стадий, предполагается также наличие параэритроцитарных, или поздних тканевых стадий, их развитие может идти параллельно эритроцитарной шизогонии. Эти тканевые формы в дальнейшем также образуют мерозоиты, способные проникать в кровь и развиваться в эритроцитах.

Для определения полного спектра действия исследуемого соединения изучается его влияние, в основном, на бесполое эритроцитарные формы (шизонты), тканевые формы и гамонты.

5.1. Изучение действия препаратов на бесполое кровяные стадии

Цыплят и кур заражают в основном теми же методами, которые применяются для заражения певчих птиц, однако чем более крупных птиц берут в исследование, тем большее количество крови с паразитами им надо вводить. Кровью, полученной из сердца от 2–3 цыплят в возрасте 3–6 недель, можно заразить партию в 50 цыплят.

Мышей заражают внутрибрюшинно или внутривенно. Для заражения небольшого количества мышей кровь берут из хвоста, отрезав его кончик; заражение больших партий мышей производится кровью, полученной из сердца, а затем разведенной физиологическим раствором с таким расчетом, чтобы в 0,2 мл вводимой жидкости содержалось примерно 1–2 млн. паразитов. Инфекция развивается также при заражении мышей под кожу, однако при этом число паразитов нарастает не так бурно, а у части мышей инфекция совсем не развивается.

Для поддержания штамма на цыплятах или грызунах им вводят кровь, разведенную обычно 1:10 физиологическим раствором с добавлением к нему лимоннокислого натрия.

При внутримышечном заражении молодые цыплята и мыши погибают от инфекции почти в 100% случаев. Часть более взрослых цыплят и кур выживает.

У зараженных молодых цыплят при относительно высоком количестве введенных плазмодиев наблюдается бурное развитие инфекции. Первых паразитов обнаруживают на 4–6-й день после заражения, и птицы погибают в разные сроки (через 1–4 недели в зависимости от условий исследования) с большим содержанием паразитов в крови. Однако встречаются отдельные особи, у которых инфекция развивается медленно, число паразитов не достигает высокого уровня и через какой-то срок их совсем не удается обнаружить.

У цыплят и кур течение инфекции существенно зависит от возраста животных. Так, у зараженных внутримышечно цыплят в возрасте примерно от 1 до 2-х месяцев отмечается бурное нарастание числа паразитов, и птицы погибают спустя 2–4 недели после заражения. У более взрослых цыплят и кур инфекция развивается медленнее, паразиты могут спонтанно исчезать из периферической крови, а потом вновь обнаруживаться, подобно тому, как это наблюдается у канареек. Чем старше цыплята, тем больший их процент выживает. Однако паразиты в их крови сохраняются, что можно доказать, как указывалось выше, положительной изодиагностической пробой.

При внутривенном заражении молодых цыплят паразитов обнаруживают в крови уже через 1–2 дня. Количество плазмодиев быстро нарастает, и птицы гибнут через 7–15 дней после заражения.

У мышей, зараженных внутрибрюшинно или внутривенно, инфекция протекает остро и заканчивается смертью животных на 8–18-й день в зависимости от числа введенных плазмодиев, линии животных и особенностей штамма. При этом методе заражения первых паразитов можно обнаружить в крови уже на следующий день, а при введении их под кожу — на 4–5-й день после заражения.

Исзуемое вещество вводят либо тотчас после заражения животных (иногда до него), либо в период обнаружения паразитов в периферической крови. Эффективность препарата устанавливается при применении ряда критериев, основанных на различии в сроках появления плазмодиев в крови и интенсивности их размножения. Для этой цели мазки крови, взятые от животных, получавших изучаемое вещество, и окрашенные по Романовскому, подвергают микроскопическому исследованию с иммерсионной системой.

Количество паразитов в крови, или «уровень паразитемии» оценивают по шкале Мошковского (см. табл. 1). Число паразитов обозначается в баллах от 1 до 7, выражающих логарифм числа паразитов при основании 5 или знаками от ((+)) до +++++. Шкала построена для условного препарата, соответствующего 625 полям зрения, со средним содержанием по 125 эритроцитов в поле зрения.

Таблица 1

Условные обозначения содержания паразитов в крови

Балл	Обозначение	Число паразитов	
		По полям зрения	В условном препарате
1	((+))	1 паразит в 125 полях зрения	5
2	(+)	1 паразит в 25 полях зрения	5 ² =25
3	+	1 паразит в 5 полях зрения	5 ³ =125
4	++	1 паразит в 1 поле зрения	5 ⁴ =625
5	+++	5 паразитов в 1 поле зрения	5 ⁵ =3 125
6	++++	25 паразитов в 1 поле зрения	5 ⁶ =15 625
7	+++++	Поражены почти все эритроциты, в поле зрения много свободных паразитов	5 ⁷ =70 000

Активность препаратов устанавливают на основании ряда критериев. Одним из показателей является определение различий в длительности инкубационного периода (в днях) у леченых животных по сравнению с контрольными при достижении в обеих группах одинакового эффекта. Условно длительность инкубационного периода для каждого исследуемого животного определяют числом дней, истекших с момента заражения до появления в крови одного паразита в поле зрения (++) . Учитывают срок появления паразитов в крови у отдельных животных и определяют средний показатель длительности инкубационного периода для каждой группы. Этот критерий назван Ш.Д. Мошковским сопоставлением активности «по горизонтали».

Другим критерием — сравнением «по вертикали» — является оценка на основании показателя числа паразитов в крови в определенный день от момента заражения цыплят. Как и в первом случае, определяют среднее для каждой группы, исходя из данных, полученных для каждого животного. Количество плазмодиев измеряют в баллах или условных крестах.

Третьим критерием является сравнение среднего количества плазмодиев в крови на протяжении срока, истекшего со следующих суток после прекращения лечения до периода падения числа паразитов.

Может представить интерес также изучение кинетических кривых изменения содержания паразитов в крови в процессе всего развития инфекции, определение характера

кривых при заражении животных разным количеством паразитов и изменение этих кривых под влиянием ЛП в зависимости от доз и сроков введения.

С целью определения степени активности исследуемого препарата в том же исследовании параллельно с ним изучается активность препарата, принятого за стандарт. В качестве стандарта может быть взят хорошо изученный противомаларийный препарат.

На основании сопоставления величины доз изучаемого и стандартного препаратов, вызывающих одно и то же торможение в развитии паразитов, судят о степени активности изучаемого соединения.

5.2. Изучение действия препаратов на тканевые формы паразитов

Моделью для изучения действия препарата на тканевые формы могут служить зараженные малярией животные, у которых обнаруживаются экзоэритроцитарные стадии плазмодия. Наиболее широко распространенной моделью для данных исследований являются цыплята, экспериментально зараженные спорозитами *P. gallinaceum*. В мазках из головного мозга цыплят удается обнаружить через несколько дней после введения им спорозитов тканевые формы паразита почти в 100% случаев. Они имеют вид вытянутых протоплазматических тяжей (1–15 мм и более в длину) с большим количеством ядер внутри. Такие образования заполняют на небольшом участке просвет капилляра.

Заражение цыплят производят взвесью спорозитов в физиологическом растворе или через укусы зараженного комара.

Культуру комаров *Aedes aegypti*, переносчиков *P. gallinaceum*, легко поддерживать в лабораторных условиях. Самки комара, напившиеся кровью, через 4–5 сут откладывают яйца на влажный субстрат — влажную фильтровальную бумагу. Яйца закладывают в кристаллизаторы с дистиллированной водой и добавляют органические вещества — рис, дафний и др., являющиеся кормом для личинок. Из яиц вылупляются личинки, которые после линек превращаются в куколки. Куколок вылавливают, переносят в небольшие сосуды с водой, которые помещают в марлевые садки. Через 1–2 дня вылетают окрыленные комары. Оптимальные условия для содержания комаров: температура 25–26°С, влажность 70–80%.

Вылетевшие из куколок комары начинают пить кровь лишь через несколько дней. Обычно комаров кормят, помещая на садок ватку, смоченную 4% раствором глюкозы. Яйца комаров можно хранить длительный срок в высушенном виде при комнатной температуре без доступа света, а затем по мере необходимости получать из них культуру комара.

За 10–12 дней до постановки намеченного исследования комаров заражают на птице с паразитами в крови. Предварительно комаров заставляют голодать не менее суток. Напившихся на птице комаров отсаживают в отдельный садок, который содержат при указанных выше условиях температуры и влажности. Спустя несколько дней вскрывают 1–2-х комаров, чтобы установить степень их зараженности. На 4–6-е сутки в желудках комаров обнаруживаются цисты, а на 8–10-й день в слюнных железах отмечается наличие спорозитов.

С целью изучения действия препаратов на тканевые формы плазмодия часто применяется методика заражения цыплят взвесью спорозитов. Комаров со зрелыми спорозитами вылавливают из садка в пробирки, оглушают парами эфира, обрывают у них ножки, отделяют грудку со слюнными железами и растирают в ступке с небольшим количеством физиологического раствора (0,5 мл). Желательно добавлять равное количество нормальной куриной сыворотки. Полученную взвесь спорозитов разводят физиологическим раствором и вводят цыпленку по 0,2 мл жидкости из расчета 0,5 или 1 комар на птицу. Заражение производят в грудную мышцу цыпленка, иногда в вену.

При отсутствии культуры комаров действие препаратов на тканевые формы может изучаться на цыплятах, зараженных суспензией из растертых органов, в которых при предварительном микроскопическом исследовании установлено наличие тканевых

форм. Органы (селезенка, мозг, печень), в которых содержится большое количество экзозооэритроцитарных паразитов, тщательно растирают в физиологическом растворе, после чего тканевую взвесь вводят внутримышечно цыплятам. Можно применять также внутривентриальное заражение.

При заражении спорозоитами тканевые формы в мозгу птиц обнаруживаются примерно на 10-е сутки, иногда — несколько раньше. Наличие паразитов в периферической крови отмечается на 7–9-й день. Часть цыплят погибает через 10–20 дней после заражения при наличии разного количества экзозооэритроцитарных и эритроцитарных форм, часть же птиц живет более длительный срок; в мозгу и крови таких цыплят паразиты иногда не обнаруживаются в течение длительного срока. Однако затем птица может погибнуть ввиду содержания большого количества тканевых паразитов в капиллярах мозга.

При изучении действия препаратов на тканевые формы необходимо устанавливать наличие или отсутствие этих форм в разных фазах инфекции. С этой целью применяют прижизненную пункцию мозга цыпленка. Шприцем с толстой иглой делают укол в область больших полушарий, насыщают в иглу некоторое количество мозгового вещества, делают из него толстый мазок на предметном стекле, фиксируют его в 96% спирте и окрашивают по Романовскому. Цыпленок может перенести несколько прижизненных пункций.

Тканевые формы в капиллярах мозга обнаруживаются большей частью в период наличия эритроцитарных форм в крови и являются таким образом поздними, или паразитоэритроцитарными формами. Ранние тканевые формы указанным путем обнаружить, как правило, не удается; их исследуют на гистологических срезах методами, которые для массовых исследований при изучении активности соединений не применяются.

Изучаемые препараты вводят зараженным цыплятам *per os*, подкожно, внутривенно. Длительность курса варьирует в зависимости от задач исследования.

Для изучения способности препарата воздействовать на спорозоитов его следует вводить птице в течение некоторого времени до ее заражения с таким расчетом, чтобы ко дню введения спорозоитов концентрация препарата в организме цыпленка достигла достаточно высокого уровня. При изучении действия препарата на ранние тканевые формы его вводят за несколько часов или вскоре после инъекции спорозоитов и далее в течение 3–5 дней. Если нет необходимости уточнять действие препарата на ранние или поздние тканевые формы, курс лечения можно продлить до 2-х недель.

Для микроскопического исследования кровь берут у цыплят ежедневно, начиная примерно с 7-го дня после заражения; пункцию мозга производят с 8–10-го дня 3–4 раза на протяжении инфекции.

Если в течение 1–2-х месяцев наблюдения в мазках из крови и мозга цыплят обнаружить паразитов не удастся, делают вывод, что препарат оказал влияние на тканевые формы и предохранил птиц от развития инфекции.

5.3. Изучение гамотропного действия препаратов

В эпидемиологии малярии большое значение имеют препараты, которые благодаря действию на половые формы малярийного паразита снижают заражаемость комаров.

Для изучения гамотропных свойств препаратов применяются следующие методы:

- 1) в опыте *in vitro* определяется способность препарата тормозить эксфлагелляцию (образование микрогамет);
- 2) действие на гамонты устанавливается на основании подсчета количества половых форм до и после введения зараженной птице препарата;
- 3) гамонтоцидное действие определяется по заражаемости комаров, кормленных на птице, получавшей препарат.

5.3.1. Изучение дисфлагеллирующего действия

Процесс эксфлагелляции, который происходит в организме комара, можно наблюдать *in vitro* при исследовании капли крови под микроскопом. Описанная ниже методика

позволяет определять способность препарата тормозить эксфлагелляцию (дисфлагеллирующее действие препарата).

У зараженной птицы (чиж, чечетка, канарейка, цыпленок) исследуют кровь в период наличия паразитов. При этом наряду с бесполовыми формами, как правило, обнаруживается и некоторое количество половых форм. В пастеровской пипетке смешивают каплю крови с каплей лимоннокислого натрия (3,8%) и физиологического раствора. Жидкость, помещенную между покровными стеклами, исследуют во влажной камере под иммерсионной системой микроскопа при температуре не ниже 25 °С.

В крови зараженной птицы, содержащей паразитов, уже через 5–10 мин можно наблюдать микрогаметы в виде подвижных жгутов, прикрепленных к остаточному телу. Жгуты отчетливо видны при несколько затемненном поле зрения. Обычно наблюдаются в поле зрения 2–3 эксфлагеллирующих формы.

Перед введением препарата устанавливают число этих форм у каждой птицы, затем вводят изучаемое вещество и вновь исследуют кровь через 6–24–48 ч. Препарат, обладающий дисфлагеллирующим действием, тормозит процесс эксфлагелляции в течение 1–2-х дней (гамостатическое действие) и эксфлагеллирующие гаметы не удается наблюдать в течение этого срока. Параллельно необходимо проводить контрольные исследования с кровью птиц, не получавших препарат.

5.3.2. Влияние препарата на число гаметоцитов в крови

В крови зараженных птиц обнаруживаются бесполое и половые формы паразита в разных стадиях развития. В исследование подбирают птиц с примерно одинаковым общим количеством паразитов в крови и подсчитывают у них процентное содержание половых форм (мужских и женских) по отношению к эритроцитам. Препарат вводят однократно. Снижение численности гамонтов через 24–48 ч после лечения указывает на активность препарата.

5.3.3. Влияние на заражаемость комаров

Птице в период значительного содержания паразитов в крови вводят однократно определенную дозу исследуемого препарата. Через 12–24 ч птицу подсаживают к комарам, предварительно голодавшим в течение суток. Напившихся комаров (исследуемая группа) отсаживают в отдельный садок и в дальнейшем кормят 4-процентным раствором глюкозы. Контрольную партию комаров кормят на той же птице до введения ей препарата. Для определения зараженности комаров вскрывают на 6–10-е сутки после кормления и определяют наличие цист в желудках и спорозоитов в слюнных железах, отсутствие цист или задержка в слюнных железах спорозоитов. Отсутствие цист или задержка в их развитии у комаров исследуемой группы при нормальном половом созревании паразитов в контрольной группе указывает на активность препарата.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Астафьев Б.А., Яроцкий Л.С., Лебедева М.Н. Экспериментальные модели паразитозов. — М.: Наука, 1989. — С. 278.
2. Кожевников П.В., Добротворская Р.В., Латышев Н.И. Учение о кожном лейшманиозе. — М.: 1947. — С. 370.
3. Бакулина Н.А., Краева Э.Л. Микробиология. — М.: Медицина, 1980. — С. 444.

4. Павлова Е.А. Среда для культивирования простейших кишечника. Мед паразитол. 1938. – VII, в. 2. – С. 224–227.
5. Першин Г.Н. Методы экспериментальной химиотерапии. – М.: Медицина, 1971. – С. 536.
6. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: Ремедиум, 2000. – С. 297–308.
7. Diamond L.S. The establishment of various *Trichomonas* of animals and man in axenic cultures. J. parasitol, 1957. – V. 43.4. – P. 488–490.
8. Diamond L.S. et al. A new medium for the axenic cultivation of *Entamoeba histolytica* and other *Entamoeba*. Trans. R.S. Trop. Med. Hyg., 1978. – V. 72. – P. 431–432.
9. Keister D.B. Axenic cultivation of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. Trans R. S. Trop. Med. Hyg., 1983. – V. 7. – P. 487–488.
10. Levine N.D. et al. A new revised classification of the Protozoa. G Protozoa., 1980. – V. 27. – P. 37–58.
11. Clark C.G. & Diamond L.S. Methods for Cultivation of Luminal Parasitic Protists of Clinical Importance. Clinical Microb. Rev., 2002. – V. 15, № 3. – P. 329–341.

ГЛАВА 37

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ АНТИГЕЛЬМИНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. Б.А. Астафьев; д. м. н., проф. М.Н. Лебедева;
д. м. н., проф. Ф.П. Коваленко; к. м. н. Г.А. Гицу; к. б. н. В.И. Джабарова;
к. б. н. Л.В. Федянина; акад. РАМН, проф. В.П. Сергиев;
к. м. н. А.А. Фролова; Е.И. Самочатова*

Введение

Поиск новых антигельминтиков и доклиническая разработка новых методов химиотерапии гельминтозов ведутся, как правило, на лабораторных моделях животных, экспериментально зараженных гельминтозами, имеющими медицинское или ветеринарное значение или близких к ним по систематическому положению возбудителей и особенностям течения. Наличие адекватных моделей гельминтозов позволяет решить ряд важных теоретических и практических вопросов и открывает перспективы выявления новых химиотерапевтических средств, а в ряде случаев — и разработки наиболее эффективных схем их назначения. Основной целью скрининга является выявление новых активных соединений, превосходящих по своей эффективности, широте применения и токсикологическим показателям уже применяемые на практике или же позволяющие снизить затраты на их производство.

Новые противопаразитарные препараты должны удовлетворять всем требованиям медицинской или ветеринарной практики, а именно:

1. Низкая токсичность с отсутствием побочного действия на организм хозяина.
2. Высокая эффективность специфического действия.
3. Активность в отношении разных стадий развития гельминта.
4. Простота синтеза, доступность исходного сырья, химическая устойчивость препарата.
5. Дешевизна и удобство для массового применения.

Вещества, предлагаемые для практического применения, должны превосходить уже апробированные на практике главным образом в эффективности и переносимости.

Для успешного решения проблем химиотерапии и профилактики гельминтозов желательны иметь препараты с лечебным и профилактическим (овицидным и/или ларвицидным действием).

Настоящие методические рекомендации разработаны с целью унификации методов моделирования гельминтозов и экспериментального доклинического изучения новых антигельминтных препаратов, обеспечивающих получение сопоставимых данных и объективных выводов.

1. Общая часть

1.1. Обследование лабораторных животных на зараженность гельминтозами

При экспериментальных исследованиях необходимо предварительное обследование животных на зараженность гельминтозами, а также в ходе эксперимента. С целью диа-

гностики кишечных гельминтозов применяют исследование фекалий методами: нативного мазка, толстого мазка по Като, флотации и осаждения.

Для исследования по методу Като 100 мг фекалий без добавления воды или какой-либо другой жидкости наносят на предметное стекло, покрывают специально обработанной полоской целлофана и придавливают на предметном стекле резиновой пробкой ровным слоем, но так, чтобы фекалии не выдавливались из-под целлофана. Из гидрофильного целлофана толщиной 22 мкм готовят полоски площадью 8,2 см² и обрабатывают их путем погружения в раствор следующего состава: 6 мл 3% водного раствора маляхитовой зелени, 500 мл глицерина, 500 мл 6% раствора фенола. Микроскопию мазка проводят через 30–40 мин после его приготовления.

При небольшом количестве яиц или личинок гельминтов в фекалиях прибегают к методам обогащения. Для исследования яиц большинства видов гельминтов применяют метод флотации по Фюллеборну. Флотационный раствор готовят следующим образом: 444 г соли растворяют в 1 л воды, доводят до кипения, остужают и фильтруют через вату или марлю в отдельный сосуд. Фекалии тщательно размешивают в насыщенном растворе поваренной соли в стаканчике объемом 10–20 мл и с помощью проволочной петли удаляют всплывшие частицы клетчатки. Затем на стаканчик накладывают обезжиренное предметное стекло, доливают насыщенный раствор соли доверху, так, чтобы мениск жидкости соприкасался с поверхностью предметного стекла. Через 25–30 мин стекло быстрым движением снимают, переворачивают нижней поверхностью вверх и микроскопируют. Этот метод пригоден для диагностики всех гельминтозов пищеварительного тракта, кроме трематодозов, так как удельный вес яиц трематод превышает таковой флотационной жидкости, вследствие чего они выпадают в осадок.

Для исследования фекалий на наличие личинок гельминтов или для обнаружения их в легких, крови, печени и других органах и тканях применяют метод Бермана: фекалии или измельченные органы наносят на мелкую металлическую сетку и помещают ее в стеклянную воронку, закрепленную на штативе. На нижний конец воронки надевают резиновую трубку с зажимом. В воронку наливают подогретую до 40°С воду, так, чтобы нижняя часть сетки с фекалиями или частицами органов была погружена в воду. Личинки выходят из исследуемого объекта и скапливаются в нижней части резиновой трубки. Через 2–4 ч (при выделении личинок из фекалий) или через сутки (при выделении личинок из тканей) открывают зажим и спускают жидкость в пробирку. Личинки постепенно оседают на дно пробирки. Процесс можно ускорить центрифугированием. Осадок микроскопируют.

При некоторых цестодозах выделяются целые зрелые членики гельминтов. Для их обнаружения фекалии промывают на мелком сите. Можно применять также отстаивание осадка со сливанием поверхностного слоя жидкости. После неоднократного повторения этой процедуры просматривают осадок на темном фоне, на котором хорошо заметны членики цестод, во всех случаях имеющие белый цвет.

1.2. Метод выделения яиц гельминтов из фекалий инвазированных животных

Яйца гельминтов для заражения новой партии животных можно получить двумя способами:

1. При вскрытии ранее зараженных животных выделяют и измельчают паразитов. При этом среди яиц, выделившихся из матки гельминтов, оказывается большое количество незрелых яиц.

2. Яйца выделяют из фекалий животных. Для этого отбирают необходимое количество доноров. Животных помещают в клетки с сетчатым дном. Фекалии ежедневно выбирают с поддонника клетки, на который предварительно помещают увлажненную фильтровальную бумагу. Фекалии можно накапливать в течение нескольких дней, сохраняя их при температуре 4°С. Выделение яиц из фекалий осуществляют флотационно-

центрифужным методом. Фекалии тщательно размешивают в насыщенном растворе поваренной соли и разливают по центрифужным пробиркам. Смесь центрифугируют 5–7 мин при 1500 оборотах в минуту. Поверхностную пленку со всплывшими яйцами снимают проволочной петлей, состоящей из нескольких колец, и стряхивают в стаканчик с соевым раствором. После этого содержимое пробирок опять размешивают с соевым раствором и вновь центрифугируют. Эту манипуляцию повторяют несколько раз. Собранные яйца отмывают водой 7–8 раз с последующим центрифугированием, после чего собирают со дна пробирки с помощью шприца с иглой.

1.3. Методы культивирования яиц и личинок гельминтов

Для развития яиц большинства гельминтов (аскариды, трихоцефалы, гангулетераксы и др.) до инвазионной стадии их помещают на часовое стекло в 1% раствор соляной кислоты. Раствор заменяют через каждые 2–3 дня. Часовые стекла хранят в чашках Петри в термостате при температуре 25–30°C. На дно чашек под часовое стекло помещается увлажненная фильтровальная бумага. Чашку накрывают крышечкой, которую каждые 2–3 суток рекомендуется открывать на 20–30 мин. В ходе культивирования необходимо следить за количеством раствора на часовом стекле. По мере его испарения добавляют 1% HCl до прежнего уровня.

Культивирование до инвазионной стадии свободноживущих личинок нематод (трихостронгилят, стронгилоидесов и др.) также проводят в чашках Петри в смеси фекалий с почвой или активированным углем. Можно применять для этой цели агар (1,5 г агара на 100 мл воды). Агар разливают в большие чашки Петри и оставляют до застывания. На середину пластинки агара наносят слой смеси из фекалий и активированного угля высотой 0,5 см. При этом слой агара по краям, по крайней мере на 3 см, должен оставаться свободным. Вылупившиеся из яиц личинки выползают на агар и проникают в него, скапливаясь на краю.

При культивировании личинок стронгилят, в том числе ниппостронгилюса, наилучшие результаты получаются при использовании следующего способа. Фекалии, содержащие достаточное количество яиц (2–7 или более в поле зрения при 70-кратном увеличении) в тонком мазке, увлажняют 0,1% раствором салициламида в дехлорированной водопроводной воде и смешивают в равных пропорциях с активированным углем. Салициламид предотвращает развитие плесени. Эту массу слоем толщиной не более 0,5 см наносят на круг фильтровальной бумаги, на 1 см отступив от края. Фильтровальную бумагу со слоем фекалий помещают в чашку Петри на круг из губки, слегка смоченной водой (вместо губки можно использовать и другой влагоемкий материал). Чашки Петри закрывают крышечками и помещают в термостат при температуре 25–30 °C. Инвазионные личинки скапливаются по краю фильтровальной бумаги, где их видно невооруженным глазом. При появлении в копрокультуре плесени следует оросить ее 1% раствором нистатина. По достижении личинками инвазионной стадии края фильтровальной бумаги отрезают и помещают их для сбора личинок в аппарат Бермана.

1.4. Методы заражения лабораторных животных гельминтами и введения испытуемых препаратов

Инвазионный материал, необходимый для заражения лабораторных животных, получают различными путями в зависимости от биологических особенностей тех или иных видов гельминтов. Личинок биогельминтов, находящихся в тканях промежуточных хозяев, скармливают животным вместе с тканями промежуточного хозяина или выделяют из последних и вводят в очищенном виде. Личинок стронгилят, в частности ниппостронгилюса, вводят иглой шприца под кожу.

Взвесь инвазионных яиц гельминтов вводят животным в пищевод или желудок с помощью шприца с канюлей.

Для дозирования инвазионного материала тщательно встряхивают водную взвесь инвазионных яиц или личинок гельминтов. Из только что перемешанной взвеси с помощью

шприца с иглой берут несколько капель взвеси и в 3 каплях, нанесенных на предметное стекло, подсчитывают количество яиц или личинок. Определив среднее число яиц или личинок в 1 капле, умножают на число капель в 1 мл взвеси. После этого рассчитывают количество взвеси, содержащее необходимое число инвазионного материала. При подсчете учитывают только жизнеспособные яйца или личинки.

При отборе и дальнейшем изучении препаратов способы их введения зависят от вида животного и характера инвазии. Обычно препараты вводят в желудок или пищевод, иногда — внутримышечно, подкожно или внутривенно.

Мышам, крысам, морским свинкам и другим мелким грызунам препараты вводят в пищевод или желудок при помощи шприца с металлической оливой на конце иглы или пипеткой с оплавленным концом. Мышам можно вводить не более 0,3–0,5 мл, крысам и морским свинкам не более 1–2 мл жидкости на животное. Хорошо растворимые вещества мелким животным вводят в виде водных растворов, а нерастворимые — в виде суспензии в жидком крахмальном геле.

При эхинококкозах исследование препаратов проводят и при внутрибрюшинном введении.

Для оценки эффективности препаратов используют сравнение доз, вызывающих одинаковый эффект, или определяют эффект одинаковых доз препаратов. Масса испытуемого вещества чаще выражается в весовых соотношениях: г/кг или мг/кг массы тела животных. В отдельных случаях, особенно при сравнении активности препаратов определенного ряда, представляет интерес сравнить их в эквимольных дозах в пересчете на основание.

1.5. Методы учета антигельминтной эффективности лекарственных средств

Методы исследования препаратов и учета их эффективности различаются в зависимости от вида животных, на которых проводят исследования, и гельминтов, которыми они заражены. При первичном исследовании препаратов на крупных животных препараты вводят в различных дозах, используя для каждой дозы 2–3 животных.

Предварительно определяют токсичность препарата, для чего его вводят в возрастающих дозах белым мышам или животным других видов. Определяют каждую ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄ по Литчфилду–Уилкоксона для белых мышей, крыс. На каждую дозу берут по 7–10 животных.

При использовании крупных животных применяют два метода учета эффективности дегельминтизации. Первый метод заключается в подсчете яиц, выделяющихся в определенных порциях фекалий до исследования препарата и через различные сроки после него. В дальнейшем вычисляют процент снижения выделения яиц. Одновременно ведут сбор фекалий, их промывку и подсчет отошедших паразитов. В ряде случаев, особенно при небольших размерах гельминтов, проследить за их элиминацией (отхождением) не представляется возможным, особенно в связи с их деформацией или перевариванием в кишечнике хозяина. Перевариванию могут способствовать и некоторые препараты (фенасал и др.). В таких случаях эффективность терапии учитывают посредством подсчета яиц в фекалиях. При некоторых цестодозах (тенидозы, дифиллоботриозы) учитывают отошедшие сколексы. В отдельных случаях можно вести контроль за эффективностью действия препаратов по отсутствию выделения яиц или проглоттид через сроки, необходимые для регенерации стробилы.

Для количественного определения яиц, выделяемых с фекалиями леченых и контрольных животных, в мерную стеклянную колбочку наливают децинормальный раствор едкого натрия до отметки «56 мл», затем добавляют испражнения до тех пор, пока уровень жидкости не достигнет 60 мл. После взбалтывания со стеклянными бусами забирают для исследования 0,075 мл (1 каплю) смеси, помещают на предметное стекло, покрывают покровным стеклом и микроскопируют при увеличении 56. Обнаруженное число яиц умножают на 200 и получают количество яиц в 1 мл экскрементов.

Второй метод учета эффективности дегельминтизации заключается в подсчете отошедших гельминтов, а при последующем вскрытии пролеченных животных — также и в подсчете оставшихся паразитов. Это наиболее точный метод. После введения препарата ежедневно собирают отдельно от каждого животного и промывают фекалии, подсчитывают число отошедших гельминтов. Через 7–20 дней животных подвергают эвтаназии и подсчитывают количество паразитов в органах, в которых они локализируются (метод неполных гельминтологических вскрытий по К.И. Скрябину).

Эффективность препарата определяют по двум показателям: учитывают количество или процент животных, полностью освободившихся от гельминтов, — экстенсивность (ЭЭ) и число или процент отошедших паразитов — интенсивность (ИЭ). При определении эффективности препаратов ЭЭ часто не учитывают, так как для получения достоверных величин требуется значительное число животных. В связи с трудностью или невозможностью подсчета отошедших паразитов для вычисления ИЭ сравнивают среднее число гельминтов у вскрытых животных в леченой и контрольной группах и определяют ИЭ (в %) по формуле:

$$ИЭ = \frac{K - O}{K} \times 100,$$

где K — среднее число гельминтов в контрольной группе, O — среднее число гельминтов в леченой группе.

Для леченой и контрольной групп следует использовать животных одного вида и возраста, содержащихся в одинаковых условиях. Следует иметь в виду, что на заражаемость животных гельминтозами и эффективность дегельминтизации может влиять сезон года. Время суток также может оказывать существенное влияние на эффективность химиотерапии.

При отборе (скрининге) химических соединений или растительных препаратов, обладающих антигельминтными свойствами, большая часть испытуемых соединений оказывается неэффективной. В связи с этим при первичном скрининге рекомендуется вводить препараты в максимально переносимой дозе. При ИЭ ниже 50% препарат характеризуют как слабоэффективный. Если эффективность препарата выше 50%, а особенно 80–100%, его рекомендуется испытать повторно из-за возможной нестабильности результатов экспериментальной химиотерапии. Окончательную эффективность устанавливают при проверке нескольких серий препарата, каждой — не менее чем на трех различных партиях животных. Определяют среднюю эффективную дозу ($ЭД_{50}$), а также $ЭД_{16}$, $ЭД_{84}$. Достоверность результатов вычисляют методами биологической статистики.

Для получения более достоверных данных в леченые и контрольную группы следует включать не менее 7–10 животных. С целью экономии лабораторных животных отобранные для дальнейших исследований препараты следует испытывать на партиях по 100–150 животных, имея для них одну контрольную группу. Часто у животных, получивших неэффективный препарат, интенсивность инвазии бывает выше, чем у контрольных животных, что обусловлено его токсическим действием с последующим ослаблением иммунобиологических реакций организма хозяина.

Широко применяемым в химиотерапии тестом определения качества препаратов является их химиотерапевтический индекс (ХТИ), который определяют путем сопоставления минимально эффективной и максимально переносимой доз или средней эффективной и средней смертельной доз. Однако препараты, обладающие антигельминтными свойствами и незначительной острой токсичностью, при повторных введениях в небольших дозах могут вызвать тяжелые побочные явления и хронические поражения органов и систем. В связи с этим правильнее определять ХТИ путем сравнения минимально эффективных доз и доз, не вызывающих хронических изменений в организме хозяина. Рекомендуется определять химиотерапевтические индексы, характеризующие степень безопасности препарата, относительно каждого конкретного повреждающего эффекта.

Такие индексы называют органомишеневыми терапевтическими индексами (ОМТИ). ОМТИ вычисляется через отношение минимальной дозы, повреждающей тот или иной орган (систему) экспериментального животного к предполагаемой лечебной дозе этого препарата для человека.

Существенным недостатком проводимых фармакологических и токсикологических исследований антигельминтиков является то, что они выполняются только на здоровых животных. Однако известно, что чувствительность к химическим препаратам как организма хозяина, так и обитающих в нем гельминтов может существенно изменяться при развитии патологических процессов.

2. Специальная часть

2.1. Нематодозы

2.1.1. Энтеробиоз

Энтеробиоз — гельминтоз из группы нематодозов, вызываемый острицей *Enterobius vermicularis*, паразитирующей в кишечнике только человека, особенно часто у детей, и проявляющийся нарушениями преимущественно органов пищеварения, нервной системы, развитием иммунодефицитных состояний. Характерен зуд в перианальной области.

В качестве моделей для изучения терапии энтеробиоза наиболее целесообразно использовать белых мышей, у которых встречаются два вида оксиурид: *Aspiculus tetraptera* и *Syphacia obvelata*. Нередко в качестве лабораторной модели используют также мышей или крыс, экспериментально зараженных *Gangyleterakis spumosa*. Значительно более дорогой является модель *Passaluns ambiguus* на кроликах.

При температуре 37 °С в водопроводной воде яйца *A. tetraptera* и *S. obvelata* развиваются до инвазионной стадии в течение соответственно 23–24 и 20–22 ч, но в изотоническом растворе натрия хлорида при той же температуре сроки их развития удлиняются до 45–48 и 35–40 ч соответственно. Эти условия содержания яиц не отражаются на их жизнеспособности.

В матке самок *A. tetraptera* зрелые яйца появляются на 10–12 день инвазии. Для оксиурид характерны 4 линьки. Две из них осуществляются в яйце. Третью и четвертую линьку личинка совершает в организме хозяина. Личинки *A. tetraptera* третью линьку проходят на 3–4 день инвазии, а четвертую — на 6–7 день. У личинок *S. obvelata* третья линька происходит на 2–3, четвертая — на 4–5 сутки после заражения.

При экспериментальном заражении мышей аспикулорозом или сифациозом им вводят *per os* по 100 инвазионных яиц. При изучении активности против личинок оксиурид химиопрепараты следует вводить на 4–5 день после заражения аспикулорозом и на 3–4 день — сифациозом. Для исследования химиотерапевтической активности препаратов на половозрелой стадии их вводят на 10–11 день при использовании модели аспикулороза и на 8–9 день при сифациозе. Учет результатов химиотерапии проводят через 3–4 суток после окончания курса лечения одновременно в леченых и контрольной группах.

Гангулетеракидозом крыс хорошо заражаются белые мыши. Это значительно облегчает и удешевляет работу. От инвазированных мышей собирают яйца паразитов. Яйца культивируют при 27 °С в течение 14 дней. К этому времени в них формируется подвижная личинка. Мышам вводят по 100 инвазионных яиц *G. spumosa*, в результате чего у животных развивается по 40–95 нематод. Выделение яиц начинается через 25–38 дней после заражения. Инвазия стойко сохраняется не менее 5 мес. Паразиты развиваются примерно у 90% животных. Для экспериментальной терапии предварительно обследуют мышей и отбирают выделяющих яйца гангулетеракиса. Исследование препаратов начинают с 40 дня после заражения мышей. Препараты вводят в течение 1–3 дней. Для предварительного отбора достаточно использовать по 8–10 животных на каждый препарат. Учет эффективности через 3–4 суток одновременно в леченых и контрольной группах.

Яйца пассалуруса (*P. ambiguus*) становятся инвазионными при температуре 35–36 °С через 7–8 сут. В кишечнике кроликов паразит достигает половозрелой стадии на 17–24 сутки. Однако препатентный период (до момента выползания самок из ануса) длится 56–67 сут. Для изучения антигельминтного действия препаратов на личиночные стадии пассалуруса химиотерапию следует проводить на 10–14 сутки, на половозрелую — на 25–27 сутки.

2.1.2. Аскаридоз

Аскаридоз — один из наиболее распространенных в мире гельминтозов человека с выраженной аллергической симптоматикой в острой (миграционной) стадии заболевания (при первичном заражении и особенно в случаях суперинвазии) с преобладанием явлений со стороны органов дыхания, кроветворения, а в стадии паразитирования гельминтов в тонкой кишке — со стороны органов пищеварения, нервной и других систем. Возбудитель — аскарида (*Ascaris lumbricoides* Linnaeus, 1758) — строго специфичный паразит человека. У животных *A. lumbricoides* может паразитировать только как транзитный паразит, т.е. на личиночной (миграционной) стадии, никогда не достигая следующей кишечной стадии. Воспроизводство на лабораторных моделях личиночной стадии аскариды может представлять большой интерес для исследователей и быть весьма информативным. В связи со значительными трудностями получения инвазионного материала экспериментаторы часто предпочитают использовать близкий вид — *Ascaris suum*, паразитирующий у свиньи.

Аскарид свиньи обычно получают с мясокомбината. В лабораторных условиях (обязательно только в вытяжном шкафу, так как возможны аллергические реакции на испарения аскарид, вплоть до анафилактического шока) вскрывают самок аскарид. Отсекают периферический отдел матки с двумя ее рогами, каждый размером до 1,5–2 см, выдавливают из матки яйца гельминта на часовое стекло диаметром 8,0 см. В него наливают 1% раствор соляной кислоты (для профилактики развития посторонней микрофлоры, особенно грибковой) так, чтобы культура яиц слегка была им прикрыта, и помещают во влажную камеру в чашку Петри. Чашку помещают в термостат при температуре 30 °С не менее чем на 18 дней. С целью аэрации культуры яиц крышку чашки Петри необходимо ежедневно приоткрывать, а содержимое часового стекла перемешивать вращением вокруг вертикальной оси или покачиванием. Через этот срок яйца достигают инвазионной стадии. С целью контроля за инвазионностью яиц через 8 сут после экспериментального заражения убивают 3 белых мышей. Их легкие мелко иссекают ножницами и с помощью метода Бермана (см. раздел 1.1.) определяют наличие мигрировавших в легкие личинок аскарид.

Для экспериментального заражения обычно используют белых мышей, реже крыс или морских свинок. Личинки мигрируют в тканях печени, а затем легких в течение 10–16 дней. В связи с этим при исследовании антигельминтного действия препаратов на личиночной стадии *A. lumbricoides* или *A. suum* завершить исследование рекомендуется в течение первых 9 дней после заражения. Для этого животных лечат на 6–7 сутки инвазии, вскрывают — на 9 сутки.

Моделями кишечной стадии аскаридоза могут служить кошки, зараженные *Toxosaga mystax*, или собаки, зараженные *T. canis*; используют спонтанно зараженных животных, которых отбирают при копрологическом обследовании. Обычно лучше заражены молодые животные. Результаты исследования препаратов учитываются путем сбора отшедших нематод, по динамике выделения яиц или посредством подсчета обнаруженных при вскрытии животных живых паразитов.

2.1.3. Токсокарозы — ларвальные нематодозы человека

У человека нередко возникают заболевания, которые относят к группе болезней, вызываемых мигрирующими личинками гельминтов животных — *larva migrans*. В условиях

умеренного климата наиболее часто возбудителями этих болезней являются нематоды собак и кошек — *Toxocara canis* и *Toxocara mystax*. Эти заболевания по своему течению весьма напоминают миграционную фазу аскаридоза с поражением тех же органов и систем: легких, печени, кроветворных и других органов, а также, в отличие от аскаридоза, головного мозга человека.

Половозрелые токсокары локализуются в тонкой кишке собак и кошек, с фекалиями которых во внешнюю среду выделяются яйца гельминтов. После созревания во внешней среде они становятся инвазионными в том числе и для человека.

Яйца токсокар собирают от инвазированных животных. При температуре 25–30 °С (в условиях термостата) и достаточной влажности они становятся инвазионными в течение не менее 14 дней. Животных (обычно лабораторных мышей) заражают по 50–100 яиц с помощью шприца с канюлей, которую вводят в пищевод. Исследование препаратов проводят в первые 5 дней после заражения. Учет результатов лечения производят через 2–3 сут после окончания лечения. Для этого подсчитывают количество личинок токсокар в головном мозге и легких леченых животных. Указанные органы мелко иссекают ножницами и исследуют по методу Бермана (см. 1.1).

2.1.4. Трихоцефалез

Трихоцефалез — один из наиболее распространенных в мире кишечных гельминтозов человека. Возбудитель — власоглав *Trichocephalus trichiurus* (Linnaeus, 1771; Blanchard, 1895) — строго специфичный гельминт человека, паразитирующий преимущественно в слепой кишке. Заболевание характеризуется хроническим течением с преобладающим поражением пищеварительного тракта и нервной системы.

Представители рода *Trichocephalus* Schrank, 1788 встречаются у ряда животных, но наиболее доступной и удобной лабораторной моделью являются белые мыши, зараженные *T. muris* Schrank, 1788. Первоначально модель воспроизводится при сборе нематод от домовых мышей, которые наиболее интенсивно заражены в районах с теплым и влажным климатом, в частности на Кавказе. Яйца трихоцефалюсов от лабораторных мышей получают флотационно-центрифужным методом или из самок нематод, извлеченных из слепой кишки инвазированных животных. Для развития яиц гельминта до инвазионной стадии их помещают в термостат при температуре 30 °С. Методика описана в разделе 1.3. К 16–20 дню подвижными становятся большинство личинок, однако инвазионной стадии они достигают лишь через 5–10 дней после этого. К этому моменту на головном конце становится заметным втянутый маленький хитиновый стилет, играющий важную роль в пенетрации слизистой оболочки кишки хозяина.

Паразит начинает откладывать яйца на 36–40 день инвазии. Период выделения яиц длится в среднем 45 дней (31–56), а продолжительность жизни мышиноного власоглава составляет в среднем 88,3 дня (от 76 до 100). При инвазионной дозе 50 яиц развивается от 8 до 45 особей власоглава, при дозе 100 яиц наблюдается значительный падеж мышей к моменту достижения гельминтом половозрелой стадии.

Оптимальными являются лабораторные модели с использованием мышей самцов линии DBA/2 или AKR/y, что обусловлено их высокой восприимчивостью к этой инвазии и незначительным разбросом в группах по ее интенсивности. Это позволяет получать более точные результаты исследований.

При массовом отборе препаратов целесообразно каждый из них вводить 8–10 животным. Для экспериментальной терапии используют мышей с момента выделения яиц и в течение последующих 10 дней. Препараты вводят в течение 2–4 дней подряд. Вскрытие животных леченых и контрольной групп производят через 5–7 дней после окончания курса лечения.

При оценке результатов исследований следует учитывать, что трихоцефалюсы у мышей значительно более устойчивы к антигельминтикам, чем паразитирующий у человека *T. trichiurus*.

2.1.5. Анкилостомидозы и трихостронгилоидозы

К анкилостомидозам человека относятся анкилостомоз и некатороз, возбудителями которых являются *Ancylostoma duodenale* и *Necator americanus*. Анкилостомозы и некаторозы характеризуются хроническим течением, прогрессирующей слабостью, головокружением, слабостью, железодефицитной анемией, отеками. Половозрелые гельминты локализуются в двенадцатиперстной кишке и в верхнем отделе тонкой кишки.

Трихостронгилоидозы — зоонозы. Заболевание человека вызывают 13 видов трихостронгилид, среди которых наибольшее значение имеет *Trichostrongylus colubriformis*. Трихостронгилоидозы характеризуются хроническим течением с преобладающим поражением пищеварительного тракта, признаками аллергического поражения кровеносных органов печени, кишечника и др. Трихостронгилиды у человека паразитируют в тонкой кишке, преимущественно в двенадцатиперстной, проникая головным концом в поверхностные слои слизистой оболочки.

Лабораторной моделью анкилостомидозов человека являются собаки и кошки, зараженные *Ancylostoma caninum* и *Uncinaria stenocephala*. Эти модели практически неприемлемы для скрининга антигельминтиков. К тому же кошки недостаточно восприимчивы к заражению *U.stenocephala*. В связи с этим в экспериментальных лабораториях широко применяются модели ниппостронгилеза на разных видах лабораторных животных. Возбудителем ниппостронгилеза является *Nippostrongylus brasiliensis*.

Инвазия *N.brasiliensis* происходит посредством проникновения инвазионной личинки через рот или кожу. Независимо от способа заражения личинка попадает в малый круг кровообращения, затем в легкие (через 14–20 ч). Через 35–40 ч после проникновения паразита в организм хозяина личинка проходит третью линьку и переходит в четвертую стадию. Она длится 12–15 ч. Через 50–60 ч после заражения личинка мигрирует из легких в пищеварительный тракт, где через 90–108 ч после заражения гельминт претерпевает четвертую линьку. На половозрелой стадии он локализуется в тонкой кишке.

Для поддержания лабораторного штамма возбудителя ниппостронгилеза используют крысят массой 40–50 г, которым подкожно вводят по 500 или 1000 инвазионных личинок в 0,25–0,5 мл 0,7 раствора натрия хлорида. Заражение производят без антибиотиков, так как они снижают интенсивность инвазии. На 6–7 день после заражения крысята начинают выделять яйца ниппостронгилуса. Их количество быстро возрастает к 10 дню, а с 14–15 дня после заражения начинается постепенное уменьшение выделения яиц. Период яйцепродукции длится 67–91 день.

Метод культивирования яиц и личинок ниппостронгилуса описан в разделе 1.3. Собранные личинки могут сохранять инвазивность (заражающую способность) в течение 10–15 дней при температуре 18–20 °С в тонком слое (2–3 мм) 0,7 раствора натрия хлорида. Повышение температуры значительно сокращает срок их жизни. Для постоянного поддержания штамма *N. brasiliensis* и получения достаточного количества инвазионных личинок каждые 10 дней заражают по 10–12 крысят и получают от них до 90 000 яиц в сутки. Для экспериментальной терапии можно использовать белых мышей.

Крысы значительно лучше заражаются ниппостронгилезом, чем мыши. Препатентный период гельминта у крыс длится 4–8 сут, у мышей — 6–9 сут. С увеличением возраста животных длительность его возрастает.

Плохо заражаются ниппостронгилезом золотистый хомяк, хлопковая крыса; не заражается морская свинка.

Белым мышам массой 10–12 г подкожно вводят по 500 инвазионных личинок *N. brasiliensis*. число приживающихся нематод может колебаться от 1 до 480 экземпляров (чаще 50–100). Выделение яиц у них длится с 6 по 54 день после заражения. Максимальное число яиц выделяется с 10 по 18 день, в среднем по 3000–9000 на 1 г фекалий.

При экспериментальной химиотерапии препараты вводят обычно однократно, при первичном отборе не менее чем 8–10 животным на каждый препарат. Учет эффективности лечения проводят через 2 сут путем сравнения числа нематод в леченой и контрольной группах.

У мышей и крысят подсчет половозрелых ниппостронгилюсов можно производить в компрессории под бинокулярной лупой.

2.1.6. Трихинеллез

Трихинеллез — остро протекающая болезнь человека и млекопитающих с ярко выраженными аллергическими проявлениями, вызываемая нематодой *Trichinella spiralis*. Вид включает три варианта: *T. spiralis var. spiralis*, *T. spiralis var. nativa*, *T. spiralis var. Nelsoni*. В 1972 г. от енота-полоскуна *Procyon lotor* на Северном Кавказе выделен новый вид *T. pseudospiralis*. Трихинеллы паразитируют на одном и том же хозяине в виде половозрелой кишечной и личиночной мышечной стадии.

В качестве экспериментальной модели трихинеллеза используют в основном мышей, крыс, значительно реже морских свинок. Лабораторных животных заражают путем скармливания кусочков трихинеллезного мяса, в котором предварительно с помощью компрессионного метода подсчитывают количество личинок трихинелл. Животных можно заражать *per os* личинками, выделенными из мышц путем переваривания мясного фарша (80 г на 1 л перевариваемой жидкости) в растворе, содержащем 0,5–1,0% пепсина, 0,7% соляной кислоты и 0,9% поваренной соли. Переваривание производят в колбах, которые помещают в термостат при температуре 37–38 °С на 8–18 ч. После этого переваривающуюся жидкость процеживают через мельничный газ и собирают в пробирки. Подсчет личинок производят путем определения их количества в единице объема взвеси.

Для заражения обычно используют белых мышей-самцов в возрасте 1,5 мес. и массой 18–20 г. Для изучения противотрихинеллезной активности препаратов рекомендуется заражать животных по 100–140 личинок на мышшь. При этом используют следующие сроки проведения экспериментальной терапии: 1–2 день инвазии — действие на незрелых кишечных трихинелл; 2–4 день инвазии — на зрелых кишечных трихинелл; 7–13 день инвазии — на мигрирующих личинок; 21–25 день инвазии — на инкапсулированных личинок, локализованных в поперечнополосатых мышцах; 30–35 день инвазии — на инкапсулированных мышечных личинок.

Учет эффективности лечения на ранней стадии инвазии (1–4 сутки) осуществляют или путем подсчета числа кишечных трихинелл в стенке тонкой кишки леченых и контрольных животных на 7–10 день после заражения или путем подсчета числа мышечных трихинелл не ранее чем через 3–4 недели после окончания лечения.

При скрининге противотрихинеллезных препаратов высокоинформативным является метод прижизненной диагностики (МПД) трихинеллеза у экспериментально зараженных лабораторных животных, обеспечивающий диагностику на миграционной, ранней и поздней мышечной фазах инвазии и позволяющий осуществлять контроль за качественными и количественными параметрами инвазии в динамике у каждого зараженного животного (Ф.П. Коваленко и соавт., 2010). Метод основан на микроскопии в тонком слое малых проб из скелетных мышц массой 1–1,5 мг у живых лабораторных животных, зараженных инвазионным материалом в дозах, используемых обычно при моделировании трихинеллеза. МПД осуществляют следующим образом. Исследуемое животное фиксируют; на месте предполагаемого разреза выстригают шерсть и проводят местную анестезию (подкожная инъекция 0,1 мл 1% лидокаина). Скальпелем или глазными ножницами рассекают кожу и наружную фасцию (длина разреза — 3–4 мм) до обнажения скелетной мышцы. Глазным пинцетом захватывают участок мышцы и отрезают от него глазными ножницами 1–10 фрагментов массой 1–1,5 мг каждый. Точность навески контролируют с помощью аналитических торсионных весов типа ВТ. После взятия мышечной пробы кожную и мышечную раны обрабатывают антисептическим раствором (5% спиртовая настойка йода). Каждую мышечную пробу помещают между двумя предметными стеклами и подвергают микроскопии при малом увеличении микроскопа. В процессе микроскопии пробу подвергают мануальной компрессии в три последовательных этапа, характеризующиеся разной интенсивностью и характером компрес-

сии: 1) при слабой и постоянной компрессии, приводящей к умеренному сдавливанию пробы, достигаются выявление и визуализация внутренней структуры всех живых, погибающих и погибших инкапсулированных личинок трихинелл (ЛТ) в пробе; у живых ЛТ выявляется двигательная активность в течение 10–15 мин после взятия пробы; к этому сроку тело ЛТ развернуто; 2) более интенсивная и импульсивная по характеру компрессия приводят к вытеснению всех инкапсулированных ЛТ из их соединительно-тканых капсул (искусственное декапсулирование) вместе с жидким содержимым капсул в краевую зону за пределы мышечной пробы. У живых декапсулированных ЛТ двигательная активность повышается, максимально визуализируется их внутренняя структура; искусственное декапсулирование погибающих и погибших ЛТ не происходит; 3) последующее повышение интенсивности импульсивной компрессии приводит к вытеснению тканевой жидкости из мышечной пробы вместе с новорожденными ЛТ (длиной 80–100 мкм) и другими неинкапсулированными ЛТ разного возраста в краевую зону за пределы мышечных волокон, где визуализируется их количество, размеры, особенности внутренней структуры и двигательная активность; некоторые невытесненные из пробы новорожденные просматриваются внутри мышечных волокон.

Повторные биопсии у одного и того же животного проводят после полного заживления кожной раны (через 4–5 дней после взятия мышечной пробы).

При использовании МПД следует учитывать следующие неизвестные ранее особенности инкапсулированных ЛТ. Так, жизнеспособные инкапсулированные ЛТ в прижизненных биоптатах из скелетных мышц экспериментально зараженных лабораторных животных всегда развернуты и проявляют выраженную двигательную активность внутри капсулы в течение 10–15 мин после взятия пробы. Затем ЛТ постепенно сворачиваются в характерную тугую спираль в течение 52–60 мин после взятия пробы и становятся неподвижными. После искусственного декапсулирования у погибающих и погибших инкапсулированных ЛТ, связанное с потерей жидкого содержимого капсул, служит дополнительным критерием жизнеспособности или гибели ЛТ.

2.2. Цестодозы

У человека в кишечнике паразитирует огромное число видов цестод, у которых слабо выражена видовая чувствительность к антигельминтикам. Поэтому препараты, эффективные при одних цестодозах, обычно также эффективны и при других. В связи с этим отбор новых противостудозных средств удобно проводить на белых мышах, зараженных карликовым цепнем. Практика показала, что выявленные на этой модели антигельминтики и их комбинации высокоэффективны не только при гименолепидозе человека, но также и при тениаринхозе, тениозе, дифиллоботриозах.

2.2.1. Гименолепидоз карликовый

Гименолепидоз — гельминтоз человека, в основном детей, и грызунов (домовой мыши, крыс, суслика европейского, хомяка) с преимущественным поражением пищеварительного тракта и иммунной системы. Возбудитель — карликовый цепень *Hymenolepis nana*. Обитает в тонкой кишке человека или грызунов, где проходит три стадии развития. Личиночную (цистицеркоидную) стадию паразит проходит в ворсинках преимущественно верхней половины тонкой кишки. Эта стадия длится у мышей 4–6 сут. Зрелый цистицеркоид выходит из ворсинки в просвет тонкой кишки, где проходит через стадию юного неполовозрелого паразита (препатентная стадия), обычно на 12–14 сутки достигает половозрелой (имагинальной) стадии и начинает выделять инвазионные яйца. Вследствие отсутствия иммунной защиты грызуны легко заражаются повторно (суперинвазия). Как правило, повторное заражение происходит вследствие копрофагии. Однако возможна также внутрикишечная аутосуперинвазия, то есть без выхода яиц во внешнюю среду. Суперинвазии осуществляются обычно на 13–15 сутки после первичного заражения. При суперинвазии, значительно реже при первичном заражении мышей, часть цистицеркоид-

дов развивается в брыжеечных лимфатических узлах. Длительность жизни карликового цепня первой генерации в организме белой мыши составляет 15–16 сут.

Животных заражают по 100–200 инвазионных яиц *H. nana*, которые вводят с помощью шприца со специальной канюлей непосредственно в пищевод. Для этого на 13–15 день инвазии цестод извлекают из тонкой кишки экспериментально зараженных животных. Растирают их пестиком в ступке или разрушают в небольшом количестве водопроводной воды посредством неоднократного насаживания в шприц с насаженной на него иглой-канюлей. Однако при втором способе происходит стимуляция инвазивной (заражающей) способности онкосфер карликового цепня, что побуждает к срочному использованию их для заражения следующей партии животных. При необходимости длительного сохранения яиц карликового цепня высвобождение яиц из матки члеников цестод лучше отложить до дня следующего заражения.

Цестоды *H.nana* рекомендуется хранить в водопроводной воде при температуре 4 °С. Каждые 5–7 сут воду в стакане, где хранятся цестоды, рекомендуется менять. Максимальный срок сохранения инвазивности онкосфер в этих условиях составляет около 30 сут.

Гименолепидозом хорошо заражаются аутобредные белые мыши, однако интенсивность их инвазии при совершенно одинаковых условиях заражения и содержания может резко колебаться, что несколько осложняет оценку результатов экспериментов, в том числе по скринингу противоцестодных средств. Моделирование гименолепидоза на инбредных мышах позволяет получить более четкие результаты на меньшем количестве животных, но имеет свои особенности. Наиболее высокой восприимчивостью к первичному заражению яйцами *H. nana* обладают гибридные мыши F1CBA/Lac C57B1/6) и мыши линии BALB/c, а наименьшей – C57B1/6 и CC57W. Наиболее благоприятные условия для развития суперинвазии имеют место у мышей линий A/He и CBA/Lac, а наименее – линии C57B1/6 и DBA/2.

Необходимо остановиться еще на одной детали, имеющей практическое значение, – на способе подсчета числа цистицеркоидов в ворсинках тонкой кишки. Для этого через 96 ч после заражения животных убивают. Полностью извлеченную тонкую кишку помещают в чашку Петри с таким объемом водопроводной воды, чтобы покрыть всю кишку, и помещают в холодильник на 48 ч (при 4 °С). Затем кишку вскрывают продольным разрезом ножницами, тщательно прополаскивают в ванночке с водопроводной водой и помещают для просветления на 24 ч в 50% раствор глицерина (при 4 °С). После этого можно подсчитывать число цистицеркоидов под микроскопом при увеличении 7×8. Кишка, обработанная по этому способу, может сохраняться при описанных выше условиях в течение 10 сут и более без существенного влияния на результаты подсчета цистицеркоидов.

Все препараты, оказавшиеся эффективными при экспериментальном гименолепидозе, эффективны также и при других кишечных цестодозах человека и экспериментальных животных.

2.2.2. Цистицеркоз

Цистицеркоз у человека развивается или как осложнение тениоза (возбудитель – свиной цепень, *Taenia solium* (Linnaeus, 1758)), или вследствие попадания в пищеварительный тракт с пищей или через грязные руки онкосфер свиного цепня. Чаще всего поражает головной мозг.

Изучение терапии цистицеркоза можно проводить на свиньях и собаках, зараженных *Cysticercus cellulosae*. Заражение происходит при скармливании зрелых члеников, полученных от больного тениозом человека. Намного более доступными и безопасными для экспериментаторов моделями являются мыши и крысы, зараженные яйцами цестоды кошек – *Hydatigera taeniaeformis*.

Яйцами *H. taeniaeformis* хорошо заражаются белые мыши и крысы в возрасте до 1 месяца (3,5–4 недельного возраста), у которых в печени развивается цистицерк или стробилоцерк – *Strobilocercus fasciolans*. Животных заражают по 25–50 яиц *H. taeniaeformis*.

К 4 дню инвазии стробилоцерки в печени грызунов представляют округлое скопление делящихся паренхиматозных клеток, лежащих между печеночными балками. Через 7 дней формируются пузырьки стробилоцерков около 0,3–0,5 мм в диаметре. На 31 день инвазии внутри пузырей локализуются сформированные головки, которые начинают выворачиваться наружу. Через 50 дней инвазии цисты достигают размера 8–10 мм в диаметре; капсулы выпячиваются за пределы печени; полностью сформированные стробилоцерки с вывернутыми головками связаны с пузырями короткими тонкими шейками. Сколекс вооружен крупными присосками и хоботком с крючьями такой же формы и размера, как у взрослых цестод. Пузыри сохраняют жизнеспособность более 4 мес. Однако при интенсивных инвазиях гибель стробилоцерков наступает в более ранние сроки, начиная примерно с 30–50 дня.

При изучении действия препаратов на указанные виды личинок цестод учитывают число погибших личинок, определяемых по внешнему виду. При обнаружении эффективного препарата личинок исследуют микроморфологическими методами.

2.2.3. Эхинококкозы

К эхинококкозам относят эхинококкоз однокамерный или гидатидозный, вызываемый однокамерным эхинококком *Echinococcus granulosus*, и эхинококкоз многокамерный или альвеолярный (альвеококкоз), вызываемый *E. multiloculans*. Это наиболее тяжело протекающие гельминтозы человека, и вместе с тем широко распространенные среди сельскохозяйственных и диких животных. Методы экспериментальной терапии эхинококкозов сходны.

Первичное заражение лабораторных животных яйцами эхинококков, если оно необходимо, требует большой осторожности и специальных условий. Эксперименты ведут на животных, зараженных вторичным эхинококкозом, который воспроизводится путем внутрибрюшинного введения зародышевых сколексов (протосколексов) и ацефалоцист.

Зрелые протосколексы представляют собой яйцевидные тела с ввернутым внутрь сколексом, вооруженным крючьями. По краям тела протосколекса располагаются многочисленные известковые тела. Протосколексы имеют длину 0,14–0,18 мм и ширину 0,09–0,12 мм. Они обладают выраженной подвижностью. Ацефалоцисты мелкие, не содержащие протосколексов ларвоцисты альвеококка диаметром от 0,1 до 1,0 мм.

Первоначально протосколексы гидатидозного эхинококка можно получить при операции по поводу этого заболевания, а также от овец при их забое. Эхинококком от свиней мыши не заражаются. В дальнейшем эхинококковая модель поддерживается путем пассирования протосколексов и/или ацефалоцист. Для заражения лабораторных животных однокамерным эхинококкозом используют жидкость из пузырей и соскоб с герминативной оболочки ларвоцист. При однокамерном эхинококкозе удается проводить ограниченное число пассажей, при альвеококкозе — более 50.

Рекомендуется следующая стандартная методика перезаражения лабораторных животных протосколексами и ацефалоцистами альвеококка. Животное, предназначенное для получения инвазионного материала, усыпляют и после обработки брюшной стенки йодом или спиртом подвергают вскрытию. Извлекают ларвоцисты. Протосколексы и ацефалоцисты выделяют в боксе в стерильных условиях. Очищенные от тканей хозяина ларвоцисты измельчают ножницами или в мясорубке. Полученную массу отжимают через мельничный газ с диаметром ячеек 1,0 мм. Фильтрат помещают в цилиндр до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. В полученный таким образом инокулят добавляют пенициллин и мономицин по 4000 ед/мл каждого. Если животные плохо заражаются эхинококкозом, то к инокуляту добавляют гидрокортизон (25 мг/кг массы тела животного).

Указанную взвесь вводят внутрибрюшинно или подкожно в количестве 0,5–1,0 мл каждому животному. Рекомендуется вводить примерно по 1000 протосколексов и 100–

200 ацефалоцист. Для получения равномерной инвазионной взвеси и точности дозирования лучше использовать электромагнитную мешалку. 100 г зрелых ларвоцист достаточно для заражения 500 животных.

Для поддержания штамма альвеококка лучше всего использовать хлопковых крыс, монгольских песчанок и белых крыс.

Для заражения используют хлопковых крыс не старше 30–45 дней. В этом возрасте масса их тела достигает 40–50 г. Пол животных значения не имеет. Хлопковых крыс можно заражать подкожно по 1400 ± 100 зрелых протосколексов *E.multiloculans* в область задней трети правой или левой половины живота.

Инвазионный материал вводят в 0,5 мл изотонического раствора натрия хлорида, содержащего по 1000 ЕД пенициллина и мономицина. При этом масса ларвоцист через 30 дней достигает 130–420 мг, через 60 дней — 1,0–3,5 г, через 80 дней 4,5–14 г и через 120 дней — 15–30 г. Юные протосколексы в подкожных ларвоцистах появляются к 50 дню, единичные зрелые — к 60 дню, а к 90 дню основная масса протосколексов — зрелые. При внутрибрюшинном заражении зрелые протосколексы в ларвоцистах появляются к 43 дню, а к 60 дню большинство из них зрелые.

При заражении хлопковых крыс яйцами альвеококка зрелые протосколексы в ларвоцистах появляются к 65 дню инвазии.

У монгольских песчанок наблюдается быстрый рост ларвоцист. Зрелые протосколексы в них появляются через 4 мес. после заражения.

Естественную невосприимчивость белых крыс к ларвальному эхинококкозу преодолевают путем использования животных в возрасте 3–9 недель и внутрибрюшинного заражения ацефалоцистами диаметром 0,1–1,0 мм (по 500–1000 ацефалоцист на животное) и протосколексами альвеококка. Длительность выживания зараженных альвеококкозом белых крыс достигает 2 лет, а биомасса паразита — 400 г, превышая массу тела хозяина в 1,5–2 раза. Созревание паразита начинается через 1 мес.

Золотистых хомяков также заражают внутрибрюшинно по 300–1000 ацефалоцист диаметром 0,1–1,0 мм. Длительность выживания зараженных животных достигает 1 года, а биомасса паразита — 30 г. Созревание паразита начинается через 1,5–2 мес.

Возраст белых аутобредных мышей при заражении не более 45–60 дней, а масса их тела к этому времени достигает 18–20 г. Мышей заражают *per os* по 1000 протосколексов одновременно с 100–200 ацефалоцистами. При медленно прогрессирующем росте ларвоцист альвеококка у белых аутобредных мышей паразит созревает примерно через 2 мес. после заражения, а длительность выживания зараженных мышей — 3–4 мес. и более.

Разработаны модели многокамерного эхинококкоза с первичным поражением печени или легких. Для воспроизведения этих моделей предварительно готовят инокулят ацефалоцист. Для этого ларвоцисты многокамерного эхинококкоза, выделенные из экспериментально инвазированных белых крыс-доноров через 5–10 мес. после заражения, измельчают ножницами или мясорубкой. Обработанную таким образом ткань паразита смешивают со стерильным изотоническим раствором натрия хлорида в объемном соотношении 1:8–1:10. Смесь процеживают 2–3 раза через мельничный газ с диаметром ячеек 0,3 мм. Фильтры взбалтывают и через 2 мин отстаивания всю надосадочную жидкость заменяют свежим изотоническим раствором натрия хлорида. Эту операцию повторяют до тех пор, пока надосадочная жидкость не станет прозрачной. После этого определяют концентрацию ацефалоцист.

Для воспроизведения модели многокамерного эхинококкоза печени у животных (белых или хлопковых крыс в возрасте соответственно 1 или 2 мес) под общим эфирным наркозом в асептических условиях рассекают послойно переднюю брюшную стенку по средней линии живота от мечевидного отростка на расстоянии 3–4 см. Из правой половины брюшной полости извлекают петли кишечника, смещают их влево, открывая подход к верхней брыжеечной вене, в которую вводят комбинированный катетер, состоящий из черенка инъекционной иглы с внутренним диаметром 0,3 мм, жестко соединенного с

прозрачной и гибкой полиэтиленовой (хлорвиниловой) трубкой длиной 9–12 см и внутренним диаметром 0,5 мм. На другом ее конце имеется расширение для соединения с канюлей шприца. В верхнюю брыжеечную вену каждому животному в течение 2–3 мин вводят до 0,2–0,3 мл равномерно перемешанного инокулята, содержащего 20–50 жизнеспособных ацефалоцист. Ушивают стенку сосуда. Вправляют петли кишечника в брюшную полость и послойно зашивают брюшную стенку.

Для воспроизведения модели многокамерного эхинококкоза легких лабораторным животным в тех же условиях вводят в бедренную вену по 20–200 ацефалоцист. Объем вводимого инокулята 0,3–0,6 мл.

При отборе новых препаратов для терапии эхинококкозов лечение целесообразно начинать на белых мышах и белых крысах через 1 мес, а на хлопковых крысах — через 1 неделю после заражения.

Для скрининга соединений, эффективных при ларвальных эхинококкозах, используют два метода. Первый метод основан на свойстве активных препаратов быстро вызывать деструкцию паразита при парентеральном введении зараженным животным. На ранней стадии инвазии животным (мышам, хлопковым крысам) вводят внутрибрюшинно испытуемое соединение в дозе 1/5 от максимальной нелетальной дозы (МНЛД). Препаратами сравнения могут служить мебендазол или альбендазол. Через 1–1,5 мес животных вскрывают и определяют жизнеспособность ларвоцист эхинококка. На испытуемое соединение берут не менее 5 животных. Второй метод основан на феномене ранних, как правило, обратимых деструктивных процессов в ларвоцистах эхинококка у инвазированных животных под влиянием активных соединений. На поздней стадии инвазии животным вводят испытуемое соединение в желудок в течение 5–7 дней в суточной дозе, близкой к МНЛД, или внутрибрюшинно 1 раз в день в течение 1–3 дней в суммарной дозе, равной 1/5 от МНЛД. Каждое животное взвешивают с точностью до 1 г 1–2 раза в день в течение 5–7 дней от начала исследования. На одно испытуемое соединение берут не менее 5 животных. Показателем эффективности препарата является выраженное и стабильное снижение массы тела животного за счет прекращения роста ларвоцист и их деструкции.

Химиотерапевтическую активность соединений при экспериментальных ларвальных эхинококкозах оценивают с помощью индекса торможения роста ларвоцист (ИТРЛ), выраженного в процентах через различные сроки по окончании лечения по следующей формуле:

$$ИТРЛ = \frac{M_k - M_n}{M_k - M_u} \times 100,$$

где M_k , M_n — средние показатели массы ларвоцист соответственно у контрольных и леченых животных по завершении исследования; M_u — средняя масса ларвоцист перед началом лечения.

Чем ближе к 100% ИТРЛ, установленный в результате использования того или иного препарата, тем выше его противоэхинококковая эффективность. ИТРЛ у наиболее эффективных препаратов превышает 100%, что объясняется снижением массы ларвоцист по отношению к их массе до начала лечения.

Жизнеспособность ларвоцист эхинококка определяют с помощью микроскопического исследования нативных препаратов на наличие и выраженность деструктивных изменений у зародышевых элементов паразита. Показателями гибели протосколексов служат исчезновение известковых телец, помутнение и потемнение паренхимы, деформация или отделение от сколекса короны крючьев, нарушение целостности тегумента. Признаками гибели ацефалоцист являются сглаженность структуры, потемнение, зернистость паренхимного слоя, его отслоение от кутикулярной оболочки, нарушение целостности последней, сжатие (коллапс) ацефалоцист.

Жизнеспособность ларвоцист проверяется также путем пассирования их хлопковым крысам или монгольским песчанкам.

Имагинальный эхинококкоз воспроизводят на золотистых хомяках 1–1,5 месячного возраста. Животным вводят в желудок 1000–2000 протосколексов из ларвоцист альвеококка от экспериментально зараженных грызунов-доноров (хлопковые крысы, белые мыши, белые крысы) и обрабатывают иммунодепрессантом (подкожные инъекции гидрокортизона за 3 дня и в день заражения протосколексами или однократная инъекция трикорта-40 в день заражения протосколексами). Исследование препаратов проводят по стандартной методике, применяемой при просветных формах гельминтов, т.е. обитающих в просвете кишки. Продолжительность эксперимента не должна превышать 2 недели, так как созревание онкосфер в стробиле половозрелых эхинококков происходит к 20 дню инвазии.

2.3. Трематодозы

2.3.1. Описторхоз

Описторхоз — хронически протекающий гельминтоз с преимущественным поражением гепатобилиарной системы и поджелудочной железы, сопровождающийся развитием выраженного иммунодефицитного состояния. Возбудитель — *Opisthorchis felineus*. Описторхоз — широко распространенное заболевание населения Западной Сибири, Приуралья, Татарстана и Восточного Казахстана, в меньшей степени — Архангельской и Иркутской областей, Украины, Белоруссии.

Цикл развития описторхиса включает смену трех видов хозяев. Окончательными хозяевами являются человек, кошка, свинья и многочисленные другие млекопитающие, питающиеся рыбой. Промежуточные хозяева — моллюски рода *Cadiella*, дополнительные — рыбы семейства карповых (язь, елец, чебак).

В организме окончательных хозяев паразит локализуется в желчных ходах печени, желчном пузыре, реже — в поджелудочной железе. У рыб развиваются метацеркарии — инкапсулированные личинки описторхиса, которые локализуются в подкожной клетчатке и мышцах, особенно спины. Для выделения метацеркарий целесообразно использовать более крупную рыбу, которая, как правило, заражена интенсивнее мелкой. Рыбу вылавливают в интенсивных очагах описторхоза и, обернув влажной материей, хранят в холодильнике при температуре 4 °С, лучше непосредственно под морозильной камерой.

Для заражения лабораторных животных можно использовать два метода получения метацеркарий. При первом скальпелем соскабливают подкожную клетчатку и мышечную ткань зараженной рыбы и, исследуя ее с помощью бинокулярной лупы, выделяют кусочки с нужным количеством метацеркарий, которые затем скармливают грызунам. Этот метод трудоемкий и недостаточно точный. Более простым и точным является метод заражения животных метацеркариями, полученными путем переваривания рыбьего фарша.

Для этого навеску фарша помещают в колбу и заливают искусственным желудочным соком (10 мл концентрированной соляной кислоты, 3 г пепсина, 9 г натрия хлорида на 1 л дистиллированной воды). На 100 г фарша берут 1 л желудочного сока. Колбу устанавливают на электромагнитную мешалку и помещают в термостат при температуре 37–38 °С на 1,5 ч. После этого содержимое сосуда фильтруют через металлическое сито с диаметром ячеек 1 мм. Фильтрат разливают в лабораторные цилиндры и через 15–20 мин отстаивания надсадочную жидкость сливают. Осадок разбавляют водопроводной водой и вновь дают ему отстояться. Эту процедуру повторяют не менее 5 раз. Осадок с метацеркариями разливают по часовым стеклам. В них под контролем бинокулярной лупы проводят окончательную отмывку метацеркарий изотоническим раствором натрия хлорида. Для этого, вращая часовое стекло вокруг вертикальной оси, концентрируют метацеркарии ближе к его центру, а излишки физиологического раствора вместе с остатками тканей рыбы удаляют пипеткой или шприцем с насаженной на него иглой. Эту процедуру повторяют несколько раз до получения относительно чистой взвеси ме-

тацеркарий. В связи с тем, что метацеркарии стимулированы изотоническим раствором натрия хлорида и содержанием их при температуре 37–38 °С, рекомендуется их сразу же использовать для заражения лабораторных животных. В качестве последних используют молодых золотистых хомяков с массой тела около 40–45 г. Хорошо заражаются также и животные с массой тела 60–70 г. Заражающая доза — 30–50 метацеркарий. Их вводят в пищевод с помощью шприца с канюлей в 0,5–1,0 мл.

У золотистых хомяков яйца гельминта появляются в фекалиях на 28–30 день инвазии, у джунгарских хомячков на 27 день и у белых крыс — на 30 день.

При массовом отборе препаратов для каждого из них достаточно использовать по 5 животных. Вскрытие следует проводить не ранее чем через 7–10 дней после окончания лечения. Препараты, проявившие достаточную эффективность, проверяют повторно на большем числе животных и сравнивают с препаратами, апробированными на практике и принятыми за стандарт (хлоксил, празиквантель). С учетом того, что антигельминтики обладают разной эффективностью в зависимости от срока инвазии, целесообразно определить эффективность препарата через различные сроки после заражения животных.

2.3.2. Клонорхоз

Клонорхоз — хронически протекающий гельминтоз, аналогичный описторхозу. Распространен на Дальнем Востоке, во Вьетнаме. Возбудителем клонорхоза *Clonorchis sinensis* хорошо заражаются собаки, кошки, золотистые хомячки. Методы экспериментальной химиотерапии сходны с таковыми при описторхозе.

2.3.3. Шистосомозы

Заболевание широко распространено во многих странах с жарким климатом. В России очаги шистосомоза не зарегистрированы.

Шистосомозами человека (*Shistosoma haematobium*, *japonicum*, *mansoni*) заражаются лабораторные грызуны: белые мыши, золотистые хомячки. Наиболее часто в качестве модели используется *S. mansoni*, которым можно заразить кроликов и обезьян. В организме окончательных хозяев паразит локализуется в сосудах печени и в венах мочевого пузыря.

Промежуточным хозяином шистосом Мэнсона являются моллюски *Australorbis grabrata* размером от 1,0 до 2,5 см, которых для поддержания модели содержат в аквариуме. Заражение моллюсков производят индивидуально по 15 экземпляров мирацидиев каждому. Мирацидиев получают из измельченной печени зараженных шистосомозом лабораторных животных. При этом температура воды для содержания мирацидиев составляет 28–30 °С, а время контакта моллюска с мирацидиями — 5 ч. До полного развития и выхода из моллюсков церкариев нужно около 27 дней.

Для получения церкариев, которыми заражают лабораторных животных, моллюсков помещают под лампу. Из каждого моллюска, зараженного 5 мирацидиями в среднем выходит по 700 церкариев. Для заражения мышей берут 80–100 церкариев на 1 животное и вводят внутривентрально. Через 7–8 недель шистосомы достигают половой зрелости. Большинство животных оказывается зараженными 20–40 парами шистосом. Половозрелых шистосом выбирают из мезентериальных сосудов через 41 день после заражения. При использовании антигельминтиков, эфира или хлороформа может наблюдаться миграция шистосом из сосудов в легкие.

2.3.4. Фасциолезы

Фасциолезы — заболевания травоядных животных (крупного рогатого скота, овец, коз, кроликов и др.) и человека, характеризующиеся в основном поражением печени. Их возбудителями являются трематоды — печеночный сосальщик *Fasciola hepatica* Linnaeus, 1758 и гигантская двуустка *F. gigantica* Cobbold, 1856.

Для экспериментальной терапии фасциолезов используют кроликов, овец, реже белых крыс и мышей.

Яйца фасциол можно получить методом осаждения из фекалий домашних животных, а также из желчи или из трематод, собранных при убойе животных. Яйца трематод для развития и вылупления из них личинок помещают в отстоявшуюся водопроводную воду при комнатной температуре, через 10–15 дней из яиц выходят мирацидии. Однако они не выходят из яиц в темноте и могут сохраняться в таких условиях до 5 мес. Для дальнейшего развития личинок необходим промежуточный хозяин, которым являются различные виды пресноводных моллюсков. Наиболее подходящим для культивирования адолескариев *F. hepatica* являются малые прудовики (*Limnaea truncatula*). Их содержат в чашках Коха диаметром 10–24 см и высотой 6,5–7,5 см. В качестве корма используют элодею — прошлогодние, вымоченные в воде в течение суток листья деревьев (березы, осины, ольхи, тополя и др.). Дно чашек увлажняют дехлорированной водой, а чашки прикрывают стеклом. В каждую чашку помещают по 5–10 малых прудовиков. Для длительного содержания большого числа малых прудовиков применяют крупные бетонированные водоемы (площадью до 4 м² и глубиной до 0,1–0,7 м) с проточной водой. Малые прудовики лучше живут при температуре, не превышающей 18–22 °С.

Яйца фасциол, находящиеся в воде в чашках Петри, после развития в них мирацидиев помещают под лампу. Выходящие из них мирацидии под лупой вылавливают пипеткой и определенное их количество подпускают в индивидуальном порядке к прудовикам, помещенным в небольшом количестве воды в чашках Петри. Мирацидии довольно быстро проникают в тело моллюска. Через 2–3 ч прудовиков переносят в аквариум. Длительность партеногенеза в моллюсках при комнатной температуре варьирует от 50 до 80 дней. Спустя указанный срок церкарии выходят из тела моллюсков и инцистируются, превращаясь в адолескариев, которые уже через 12 ч становятся инвазионными. Собранных под лупой при помощи пипетки адолескариев вводят лабораторным животным в желудок. Работу можно значительно упростить, используя естественно зараженных моллюсков из неблагополучных по фасциозу хозяйств.

Фасциолы достигают половой зрелости у кроликов через 2–2,5 мес. У белых мышей при введении им по 5 адолескариев фасциолы достигают половой зрелости на 35–36 день инвазии и откладывают яйца в течение 7 нед. Однако через 4–5 нед с момента достижения паразитом половозрелой стадии наблюдается значительная гибель животных.

Белые крысы заражаются фасциозом в 65–75%. При заражении их по 10–12 адолескариев через месяц отдельные паразиты встречаются в желчных ходах, но большинство их находится в паренхиме печени.

С целью исследования противofасциозного действия препаратов предложен метод имплантации фасциол белым крысам под кожу (модель Линерта). По этому методу фасциол, извлеченных из печени сельскохозяйственных животных, отмывают и содержат в изотоническом растворе натрия хлорида, подогретом до 37 °С. Перед имплантацией их помещают в стеклянные трубочки, по три в каждую. Для исследования используют крыс-самцов с массой тела до 200 г. Их наркотизируют эфиром, фиксируют в положении на животе на столике для манипуляций с мелкими лабораторными животными, выстригают шерсть на спине и делают два параллельных разреза кожи спины на уровне лопаток, длиной около 0,7 см. В разрезы на глубину 3,5 см вставляют стеклянные палочки с фасциолами и при помощи тонкой деревянной палочки или куриного пера осторожно проталкивают их вглубь разреза. Раны зашивают, крысам вводят антибиотик. Имплантированные под кожу крысы фасциолы сохраняют жизнеспособность в течение 4–6 сут. За этот период можно поставить эксперимент по исследованию препаратов с предполагаемым фасциолоидным действием. По окончании исследования фасциолы извлекают и определяют их состояние (мертвые, частично утратившие жизнеспособность и пр.).

2.3.5. Парагонимозы

Парагонимозы — трематодозы человека и плотоядных животных, вызываемые более чем 35 видами гельминтов рода *Paragonimus* Braun, 1899. В России природные очаги

парагонимозов имеются в Амурской области, Приморском и Хабаровском краях. Промежуточными хозяевами парагонимозов являются пресноводные моллюски рода *Juga*, а дополнительными — речные раки и пресноводные крабы; окончательные хозяева — дикие плотоядные животные, редко — человек.

У окончательных хозяев гельминты локализуются в фиброзных капсулах в бронхах и легких, на плевре, в диафрагме, головном мозге и т.д. С мокротой и фекалиями яйца парагонимоза попадают в воду, где через 3–4 нед. развиваются мирации, которые внедряются в пресноводных моллюсков. Приблизительно через 5 мес. из моллюсков выходят церкарии, которые внедряются в пресноводных раков и крабов. В них формируются инвазионные личинки — метацеркарии, которые при поедании зараженных раков и крабов из кишечника окончательного хозяина мигрируют в разные органы и ткани, где через 1,5–3 мес. развиваются в зрелого паразита.

В Приморском крае нередким заболеванием является личиночный (ларвальный) парагонимоз, возбудителем которого является *P. westermaniichunensis*. Человек играет роль резервуарного хозяина. Гельминт паразитирует только в личиночной форме, локализуясь в мышцах конечностей диафрагмы, межреберных мышцах. Характерна яркая клиника острой стадии рецидивирующих поражений бронхолегочного аппарата, протекающих с выраженными токсико-аллергическими проявлениями.

Экспериментальными животными служат белые мыши, крысы, кошки и собаки. Для заражения животных получают метацеркарии из речных раков и крабов. Крысы и мыши заражают *per os* 10–20, кошек и собак 50–100 метацеркариями. Через 40–60 дней паразит достигает стадии половой зрелости.

Исследование препарата рекомендуется начинать через 2–4 нед. после заражения животных. С целью скрининга противопарагонимозных препаратов можно использовать молодых паразитов. Для их получения измельчают стенки брюшной и плевральной полостей и других органов зараженных *P. westermani* мышей. Полученную измельченную массу помещают на 12 ч в раствор Рингера при 37°С, в который добавлены пенициллин (200 ЕД/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и испытуемый препарат в разных концентрациях. Если препарат оказывается эффективным, дальнейшее его изучение ведут на лабораторных моделях парагонимоза *in vivo*.

3. Основные принципы техники безопасности при работе с лабораторными животными, экспериментально зараженными гельминтозами

Помимо общих санитарно-гигиенических правил, при работе с лабораторными животными и трупным материалом необходимо дополнительно соблюдать ряд предосторожностей и условий содержания инвазированных животных.

При ряде гельминтозов попадание в пищеварительный тракт инвазионных яиц или личинок гельминтов может вызвать заражение обслуживающего персонала и экспериментаторов. Наибольшую опасность представляют яйца аскарид, карликового цепня, а также выделенные из тканей хозяина личинки трихинелл, метацеркарии описторхиса, адолескарии трематод, онкосферы свиного цепня, плероцеркоиды лентецов. Для заражения свиней и собак цистицеркозом требуются особые условия. Однако скрининг и исследование противоцистицеркозной эффективности препаратов можно проводить на лабораторных мышах или крысах, экспериментально зараженных стробилоцеркозом (см. раздел 2.8).

Инвазионный материал помещают в кюветы, которые по окончании работы обрабатывают кипятком или обжигают спиртом. Для работы с животными необходимо иметь специальный халат и резиновые перчатки. Использованная посуда обезвреживается кипячением. По окончании работы с животными или инвазионным материалом рабочий стол обжигают спиртом, перчатки и руки моют теплой водой с мылом.

Зараженные гельминтами животные содержатся в виварии на общих условиях при строгом соблюдении контроля за их содержанием и хранением трупов животных до их отправки на утилизацию.

Свою специфику имеет работа с ларвальными эхинококкозами. Поддержание лабораторных штаммов эхинококков и скрининг антигельминтиков проводят на грызунах, зараженных протосколексами и ацефалоцистами этих цестод. В связи с этим, а также вследствие инвазивности для человека используемого для заражения животных материала следует соблюдать особые меры предосторожности, заключающиеся в строгом соблюдении указанных выше профилактических мероприятий. Кроме того, вскрытие животных и ларвоцист во всех случаях производят под прикрытием стеклянной или пластмассовой перегородки во избежание попадания инвазионного материала в глаза. С этой же целью заражение животных производят в защитных очках. Для содержания зараженных эхинококкозами животных должно быть выделено отдельное помещение и приняты меры, исключающие разбегание животных из помещения. Выбежавшее из клетки животное должно быть отловлено. Желательно с этой целью иметь в комнате зараженные мышеловки и крысоловки. Необходимо также предусмотреть систему мероприятий, исключающих возможность поедания хищными животными зараженных грызунов и их трупов. С этой целью комнаты, где содержатся зараженные эхинококкозами животные, должны иметь выложенные кафелем пол и стены, а также цементный порог высотой не мене 40 см. Дверь комнаты с животными перед уходом персонала из помещения запирается на замок. Рекомендуется иметь при входе в помещение дополнительный бокс с решетчатой дверью на пружине.

Попадание собаки или кошки в помещение вивария, где содержатся зараженные ларвальными эхинококкозами животные, рассматривается как чрезвычайная ситуация, и такое животное подлежит уничтожению.

Выделение ларвоцист для перезаражения животных проводят в специальной комнате. Животное-донор доставляется из вивария в банке заранее усыпленным. Приготовленную взвесь протосколексов и ацефалоцист переносят в виварий, где и производят перезаражение животных. Оставшийся после заражения инвазионный материал, посуду и инструмент кипятят.

Заражение животных эхинококкозами производят в специальной комнате вивария. Все эксперименты с животными проводят только в этой комнате. Вынос живых животных из вивария запрещается.

Обслуживающий персонал удаляет трупы павших животных из клеток при их ежедневной уборке, заворачивает в бумагу с надписанным номером клетки и помещает в банку с плотно закрываемой крышкой.

При необходимости трупы животных хранят в холодильнике, находящемся в этой же комнате. В лабораторию их переносят только в специальных банках. Отработанные трупы засыпают хлорной известью и переносят в общий банк для утилизации.

Обслуживающий персонал вивария, а также все научные сотрудники и лаборанты, работающие с лабораторными животными, должны быть проинструктированы о правилах работы с зараженными животными. Повторные инструктажи проводят систематически 2 раза в год с соответствующей записью в специальном журнале.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Михайлицын Ф.С., Бессонов А.С., Коваленко Ф.П., Легоньков Ю.А., Севбо Д.П., Трусов С.Н., Перчун Н.И., Черникова Е.А. Разработка новых отечественных антигельминтиков. Оценка те-

- рапевтической активности флузамида на новых экспериментальных моделях кишечных цестодозов. Медицинская паразитология и паразитарные болезни, 2003. — № 2. — С. 33–39.
2. Астафьев Б.А., Лебедева М.Н., Михайлицин Ф.С. и др. Активность отечественного антигельминтика трихлорфена на моделях гельминтозов человека // Медицинская паразитология и паразитарные болезни. — 2004. — №1. — С. 44–47.
 3. Martin R.J. Modes of action of anthelmintic drugs. Vet J. 1997 Jul; 154(1): 11–34.
 4. Köhler P. The biochemical basis of anthelmintic action and resistance. Int J. Parasitol. 2001 Apr; 31(4): 336–45. Jennifer Keiser et al. Efficacy of Current Drugs Against Soil-Transmitted Helminth Infections Systematic Review and Meta-analysis. JAMA. Apr 23, 2008; 299(16): 1937–48.
 5. Jennifer Keiser, Jacques Chollet, Shu-Hua Xiao, Jin-Yan Mei, Pei-Ying Jiao, Jürg Utzinger, and Marcel Tanner Mefloquine—An Aminoalcohol with Promising Antischistosomal Properties in Mice PLoS Negl Trop Dis. 2009 January; 3(1): e350. Published online 2009 January 6. doi: 10.1371/journal.pntd.0000350.
 6. Keiser J. *In vitro* and *in vivo* trematode models for chemotherapeutic studies. Parasitology. 2010 Mar; 137(3): 589–603. Epub 2009 Dec 7.
 7. Hemphill A., Stadelmann B., Scholl S., Müller J., Spiliotis M., Müller N., Gottstein B., Siles-Lucas M. Echinococcus metacestodes as laboratory models for the screening of drugs against cestodes and trematodes. Parasitology. 2010 Mar; 137(3): 569–87. Epub 2009 Sep 21.

ГЛАВА 38

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ИММУНОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: *акад. РАМН Р.М. Хаитов; чл.-корр. РАМН, проф. И.С. Гуцин;*
проф. Б.В. Пинегин; проф. А.А. Ярилин; д. м. н. А.Н. Миронов; д. м. н.,
проф. В.А. Меркулов; Е.В. Кожина

Введение

Цель методических рекомендаций 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 иммуностропных 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, следует изучить его влияние на гуморальный, клеточный иммунитет, систему как провоспалительных (фактор некроза опухолей- α , интерлейкин- 1β , ИЛ-8 и др.), так и противовоспалительных (интерлейкин-10, интерлейкин-4 и др) цитокинов, апоптоз нейтрофилов и лимфоцитов, систему Th1- и Th2-клеток. Не допускается выборочное исследование изучаемого препарата на какой-то один из компонентов иммунной системы. Следует изучить влияние препарата на все компоненты иммунной системы в соответствии с данными методическими рекомендациями. Задача заключается в количественной оценке эффекта различных доз изучаемого вещества на факторы врожденного и адаптивного иммунитета, т.е. должен быть оценен эффект дозы препарата и эффект времени введения препарата.

1. Оценка иммуностропной активности лекарственных средств

1.1. Подготовительная работа

Подготовительная работа при проведении исследований *in vivo* заключается в выборе лабораторных животных, способа введения и доз изучаемого препарата. Для изучения иммуномодулирующей активности препарата наиболее целесообразно использовать мышей линий СВА, BALB/с, СВ57/ВL и др. массой 18–20 г. Необходимо, чтобы получавшую препарат и контрольную группу составляли животные одного возраста, пола, веса, полученные одновременно из одного питомника и содержащиеся в одинаковых условиях. Введение исследуемого препарата в различных экспериментах должно осуществляться в одно и тоже 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 грамм веса животного или на площадь тела. Высшая доза препарата должна составлять 1/10 от ЛД₅₀. При отсутствии информации о терапевтической дозе для исследований *in vivo* в качестве ориентировочных можно использовать дозы 1000 мкг, 100 мкг и 10 мкг на мышью, 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, внутримышечный или внутривенный пути введения препарата.

Результаты экспериментов с получающей препарат и контрольной группой 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 получавшей препарат группами.

1.2. Оценка влияния препарата на неспецифическую резистентность организма

Для этого целесообразно использовать в качестве объекта для исследования мышей, в качестве инфекционных агентов — стафилококк и кишечную палочку, наиболее доступные для лабораторных исследований бактерии.

Для оценки стимуляции неспецифической резистентности изучаемый препарат вводят внутривенно или подкожно в различных дозах мышам линии СВА или (СВА/С57black)F1. Наиболее часто используются 1000 мкг, 100 мкг, 10 мкг, 1 мкг в объеме 0,2 мл физиологического раствора. Контрольные мыши получают 0,2 мл физиологического раствора. Через 48–72 ч одну группу получающих препарат и контрольных мышей заражают внутривенно 1–2 DCL *Staph. aureus*, другую группу — *E. coli*. Наблюдения за животными ведут в течение 10 дней. Исследование можно учитывать только в том случае, если в контрольной группе гибель животных будет составлять не менее 90%. По данным этого исследования 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 (факультативное исследование). Для этих целей используют вирус гриппа, адаптированный к мышам. Схема и оценка результатов эксперимента такая же, как и с бактериями. Получающих препарат 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.

1.3. Оценка влияния препарата на фагоцитоз

1.3.1. Оценка влияния препарата на поглотительную активность фагоцитов с помощью микроскопического метода.

Для оценки влияния препарата на поглотительную активность фагоцитов используют мышей через 24–48 ч после введения исследуемой дозы препарата. Мышам для накопления нейтрофилов вводят внутривенно 3–4 мл 2–3% раствора пептона и через 2 ч их подвергают эвтаназии 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 пуловой мышьиной 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-Гимза в течение 30–40 мин.

Для изучения фагоцитарной активности макрофагов на 3–4-е сутки после введения пептона мышей подвергают эвтаназии с помощью хлороформа, вскрывают в асептических условиях и вводят внутрибрюшинно 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 исследованиях с нейтрофилами.

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

Для оценки влияния препарата на фагоцитоз *in vitro* берут кровь из кубитальной вены здоровых доноров 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 азура-П в 0,05% растворе тритона 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 пуловой 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 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 в разделе 3.1.2. Сравнивают по фагоцитарному индексу и фагоцитарному числу способность исследуемого препарата влиять на поглотительную стадию фагоцитоза.

1.3.2. Оценка влияния препарата на поглотительную активность фагоцитов с помощью проточной цитометрии.

Оценка поглощения меченых флюорохромом бактерий с помощью проточной цитометрии имеет существенные преимущества по сравнению с микроскопическим методом: быстрота, объективность, точность измерения, малая трудоемкость, возможность измерения поглотительной активности отдельно нейтрофилами и моноцитами (в ряде случаев эозинофилами) без специальной сепарации клеток, что регистрируется проточным цитофлюориметром отдельно для нейтрофилов и моноцитов. Исследование можно ставить с цельной кровью, полученной из кубитальной вены человека или супраорбитального синуса мышей, а также с клетками перитонеального экссудата мышей.

Мечение бактерий флюоресцеин-5-изотиоцианатом (ФИТЦ). St.aureus выращивают на скошенном мясопептонном агаре в течение 16–24 ч при 37 °С, бактерии смывают с агара фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7,4 путем легкого пипетирования, переносят в чистую пробирку и убивают при 95 °С в течение 30 мин. Бактерии осаждают 1000 g 25 мин и однократно отмывают 0,1 М карбонатно-бикарбонатным буфером pH 9,5, концентрацию бактерий доводят по стандарту мутности до 100 млн/мл карбонатным буфером.

ФИТЦ растворяют в диметилсульфоксиде (ДМСО) и добавляют из расчета 0,05 мг на 100 млн бактерий и 0,01 мг на 100 млн. дрожжей. Микроорганизмы инкубируют в

течении 1ч при комнатной температуре в темном месте, после чего трехкратно отмывают ФСБ от несвязавшегося ФИТЦ центрифугированием.

Меченые бактерии аликвотируют, часть хранят при +4 °С до 2 мес, остальные замораживают при -70 °С.

Постановка реакции поглощения с выделенной лейко массой. К 2 мл цельной гепаринизированной крови добавляют 1 мл 3% раствора желатины на ФСБ, перемешивают и ставят на 10–15 мин при 37 °С для осаждения эритроцитов. Верхний слой лейкоцитов отбирают в чистую пробирку и дважды отмывают ФСБ. Концентрацию лейкоцитов подсчитывают в камере Горяева после окраски по Задорожному-Дозморову и доводят ее до 2 млн/мл по сегментоядерным лейкоцитам.

Реакция ставится в 96-луночном круглодонном планшете с емкостью лунок 200 мкл. В лунку вносят 90 мкл меченого стафилококка в концентрации 10 млн/мл, затем добавляют 90 мкл лейкоцитов в концентрации 2 млн/мл.

Для изучения опсонической активности сыворотки в образцы добавляют 20 мкл интактной аутологичной сыворотки. В качестве контроля опсонизации можно использовать пуловую сыворотку от здоровых людей. Реакцию проводят в течение 30 мин при 37 °С. После этого планшет центрифугируют 200 g 1 мин при +4 °С. Эритроциты лизируют 200 мкл охлажденного раствора хлористого аммония, лейкоциты осаждают и однократно отмывают охлажденным ФСБ-ЭДТА, после чего в нем же клетки переносят в цитометрические пробирки и хранят на холоде до анализа на приборе в течение дня.

Проточная лазерная цитометрия осуществляется с помощью цитометра FACSCalibur фирмы Becton Dickinson, хотя возможно применение и других моделей. Пробы должны анализироваться в день постановки реакции поглощения. Настройки FSC и SSC должны быть такими, чтобы на DotPlot размещались три облака: нейтрофилы, моноциты и лимфоциты. Соответственно облакам нейтрофилов и моноцитов выводятся гистограммы FL1, настроенные на ФИТЦ. Усиление по FL1 устанавливается таким образом, чтобы пики флуоресцирующих и нефлуоресцирующих фагоцитов находились по разные стороны от 100-го канала. Процент флуоресцирующих (т.е. фагоцитировавших) нейтрофилов и моноцитов — фагоцитарный индекс — высчитывается автоматически, он выводится в соответствующих гистограммах таблиц статистики. Рекомендуемое количество собираемых событий по нейтрофилам — 3000.

1.3.3. Оценка влияния препарата на завершенность (бактерицидную активность) фагоцитоза

Для оценки бактерицидной активности целесообразно использовать проточную цитометрию, что имеет несомненные преимущества перед классическим микробиологическим методом: быстрота получения результатов (несколько часов, а не сутки), малая трудоемкость, отсутствие необходимости посева и выращивания микроорганизмов на питательных средах, достаточная точность и автоматическое вычисление процента погибших микроорганизмов.

St. aureus штамм Cowan I метят в следующих условиях: флуоресцеин изоционат (ФИТЦ) 0,5 мг на 100 млн бактерий в течение 16 ч. Стафилококк аликвотируют и хранят при -70 °С. Реакцию ставят в 96-луночном круглодонном планшете. В *опытную лунку* вносят 90 мкл живого меченого стафилококка в концентрации 10 млн/мл, 20 мкл пуловой сыворотки от 25 доноров и 90 мкл лейкоцитов, выделенных на желатине (см выше) в концентрации 2 млн/мл. Соотношение нейтрофилы: бактерии равно 1:5. Смесь инкубируют 20 мин при 37 °С, лейкоциты осаждают 200 g 1 мин при +4 °С и 2 раза отмывают от несвязавшихся бактерий, ресуспендируют в 200 мкл фосфатно-солевого буфера (ФСБ) pH=7,4 и инкубируют 1 ч при 37 °С. Планшет центрифугируют 200 g 1 мин при +4 °С, лейкоциты разрушают в течение 5–10 мин 200 мкл раствора следующего состава: 10 mM карбонатно-бикарбонатного буфера pH=9,5, 0,2% сапонина, бактерии осаждают 1000 g 10 мин и ресуспендируют в 200 мкл ФСБ с 2,5 мкг/мл пропидиума йодида

(«Sigma»), через 30–60 мин пробы анализируют на проточном цитометре. В *контрольную лунку* вносят 90 мкл ФИТЦ-стафилококка, 90 мкл ФСБ и 20 мкл пуловой сыворотки, инкубируют 1,5 ч. Дальнейшие этапы проводят аналогично опытным образцам. Процент киллинга стафилококка фагоцитами вычисляют путем вычитания значения, полученного в контрольной пробе, из значения опытной пробы.

Для анализа проб необходим цитометр, оснащенный двумя светофильтрами: для ФИТЦ — 525 нм и для ПИ — 620 нм. На экран выводят Dot Plot FSC на SSC, отображающий только ФИТЦ-меченый стафилококк, Dot Plot FL1 на FL3, в котором окном R1 выделяют ФИТЦ-меченые микроорганизмы. Проекцию этого окна на FL3 выводят в виде гистограммы со статистикой для того, чтобы автоматически высчитывать процент убитых бактерий, несущих двойную метку (правый верхний квадрант), по отношению к сумме убитых бактерий и живых (одинарная метка — правый нижний квадрант); при этом из счета исключали немеченый дебрис (левые нижний и верхний квадранты).

1.4. 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 Эрне 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 этой клетки образуются видимые макроскопически зоны гемолиза. Подсчитывая эти зоны, можно определить, какое число АОК приходится на 10^6 ядросодержащих клеток и на всю селезенку.

При исследовании мышей внутрибрюшинно иммунизируют эритроцитами барана в дозе 5×10^6 . При определении числа IgM-АОК на 4-е сутки (пик развития IgM-ответа) животных подвергают эвтаназии, 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 Difko на среде Хэнкса, клеток селезенки и эритроцитов барана. Для этого к 0,5 мл расплавленного и помещенного в водяную баню 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 исследования ведется невооруженным глазом. На красном фоне подсчитывают число зон гемолиза (просветления). Каждая зона соответствует одной IgM-АОК.

Для определения числа IgG-АОК животных подвергают эвтаназии на 6–7-й день — пик развития IgG-ответа. Исследование ведут как при определении IgM-АОК: после подсчета числа этих клеток в чашки Петри вносят 0,5 мл кроличьей антисыворотки против мышиногo 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.

Для определения титра антител используют при иммунизации эритроцитами барана реакцию гемагглютинации. Она основана на способности антител, содержащихся в сыворотке крови иммунизированных животных, склеивать (агглютинировать) эритро-

циты барана. Кровь для получения сыворотки берут на 7–10-й день после иммунизации мышей эритроцитами барана (максимум накопления антител в крови) в вышеуказанной дозе путем декапитации или с помощью пастеровской пипетки из окологлазной пазухи. В 96-луночных плоскодонных планшетах готовят двукратные разведения исследуемой сыворотки в объеме 0,5 мл, начиная с разведения 1:10. В контрольную лунку вносят 0,5 мл физиологического раствора. Ко всем лункам добавляют 0,5 мл 1% эритроцитов барана. Учет реакции ведется после инкубации планшетов в термостате в течение 2-х ч при 37 °С. При положительном результате эритроциты оседают на дне лунки планшета в виде зонтика, при отрицательном — в виде пуговки. За титр принимают то последнее разведение исследуемой сыворотки, при которой еще наблюдается положительный результат. Контрольная лунка должна быть отрицательной.

При оценке действия препарата на гуморальный иммунный ответ изучают его влияние на индуктивную и продуктивную фазу этого ответа. В первом случае различные дозы препараты вводят одновременно с антигеном, во втором случае — на 3-и или 5-е сут после иммунизации при изучении IgM- и IgG-ответа соответственно.

Оценку влияния препарата на синтез основных классов иммуноглобулинов — IgG, IgA, IgM *in vitro* проводят на культуре мононуклеаров периферической крови человека. Методика выделения клеток, условия их культивирования и стимуляции описаны в разделе 1.6. Здесь целесообразно отметить, что в индукции синтеза иммуноглобулинов применяют поликлональные активаторы В-лимфоцитов — митоген лаконоса или золотистый стафилококк штамм Cowan в субоптимальных дозах. Культуры мононуклеаров, активированные указанными митогенами в присутствии различных доз исследуемого вещества инкубируют в термостате в течение 10 дней — срок максимального накопления иммуноглобулинов в культуральной среде. Количества иммуноглобулинов определяют с помощью двуцентрового иммуноферментного метода, используя соответствующие наборы, или с помощью нефелометрического анализа.

1.5. Оценка влияния препарата на клеточный иммунный ответ

Для оценки влияния препарата на клеточный иммунный ответ используют реакцию гиперчувствительности замедленного типа (ГЗТ), характеризующуюся двумя важными чертами: информативностью и простотой исполнения. При постановке ГЗТ антиген вводят двукратно: для сенсибилизации и для разрешения. Сенсибилизация корпускулярными или растворимыми белковыми антигенами вызывает образование антиген-специфических Т-лимфоцитов. При повторном введении антигена эти Т-лимфоциты специфически взаимодействуют с ним и выделяют ряд провоспалительных цитокинов. Если разрешающая доза антигена вводится подкожно или внутрикожно, то на месте инъекции развивается воспалительная реакция, интенсивность которой легко измерить. Классическим примером ГЗТ являются туберкулиновые пробы.

При постановке ГЗТ для сенсибилизации мышам подкожно вводят 1×10^7 эритроцитов барана в объеме 100 мкл. Разрешающую дозу антигена, 1×10^8 эритроцитов барана в объеме 20 мкл, вводят на 5-й день после сенсибилизации под апоневротическую пластинку одной из задних конечностей. В контралатеральную лапу в качестве контроля вводят физиологический раствор в таком же объеме. Учет интенсивности воспалительной реакции осуществляют через 24 ч после введения разрешающей дозы антигена. Для этого мышей подвергают эктаназии, сразу после этого обе лапки отрезают на уровне голеностопного сустава и взвешивают на торсионных весах. Определяют индекс воспаления (ИВ) по разнице массы опытной (О) и контрольной (К) лап.

$$ИВ = \frac{O - K}{K} \times 100\%.$$

Оценку влияния препарата целесообразно осуществлять как на стадии сенсибилизации, так и разрешения. С этой целью различные дозы препарата вводят одновременно

с сенсибилизирующей и разрешающей дозами антигена. При этом препарат оказывает влияние на различные стадии клеточного иммунного ответа: в первом случае — на процесс образования клона антиген-специфических Т-лимфоцитов, во втором случае — на способность этих лимфоцитов при встрече с антигеном продуцировать провоспалительные цитокины.

1.6. Оценка влияния препарата на пролиферативную активность Т- и В-лимфоцитов

Оценка пролиферативной активности Т- и В-лимфоцитов с помощью реакции бласт-трансформации в известной степени является интегральным методом определения их функциональной активности. Этот метод основан на способности некоторых лектинов вызывать поликлональную активацию и пролиферацию лимфоцитов, которая оценивается радиометрически — по интенсивности включения в клетки ^3H -тимидина. Как правило, для активации Т-лимфоцитов используют фитогемагглютинин (ФГА) или конканавалин А (Кон А), для активации В-лимфоцитов — митоген лаконоса (МЛ) или *Staphylococcus aureus* штамм *Cowan*.

В реакции бласт-трансформации используют взвесь мононуклеаров. Для их выделения кровь разводят 1:2 средой 199, наслаивают на градиент фиколл-пака, $d=1,077$, и центрифугируют при 400 g в течение 40 мин. Белое кольцо, образующееся на разделе фаз и содержащее мононуклеары, аккуратно отсасывают пастеровской пипеткой и 2 раза отмывают средой 199 с помощью центрифугирования 10 мин при 200 g. Осадок ресуспендируют в соответствующей питательной среде, считают в камере Горяева количество клеток и доводят их питательной средой до нужной концентрации.

При постановке реакции бласт-трансформации мононуклеары доводят до концентрации 2 млн/мл полной ростовой средой — ПРС, состоящей из среды RPMI-1640, 10% эмбриональной телячьей сыворотки, 10 mM Нерес, 2 mM L-глутамина и 40 мкг/мл гентамицина. Реакцию ставят в объеме 150 мкл в 96-луночных плоскодонных планшетах. В опытные лунки вносят 50 мкл мононуклеаров с указанной выше концентрацией клеток, 50 мкл Т- или В-митогена в соответствующей дозе (доза митогена следует определить в предварительных экспериментах и для оценки действия препарата она должна быть субоптимальной) и 50 мкл ПРС (индуцированная бласт-трансформация). В контрольные лунки вносят 50 мкл клеток и 100 мкл ПРС (спонтанная бласт-трансформация). Планшеты направляют на 72 ч при температуре 37 °C в CO₂-инкубатор, содержащий 5% CO₂. За 6 ч до окончания инкубации в опытные и контрольные лунки добавляют 1 мКи ^3H -тимидина. После окончания инкубации с помощью специального прибора для сбора клеток — харвестера — лимфоциты из лунок планшета переносят на стекловолоконный фильтр и тщательно промывают дистиллированной водой. Вся радиоактивность, связанная с макромолекулярными структурами клетки, остается на фильтре. Фильтры помещают во флаконы со сцинтилляционной жидкостью и измеряют радиоактивность на б-счетчике. Каждую пробу ставят в трех лунках и результаты по определению радиоактивности усредняют. Оценку результатов исследования определяют по 2-м показателям: числу импульсов в мин и индексу стимуляции (ИС). Последний определяют по формуле:

$$ИС = \frac{O}{K},$$

где O — радиоактивность в лунках с митогеном, K — радиоактивность в лунках без митогена.

Изучение препарата на пролиферативный ответ Т- и В-лимфоцитов целесообразно проводить на модели как индуцированной, так и спонтанной бласт-трансформации. В первом случае в опыте смешивают 50 мкл мононуклеаров, 50 мкл — митогена в субоптимальной концентрации и 50 мкл препарата в соответствующем разведении; в контро-

ле — 50 мкл мононуклеаров, 50 мкл митогена и 50 мкл ПРС. Во втором случае в опыте смешивают 50 мкл мононуклеаров, 50 мкл препарата в соответствующем разведении и 50 мкл ПРС; в контроле — 50 мкл мононуклеаров и 100 мкл ПРС. По ИС оценивают влияние препарата на спонтанную и индуцированную пролиферацию лимфоцитов.

1.7. Оценка влияния препарата на апоптоз лимфоцитов

Апоптоз — это активная форма гибели клеток, обусловленная активацией внутриклеточных механизмов, которые вызывают дезинтеграцию ДНК. Развитие апоптоза происходит в результате поступления сигналов извне через специализированные рецепторы или вследствие активации внутриклеточных (преимущественно митохондриальных) факторов. Индукция апоптоза опухолевых клеток лежит в основе действия таких терапевтических агентов, как химиопрепараты и ионизирующая радиация. Наиболее удобной моделью для изучения влияния препаратов на апоптоз служат лимфоциты, которые относятся к клеткам, наиболее чувствительным к индукции апоптоза. Как усиление, так и ослабление апоптоза может привести к нежелательным результатам. Избыточная гибель лимфоцитов (в частности, при их активации антигеном) имеет результатом подавление иммунного ответа. Недостаточный уровень апоптоза лимфоцитов может привести к накоплению аутоагрессивных клонов и развитию аутоиммунных процессов. В связи с вышесказанным оценка влияния фармакологических препаратов на апоптоз клеток чрезвычайно важна. Желательно оценивать воздействие препаратов параллельно на уровень апоптоза покоящихся и активированных лимфоцитов, поскольку это позволяет выявить соответствующие эффекты препаратов на лимфоциты в условиях покоя иммунной системы и при иммунном ответе.

Объектом исследования чаще всего служат мононуклеары периферической крови, выделяемые общепринятыми методами (обычно — центрифугированием на слое фиколла-верографина по *Voym*). Для оценки эффекта фармакологических препаратов на уровень апоптоза лимфоцитов может быть рекомендован скрининговый метод, основанный на цитофлуорометрической оценке утраты части ДНК (тест на гиподиплоидность). Мононуклеарные клетки (неактивированные или предварительно активированные митогеном, как описано в главе 1.6.) суспензируют в концентрации 5×10^6 /мл в среде RPMI-1640, содержащей 2 мМ L-глутамин и 10% сыворотки эмбрионов телят, и инкубируют с изучаемым препаратом. Затем их фиксируют 70% этанолом в течение 1 ч. После отмывания клетки окрашивают в течение 15 мин 0,15% раствором пропидия йодида на физ. растворе, забуференном фосфатом (рН 7,4) и содержащем 0,1% тритона X-100 и 0,1% цитрата натрия.

Пропидий йодид представляет собой флуоресцентный краситель, дающий оранжевую флуоресценцию, что позволяет анализировать результаты его связывания клетками с помощью лазерной проточной цитометрии (при 620 нм). На получаемой при этом гистограмме анализируется содержание клеток в «гиподиплоидном пике», т.е. в той части гистограммы, которая находится левее главного пика, соответствующего диплоидным клеткам. В гиподиплоидном пике находятся клетки, утратившие часть ДНК, т.е. апоптотические.

В случае, если обнаруживается влияние препарата на уровень апоптоза клеток, следует подтвердить этот эффект с помощью более точного метода определения апоптоза — аннексии теста. Его смысл состоит в обнаружении экспрессии на поверхности клеток фосфатидилсерина. Этот липид в жизнеспособных клетках локализуется на внутренней поверхности клеточной мембраны. Уже на ранних этапах развития апоптоза он появляется на поверхности клетки и может быть выявлен с помощью аннексина V, меченного флуорохромом (обычно флуоресцеинизотиоцианатом — ФИТЦ), поскольку аннексин V обладает высоким сродством к фосфатидилсерину. Для разграничения апоптоза и некроза клеток их одновременно обрабатывают пропидия йодидом, который способен проникать только в некротические (но не в апоптотические или нормальные) клетки. Обработке реагентами подвергаются нефиксированные клетки.

К суспензии мононуклеаров (в концентрации 5×10^6 /мл), инкубированных с исследуемым препаратом, добавляют аннексин V, меченный ФИТЦ в концентрации 3 мкг/мл и пропидия йодид в концентрации 50 мкг/мл (оба препарата — «Sigma») на HEPES-буфере, pH 7,2. После инкубации в течение 15 мин клетки подвергаются проточной цитометрии с двуцветным анализом. Клетки, связавшие аннексин V, но не пропидия йодид, рассматриваются как апоптотические. Клетки, связавшие пропидия йодид, но не аннексин, являются некротическими. Клетки, связавшие оба красителя, трактуются как клетки, подвергшиеся апоптозу, а затем — вторичному некрозу. Основным показателем уровня апоптоза является процент клеток, связавших только аннексин V.

1.8. Оценка влияния препарата на синтез цитокинов

Как отмечалось во введении, при оценке влияния препарата следует определить его влияние на систему как провоспалительных (фактор некроза опухолей- α , интерлейкин-1 β , ИЛ-8 и др.), так и противовоспалительных (интерлейкин-10, интерлейкин-4 и др.) цитокинов.

Существуют два подхода для оценки влияния препарата на синтез цитокинов: *in vitro* и *in vivo*.

В первом случае используется культуры мононуклеаров периферической крови здоровых доноров, стимулированных полисахаридом энтеробактерий, для индукции синтеза ТНФа, ИЛ-1 β , ИЛ-6, ИЛ-8 или ФГА (или КонА) для индукции синтеза ИЛ-4, ИЛ-10 и др. Методика культивирования мононуклеаров периферической крови доноров подробно описана в разделе 1.6.

Во втором случае используют мышей, чаще гибридов F1(CBAxС57L). Как выше отмечалось, выбор низшей дозы препарата должен исходить из минимальной терапевтической дозы для человека в перерасчете на грамм веса животного или на площадь тела. Высшая доза препарата должна составлять 1/10 от ЛД₅₀. Препарат вводят подкожно, внутримышечно или внутривенно в зависимости от планируемого способа применения на людях. Материалом для исследования является кровь, полученная из ретроорбитального синуса глаза под легким эфирным наркозом. Сыворотка, полученная из данной крови, может храниться при -70 °С.

Цитокины в сыворотке крови определяют с помощью двуцветного иммуноферментного анализа в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя.

1.9. Оценка влияния препарата на дифференцировку Th1- и Th2-клеток

Необходимость определения влияния фармакологических препаратов на дифференцировку Т-хелперов 1-го и 2-го типов обусловлена тем, что они играют ключевую роль в выборе направления развития иммунных реакций на патогены — соответственно в сторону клеточного или гуморального иммунного ответа. Выявление влияния препарата на соотношение Th1- и Th2-клеток в суспензии стимулированных лимфоцитов может ориентировать испытателя на более целенаправленное определение иммуотропных эффектов данного препарата — его способности благоприятствовать преимущественному развитию гуморальной или клеточной форм иммунного ответа, а также Th1- или Th2-зависимой патологии.

В основе оценки дифференцировки Th1- и Th2-клеток лежит выявление синтеза ими ключевых цитокинов в условиях поликлональной активации в обход антигенраспознающих рецепторов (для этого используют комбинацию форболового эфира и ионофора кальциевых ионов). В качестве ключевых цитокинов Th1- и Th2-клеток обычно рассматривают интерферон γ (IFN γ) и интерлейкин 4 (IL-4), соответственно. Наиболее распространенным приемом выявления синтеза этих цитокинов с указанной целью является определение их присутствия внутри активированных клеток, предварительно обработанных блокаторами внутриклеточного транспорта и секреции белков (например, брэфелдином А), в результате чего синтезированные цитокины остаются внутри клетки.

Мононуклеарные клетки выделяют из периферической крови здоровых доноров обычным методом — центрифугированием (400 g – 30 мин) на слое фиколла-верографина плотностью 1,077 по Воуш. Отмытые клетки из интерфазы суспензируют в среде RPMI-1640, содержащей 2 mM L-глутамин и 10% сыворотки эмбрионов телят, в концентрации 10×10^6 клеток/мл в 96-луночных плоскодонных планшетах. Клетки активируют добавлением форболмирилатацетата («Sigma») в концентрации 10 нг/мл и иономицина («Sigma») в концентрации 2 мкМ в течение 18 ч в ПКС при 37 °С и 5% CO₂. Для того, чтобы блокировать секрецию цитокинов, на весь срок активации в культуру вводят брелфелдин А (препарат GolgiPlug — «Becton Dickinson») в концентрации 1 мкг/мл. Исследуемый фармакологический препарат следует вводить именно на этом этапе постановки реакции. После окончания срока культивирования клетки отмывают и фиксируют 4% раствором параформальдегида («Sigma») при +4 °С в течение 10 мин. Затем клетки пермеабилзируют (т.е. формируют поры в их мембране) путем 20-минутной инкубации при комнатной температуре в 0,1% растворе сапонина («Sigma») на фосфатно-солевом буфере, pH=7,2.

Следующий этап состоит в мечении внутриклеточных цитокинов с помощью моноклональных антител, конъюгированных с флуорохромами. Для этого клетки инкубируют в течение 20 мин при комнатной температуре в растворе моноклональных антител к IFN γ и IL-4. В тех случаях, когда важно выявить присутствие цитокинов в различных или одних и тех же клетках, в одной пробе используют антитела к цитокинам, меченные разными флуорохромами, например, анти-IgG-ФИТЦ (флуоресцеинизотиоцианат, дающий зеленую флуоресценцию) и анти-IL-4-ФЭ (фикоэритрин, дающий более интенсивную оранжевую флуоресценцию). Однако чаще важнее выявить присутствие цитокинов в клетках определенных типов — в Т-лимфоцитах или Т-хелперах. В этих случаях клетки обрабатывают ФЭ-мечеными антителами к IFN γ и IL-4 (в разных пробах) в сочетании с моноклональными антителами к CD3 или CD4, меченными ФИТЦ. Наконец, возможно использование одновременно антител к обоим цитокинам и клеточному маркеру, меченных тремя разными флуорохромами (ФИТЦ, ФЭ и малиновым флуорохромом PerCP). Однако последний подход существенно удорожает тестирование. В работе, как правило, используют моноклональные антитела фирм «Becton Dickinson» или «Caltag».

После окрашивания клетки отмывают от несвязавшихся антител 0,1% раствором сапонина на фосфатно-солевом буфере, содержащем 1% параформальдегида. Анализ образцов осуществляют на лазерном проточном цитометре. Зеленая флуоресценция ФИТЦ измеряется при длине волны 530 нм, оранжевая флуоресценция ФЭ — при длине волны 585 нм. Если цитокинсодержащие клетки определяют в конкретной популяции или субпопуляции, процент клеток, содержащих внутриклеточные цитокины, определяется в соответствующем гейте клеток, несущих этот маркер. Если цитокинсодержащие клетки определяют без выявления мембранных маркеров, их процент подсчитывают на основе анализа гейта лимфоцитов, вычленяемого на основе параметров светорассеяния (мелкие клетки со слабой зернистостью). Результаты определения выражают в процентах — соответственно от числа Т (или CD4⁺T)-клеток или от общего числа мононуклеаров.

1.10. Оценка влияния препарата на функциональную активность естественных киллеров

Естественные киллеры (ЕК) представляют собой большие гранулярные лимфоциты с фенотипом CD3⁺CD16⁺CD56⁺. Они играют важную роль в защите организма от различных внутриклеточных микроорганизмов и от опухолевых клеток. ЕК распознают и убивают клетки-мишени без предварительной их сенсibilизации. Такими клетками-мишенями являются клетки миелобластоидной или лимфобластоидной линий K-562 и MOLT-4 соответственно. Функциональную активность ЕК определяют в цитотоксической реакции по их способности лизировать эти клетки, используя, как правило, радиометрический метод.

Для этого на 2-й день после пересева клетки линии К-562 в концентрации 10^6 /мл инкубируют в течение 1-го часа при 37°C ^3H -уридином в дозе 3 мКи на 1 мл клеточной суспензии и после инкубации трехкратно отмывают от метки в большом избытке среды 199.

Цитотоксическую реакцию ставят в объеме 200 мкл в круглодонных 96-луночных планшетах. Для этого 100 мкл меченых клеток-мишеней и 100 мкл моноклеаров (клетки-эффекторы) периферической крови донора смешивают в соотношении 1:50, 1:25 и 1:10 в триплетах на каждое разведение. Для определения спонтанного выхода метки к клеткам-мишеням добавляют равное количество ПРС. Для определения максимального выхода метки к клеткам-мишеням добавляют равный объем тритона X-100. Для определения влияния препарата на функциональную активность ЕК к смеси клеток-эффекторов и клеток-мишеней добавляют исследуемую дозу препарата, взятую в минимальном объеме (10–20 мкл). Планшеты отправляют на 16–24 ч в CO_2 -инкубатор при 37°C . Далее содержимое клеток переносят с помощью харвестера на стекловолоконистые фильтры (см.3.2.2), промывают, сушат, помещают во флаконы со сцинтилляционной жидкостью и определяют радиоактивность на б-счетчике. Определяют индекс цитотоксичности ИЦ:

$$\text{ИЦ} = \frac{A - B}{C - B} \times 100,$$

где A — радиоактивность клеток-мишеней в присутствии клеток-эффекторов, B — радиоактивность, оставшаяся после обработки клеток-мишеней тритоном X-100 (максимальный выход), C — радиоактивность в клетках-мишеней в отсутствии клеток-эффекторов.

Оценку влияния препарата на функциональную активность ЕК определяют путем сопоставления ИЦ в культурах моноклеаров, инкубированных в присутствии препарата и без него.

2. Оценка проаллергического/противоаллергического и алергизирующего действия лекарственных средств

Целью использования методов, изложенных в настоящем разделе, является установление возможного влияния препаратов на экспериментальные модели аллергии. Вполне вероятно, что новые препараты (в частности, иммуотропные) могут усиливать/потенцировать (или тормозить) аллергические реакции. Если есть основания предполагать такие свойства у нового фармакологического соединения (препарата), то используются методы из числа приведенных ниже. Подбор рекомендуемых методов осуществлен таким образом, чтобы составить впечатление о действии препарата на интегральные модели аллергического ответа или на составляющие его звенья. В случае выявления тормозящего действия препарата на аллергический ответ этот препарат может рассматриваться как потенциальное противоаллергическое средство. В отдельном подразделе описаны подходы, используемые для суждения о наличии алергизирующих (сенсibilизирующих) свойств у исследуемого препарата.

2.1. Оценка проаллергического/противоаллергического действия

2.1.1. Системная анафилаксия (анафилактический шок)

Для получения активного анафилактического шока морских свинок предварительно сенсibilизируют подкожно каким-либо чужеродным белком. Наиболее доступным является использование с этой целью нормальной лошадиной сыворотки. Однократное подкожное введение 0,1 мл сыворотки обеспечивает высокий уровень сенсibilизации. Для получения анафилактического шока на 14–21-й день после первичной инъекции белка свинкам 2-х групп внутрисердечно или внутривенно вводят 0,1–0,5 мл лошадиной сыворотки (разрешающая инъекция). Доза антигена подбирается опытным путем. Реакция обычно наступает через 1–2 мин. Оценка реакции проводится по четырехплюсной схеме.

+ — кратковременное почесывание носа, взъерошивание шерсти, падение температуры тела (не менее, чем на 1°C),
++ — четко выраженные частые почесывания, единичные чихания, падение температуры тела,
+++ — спастический кашель, боковое положение животного, отделение кала и мочи,
++++ — спазм дыхательных путей, конвульсивные прыжки, судороги. Животное погибает (как правило, на 5-й мин).

2.1.2. Продукция аллерген-специфических IgE и IgG антител *in vivo*

Наиболее подходящим и доступным объектом являются мыши (СВАхС57BL)F1 массой 18–20 г. В качестве антигена используют не менее, чем трижды перекристаллизованный овалбумин куриных яиц.

В зависимости от целей, определяемых характером используемого фармакологического препарата, сенсibilизацию мышей осуществляют в одном из трех режимов, обеспечивающих преимущественную продукцию IgE антител, продукцию IgE и IgG (IgG1) антител или максимальный IgE- и IgG-ответы.

Для первого режима доза овалбумина составляет 0,5 мкг/мышь. Для второго — 10 мкг/мышь. Для третьего — 100 мкг/мышь. При использовании первого режима IgE-ответ может быть зарегистрирован лишь после реиммунизации. После третьей инъекции титры IgE антител возрастают, превышая титры появляющихся к этому времени IgG1 антител. Сенсibilизирующие дозы овалбумина 10 мкг/мышь и 100 мкг/мышь позволяют получить IgE ответ уже после первой сенсibilизирующей инъекции. При использовании дозы овалбумина 100 мкг/мышь в ответ на реиммунизирующие инъекции увеличение титров IgG1 антител сопровождается заметным уменьшением титров IgE антител.

Сенсibilизацию мышей проводят повторными инъекциями овалбумина с интервалом в 4 нед. (допустимо сокращение интервалов до 3 нед.). Овалбумин вводят внутривентриально с 0,5 мг Al(OH)₃ (при дозе овалбумина 0,5 мкг/мышь и 10 мкг/мышь) или с 5 мг Al(OH)₃ (при дозе овалбумина 100 мкг/мышь) в 0,5 мл физиологического раствора. В серии исследований используют не менее 5 мышей. Кровь для оценки кинетики образования антител получают в определенные сроки сенсibilизации из ретроорбитального синуса. Титры IgE антител определяют на нелинейных крысах-самцах в реакции пассивной кожной анафилаксии (см. раздел 2.1.3). Титры IgG1 антител определяют в реакции пассивной кожной анафилаксии (ПКА) на нелинейных мышях или иммуноферментным методом. Для воспроизведения ПКА сыворотку крови иммунизированных мышей в необходимых разведениях вводят в объеме 30 мкл внутривенно в область спины. На мышях оптимальным является использование лишь 6 точек введения сыворотки крови. Разрешающую дозу овалбумина (0,5 мг в 0,2 мл 0,5% раствора синего Эванса, «Serva») вводят мышам в хвостовую вену через 2 ч после внутривенного введения сыворотки. В остальном процедура проводится так же, как и при постановке реакции ПКА на крысах.

2.1.3. Пассивная кожная анафилаксия (ПКА)

Наиболее распространенным и доступным приемом воспроизведения реакции этого типа является ПКА крыс (по Z.Ovary), кожа которых пассивно сенсibilизирована сывороткой крови активно сенсibilизированных мышей, содержащей аллерген-специфический IgE.

Для исследований используют нелинейных крыс-самцов массой 180–250 г. Животным под эфирным наркозом строго внутривенно в область живота вводят микрошприцом по 30 мкл физиологического раствора и по 30 мкл последовательных двукратных разведений (начиная с разведения 1:4) пула сывороток мышей, содержащего аллерген-специфический (антиовальбуминовый) IgE. Разрешающую инъекцию овалбумина делают крысам в хвостовую вену через 24 ч после пассивной сенсibilизации кожи. Анти-

ген вводят под поверхностным эфирным наркозом из расчета 100 мкг овальбумина на 100 г массы тела в 1 мл 0,5% раствора синего Эванса («Serva») на физиологическом растворе. Интенсивность ПКА оценивают через 30 мин по прокрашиванию участков кожи, для чего животных подвергают этаназии под эфирным наркозом перерезкой сонных артерий, кожу отсепааровывают и выраженность реакции определяют по площади прокрашенного участка, измеряемой на внутренней поверхности кожи.

2.1.4. Анафилаксия изолированных органов

В качестве моделей анафилаксии изолированных органов может быть использована пассивная и активная анафилаксия изолированных гладкомышечных органов экспериментальных животных и человека. Анафилактическую реакцию в этом случае оценивают по сократительному эффекту в условиях изометрической регистрации напряжения мышц с соблюдением контроля сократительной реакции на действие подходящего для данного объекта медиатора (гистамина, ацетилхолина, цистеиновых лейкотриенов и пр.). Анафилаксия изолированных органов может быть также оценена на модели активной или пассивной анафилактической реакции изолированной легочной ткани животных или человека, характеризуемой по вызванному антигеном высвобождению из нее предсуществующих или вновь образуемых медиаторов аллергии (гистамина, триптазы, цистеиновых лейкотриенов, фактора, активирующего тромбоциты).

Наиболее доступным объектом является активная анафилаксия изолированных гладкомышечных органов морской свинки. Предпочтение в этом случае отдается изолированным препаратам подвздошной кишки, так как можно получить достаточно большое число отрезков кишечника для проведения сравнительных исследований в одном исследовании на нескольких образцах гладкомышечного органа одного и того же животного.

Морских свинок сенсибилизируют так же, как описано в разделе 2.1.1 или не менее чем трижды перекристаллизованным овальбумином. Овальбумин вводят трехкратно через день в виде смеси, состоящей из 0,25 мл физиологического раствора, содержащего 5 мг овальбумина, и 0,25 мл полного адьюванта Фрейнда. Первую инъекцию проводят подкожно в область задней конечности, две последующие — внутримышечно в область бедра. Исследования проводят через 3–4 нед. после последней сенсибилизирующей инъекции. Описанный способ подготовки животных дает 100% сенсибилизацию животных и их гладкомышечных органов.

Для подготовки отрезков кишечника животных под эфирным наркозом подвергают этаназии кровопусканием из сонных артерий. Затем вскрывают брюшную полость, обнажают подвздошную кишку, которую отсекают вблизи илеоцекального угла. Подвздошную кишку освобождают от брыжейки и вырезают отрезки длиной около 5–6 см, которые промывают при помощи использования шприца жидкостью Кребса при комнатной температуре. Из промытых отрезков получают более короткие — 1,5–2 см, которые прошивают с обоих концов шелковыми нитками. До момента использования отрезков в исследовании их сохраняют в жидкости Кребса при температуре 4 °С. Интервал времени между взятием отрезков кишечника и изучением их в исследовании может составить до 8 ч (контролируемый интервал). Испытуемый отрезок помещают в ванночку для изолированных органов (наиболее удобный объем — 20 мл), укрепляя один конец на полой стеклянной крючке, через который поступает в ванночку кислород. Второй конец прикрепляют к датчику для регистрации напряжения мышцы. Исследования проводят в условиях постоянной перфузии органа жидкостью Кребса со скоростью около 2 мл/мин с обеспечением возможности переключения перфузии на жидкость, содержащую испытуемые препараты.

2.1.5. Анафилактическая секреция гистамина из тучных клеток животных и базофилов человека in vitro

Принцип метода определения высвобождения гистамина из тучных клеток крыс и мышей состоит в том, что смешанную клеточную взвесь, полученную из брюшной и плевральной

ной полостей, или выделенные из нее тучные клетки инкубируют в присутствии испытуемого агента при определенной температуре (если не изучается зависимость эффекта от температуры, то температурный режим соответствует 37 °С) и времени инкубации. Клетки осаждают центрифугированием, надосадочную жидкость отделяют, а клетки лизируют добавлением к ним дистиллированной воды. Затем отдельно определяют флуориметрическим методом содержание гистамина в осадочных и надосадочных порциях. Поскольку высвобожденный гистамин находится в несвязанном состоянии и в лизатах клеток отсутствуют компоненты, вмешивающиеся в реакцию определения гистамина, то не требуются предварительные этапы экстракции и очистки гистамина. Высвобождение гистамина выражают в процентах к его общему содержанию в каждой порции клеток.

Принцип метода определения высвобождения гистамина из базофилов периферической крови человека состоит в том, что обогащенную базофилами (до 2–4%) взвесь лейкоцитов периферической крови человека инкубируют в присутствии испытуемого агента при определенной температуре и продолжительности инкубации. Клетки осаждают центрифугированием, надосадочную жидкость отбрасывают, а в осадках клеток определяют остаточный гистамин микрофлуориметрическим методом. Освобождение от примеси эритроцитов позволяет исключить многоэтапные процедуры экстракции и очистки гистамина. Микроспектрофлуориметрический вариант метода определения гистамина имеет высокую чувствительность, достаточную для определения гистамина в базофилах. Необходимость использования такого варианта связана с низким содержанием гистамина в базофилах (до 2 мкг на 1 миллион базофилов). Однако микроспектрофлуориметрический вариант не позволяет определить очень низкие концентрации гистамина в надосадочных жидкостях, содержащих белок. Поэтому уровень высвобождения гистамина оценивают сравнением образцов, содержащих испытуемый агент, с контрольными образцами клеток.

В специальных предварительных исследованиях изучают возможность вмешательства изучаемого фармакологического средства в реакцию определения гистамина, проводят пробы на параллельность калибровочных кривых.

Подробности методов определения секреции гистамина из тучных клеток и базофилов, составы используемых растворов и условия проведения реакции определения гистамина описаны в соответствующих методических указаниях (см. список рекомендуемой литературы).

Выбор из числа приведенных методов тех, которые необходимы для изучения предполагаемого противоаллергического или проаллергического действия конкретного препарата, определяется его физико-химическими, фармакологическими и фармакокинетическими свойствами. Этим же определяется выбор предела используемых концентраций изучаемого препарата, режима и способов его введения в организм или исследования в условиях *in vitro*.

2.2. Оценка алергизирующего (сенсibiliзирующего) действия препаратов

2.2.1. Оценка анафилактической активности

Морским свинкам вводят исследуемый препарат по следующей схеме: сенсibiliзирующие инъекции — первая инъекция подкожно, две последующие внутримышечно через день в область бедра. Разрешающая инъекция — внутрисердечно на 14–21-й день после сенсibiliзирующей инъекции. Доза — ориентировочно та, которая предполагается для получения основного фармакологического действия при однократном использовании. Расчет интенсивности анафилактического шока — в индексах по Weigle.

2.2.2. Активная кожная анафилаксия

На морских свинках. Сенсibiliзация та же, что и в п.2.2.1. Разрешающее ведение — в двукратных разведениях препарата внутрикожно. Внутривенно — введение 0,5 мл 1%

раствора синего Эванса. Учет реакции проводят через 20–30 мин после внутрикожного введения препарата путем регистрации окрашенного пятна в месте введения испытываемого препарата.

На мышцах. Сенсibilизация — 1 раз в 4 нед., всего 4 инъекции. Разрешающее ведение — через 1 нед. после последней сенсibilизирующей инъекции в двукратных разведениях препарата внутрикожно в объеме 0,03 мл. Внутривенно — введение 0,5 мл 1% раствора синего Эванса. Учет реакции проводят через 20–30 мин после внутрикожного введения препарата.

3. Оценка иммуотропного действия

лекарственных средств, не являющихся иммуномодуляторами

Для ЛП, которые сами по себе не являются иммуномодуляторами, предусмотрен ограниченный перечень методов, позволяющий установить их возможное действие на иммунную систему:

1. Изучение влияния препарата на фагоцитарную активность (см. раздел 1.3. «Оценка влияния препарата на фагоцитоз»).

2. Изучение влияния препарата на антителообразование (см. раздел 1.4. «Оценка влияния препарата на гуморальный иммунный ответ»).

3. Изучение влияния препарата на Т-клеточный иммунный ответ (см. раздел 1.5. «Оценка влияния препарата на клеточный иммунный ответ»).

4. Оценка аллергенного действия (см. разделы 2.2.1. «Оценка анафилактической активности» и 2.2.2. «Активная кожная анафилаксия»).

5. Влияние на продукцию IgE антител (см. раздел 2.1.2. «Продукция аллерген-специфических антител»).

Рекомендуется все новые ЛС изучать с помощью указанных методик на иммуотропную активность.

Заключение

Применение данных методических рекомендаций при поиске и отборе новых фармакологических веществ, обладающих иммуотропной активностью, позволяет при проведении доклинических исследований объективно оценить их специфическое фармакологическое действие с целью решения вопроса о целесообразности и возможности проведения КИ.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Гуцин И.С. Анафилаксия гладкой и сердечной мускулатуры. — М., Медицина, 1973. — 176 с.
2. Гуцин И.С. Аллергическое воспаление и его фармакологический контроль. — М.: Фармарус-Принт, 1998. — 250 с.
3. Гуцин И.С., Зебрев А.И., Богуш Н.Л. и соавт. Экспериментальная модель для разработки и оценки способов контроля немедленной аллергии. — Патол. физиол., 1986. — № 4. — С. 18–23.
4. Гуцин И.С., Зебрев А.И., Читаева В.Г., Войтенко В.Г. Оценка функции клеток-мишеней аллергии. Методические рекомендации. Минздрав СССР. — М., 1987. — 24 с.
5. Мазуров Д.В., Дамбаева С.В., Пинегин Б.В. Оценка внутриклеточного киллинга стафилококка фагоцитами периферической крови с помощью проточной цитометрии // Иммунология, 2000. — № 2. — С. 57–59.
6. Петров Р.В., Лопухин Ю.М., Чередеев А.Н. и др. Оценка иммунного статуса человека. Методические рекомендации. — М., 1984.

7. Петров Р.В., Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. и др. Оценка иммунного статуса при массовых обследованиях. Методические рекомендации. — Иммунология, 1992. — № 6. — С. 51–62.
8. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В., Истамов Х.И. Экологическая иммунология. — М.: Изд. «ВНИРО», 1996.
9. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы и некоторые аспекты их клинического применения. Клиническая иммунология. — 1996. — № 8. — С. 7–12.
10. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Основные принципы иммуномодулирующей терапии. В кн. Иммунокоррекция в педиатрии. — М.: Изд. «Медицина для всех», 2001. — Изд. 2. — С. 6–18.
11. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Механизм действия и клиническое применение иммуномодуляторов. Аллергия, астма и клиническая иммунология. — 2003. — Том 7, № 8. — С. 43–49.
12. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. Иммуномодуляторы: механизм действия и клиническое применение. В кн: «Дни иммунологии и аллергологии в Самаре» / под редакцией Р.М. Хаитова. — Самара, 2004. — 53–54.
13. Хаитов Р.М., Пинегин Б.В. в соавт с Кукесом В.Г., Андреевым Д.А., Архиповым В.В., Блинковым И.Л., Верткиным А.Л. и др. Клиническая фармакология: Учебник. — М.: Издательский дом «ГЭОТАР-МЕД», 2004. — 935 с.

ГЛАВА 39

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВООПУХОЛЕВОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: д. м. н., проф. Е.М. Трещалина; к. б. н. О.С. Жукова;
д. м. н., проф. Г.К. Герасимова; к. м. н. Н.В. Андропова; д. м. н., проф. А.М. Гарин

Введение

Несмотря на существование в клинической практике более 100 противоопухолевых препаратов [10], эффективность большинства из них недостаточна и спектр онкологических заболеваний, чувствительных к химиотерапии, ограничен. Поэтому остается актуальным вопрос о разработке новых, более активных препаратов, а также поиск веществ, эффективных при опухолях с первичной и приобретенной резистентностью к лекарственной терапии. В связи с этим решение о продвижении нового вещества с противоопухолевой активностью на КИ принимается на основании одного из следующих критериев:

- новый механизм действия;
- избирательная цитотоксичность в отношении определенных культур опухолевых клеток *in vitro* и ксенографтов опухолей человека;
- высокая противоопухолевая активность *in vivo*;
- способность преодолевать лекарственную устойчивость;
- отсутствие перекрестной устойчивости с известными веществами.

В настоящее время общепринята методика определения противоопухолевого действия, ориентированная на оценку скорости роста опухоли. В этом случае в качестве модели используются перевиваемые *in vivo* опухолевые системы с генерализованным и солидным характером роста. При этом эксперименты на сверхчувствительных (высокоиммунногенных) опухолях не дают возможности адекватно оценить эффективность вещества. Поэтому на всех этапах разработки противоопухолевых препаратов ведущую роль должны играть неиммунногенные и высокометастазирующие опухолевые модели или опухоли с приобретенной резистентностью к химиотерапии, что обеспечивает их достаточную прогностическую ценность. Большое значение также придается данным, полученным на моделях, свойства которых наиболее приближены к свойствам отдельных опухолей человека — на клеточных линиях или на ксенографтах (гетеротрансплантатах) опухолей человека, растущих у иммунодефицитных мышей и обладающих различными биологическими и биохимическими свойствами, в том числе лекарственной устойчивостью.

В последние годы в результате интенсивного развития молекулярной биологии и генетики выявлены новые молекулярные мишени для противоопухолевой химиотерапии, в том числе специфичные для опухолевой клетки. В результате стало возможным создавать противоопухолевые препараты, направленные на специфичные для данного вида опухолей молекулярные мишени («таргетная» или адресная терапия).

Для выявления и изучения веществ «таргетного» механизма действия необходимо использовать опухолевые модели (культуры клеток, опухоли мышей и/или человека) с высокой экспрессией мишеней, на которые направлено действие препарата.

Особое место в онкологии занимает эксудативный опухолевый плеврит метастатической природы (ОП), частота развития которого при лимфомах и солидных опухолях

достигает 45%, а при мезотелиоме плевры имеет первичную природу и встречается у большинства больных. Обычный способ применения химиотерапии недостаточно результативен [3, 13]. Современные подходы к терапии ОП ориентированы на использование полихимиотерапии и плевросклерозирующих средств (ПСС). Недостатком внутриплевральной терапии ОП с применением ПСС является невысокая эффективность, недостаточное склерозирование плевральной полости и сильная болевая реакция [1]. Вследствие этого поиск новых ПСС актуален, поэтому требования к их доклинической оценке включены в настоящие методические рекомендации.

Данные Рекомендации не касаются изучения веществ, предназначенных для лечения гормонозависимых опухолей, а также антиметастатических средств, при разработке которых следует руководствоваться специальными методическими указаниями [8]. Также не следует применять данные Рекомендации для выявления и изучения препаратов сопровождения различных видов противоопухолевой терапии, направленных на оптимизацию лечения (снижение опухолевой интоксикации или уменьшение побочных эффектов терапии): 1) модификаторов биологических реакций (МБР), 2) симптоматических средств. Для препаратов сопровождения изучение на моделях опухолевого роста направлено на выявление опасности уменьшения эффективности специфических противоопухолевых средств и стимуляции роста новообразований или диссеминации процесса. Выяснение характера модифицирующего действия препаратов сопровождения следует выполнять по специально разработанным программам, руководствуясь конкретным объектом и механизмом модификации и рекомендуемой терапевтической схемой его применения у онкологического пациента. Для влияния на опухолевый рост следует использовать высокоинформативные и краткосрочные тесты (например, панели опухолевых штаммов для МБР природного происхождения) [6].

При выполнении доклинических исследований необходимым требованием является качество тестируемого агента, удовлетворяющее соответствующим требованиям [5].

1. Изучение специфической противоопухолевой активности *in vivo*

Для КИ могут быть предложены оригинальные вещества новых классов, аналоги известных ЛС и воспроизведенные (*generic*) вещества. В зависимости от этого различаются требования, предъявляемые к таким препаратам при передаче их на клиническое изучение, критерии оценки эффективности и методы изучения.

1.1. Оригинальные вещества нового класса

Критерии эффективности

Соединение нового класса, рекомендуемое для клинического изучения, должно соответствовать одному или более из следующих критериев эффективности:

- торможение роста хотя бы одной солидной опухоли из обязательного к изучению спектра на 90% и более, сохраняющееся не менее 7 сут после отмены вещества;
- торможение роста не менее трех солидных опухолей или подкожно перевитых лейкозов, упомянутых в обязательном перечне, на 70% и более с сохранением значимого эффекта не менее 7 сут;
- увеличение продолжительности жизни животных с лейкозом на 75% и более;
- продолжительности жизни животных с солидной опухолью на 50% и более;
- полная ремиссия у 50% животных (отсутствие признаков опухоли/лейкоза в течение 60 дней);
- излечение 50% животных (отсутствие признаков опухоли/лейкоза в течение 90 дней);
- высокая избирательная цитотоксичность *in vitro*;
- новый, ранее неизвестный механизм действия (при наличии существенной противоопухолевой активности).

Обязательные исследования:

- изучение спектра противоопухолевой активности, включая ксенографты опухолей человека;
- определение диапазона терапевтических доз с доказательством наличия избирательности терапевтического действия (терапевтический индекс);
- изучение действия на развившуюся опухоль;
- выбор оптимального пути введения в организм;
- выбор оптимальной схемы применения;
- сравнительное изучение эффективности субстанции и лекарственной формы;
- изучение механизма противоопухолевого действия, ориентированного на определенные клеточные мишени.

Дополнительные исследования:

- изучение эффективности в комбинации с известными противоопухолевыми препаратами;
- изучение действия на опухоль с приобретенной лекарственной резистентностью;
- изучение способности ингибировать процесс метастазирования злокачественных опухолей (см. соответствующие Рекомендации [8, 11]);
- изучение элементов фармакокинетики на животных с опухолью.

1.2. Аналоги известных противоопухолевых препаратов

Помимо создания препаратов с ранее неизвестной структурой или механизмом действия, перспективной задачей является поиск новых вариантов соединений, уже применяемых в химиотерапии опухолей.

В данном случае необходимо показать существенные преимущества предлагаемого на КИ аналога перед лучшими, наиболее близкими по структуре препаратами того же класса, доказательством чего должно быть наличие хотя бы одного из следующих признаков:

- увеличение эффективности не менее чем в 2 раза по любому из критериев;
- появление более значимого эффекта, например, излечение всех животных при применении препарата хотя бы в одной дозе;
- отсутствие или снижение токсических эффектов, наблюдаемых у препаратов сравнения (например, гематотоксичности, нефротоксичности, кардиотоксичности, желудочно-кишечной токсичности, аллопеции и пр.);
- существенный антиметастатический эффект при отсутствии такового у препарата сравнения или увеличение антиметастатического эффекта не менее чем в 2 раза;
- возможность использования более удобных и/или безопасных путей введения препарата;
- существенные отличия в спектре противоопухолевой активности, в том числе в отношении опухолей, резистентных к препарату сравнения;
- отличия в механизме действия и/или фармакокинетики.

Обязательные исследования

Все исследования проводятся параллельно с препаратом сравнения (прототипом), который должен быть лучшим из данного класса, в следующем объеме:

- изучение спектра противоопухолевой активности, включая ксенографты опухолей человека;
- изучение противоопухолевой активности на любых резистентных к прототипу опухолях или культурах клеток;
- определение диапазона терапевтических доз и схемы применения;
- изучение иного пути введения (при наличии показаний) на любой чувствительной к прототипу модели;
- сравнительное изучение антиметастатической активности (при наличии показаний);
- сравнительное изучение токсичности (при наличии преимуществ перед прототипом);

- сравнительное изучение эффективности и токсичности субстанции и лекарственной формы (проводится без прототипа);
- доказательства иного механизма действия, если это является основанием для передачи вещества на КИ;
- сравнительное изучение элементов фармакокинетики (особенно для препаратов пролонгированного действия или иммобилизованных на носителе, а также для пролекарств («*prodrugs*»), проходящих обязательную активацию в организме).

Дополнительные исследования:

- изучение эффективности в комбинации с известными противоопухолевыми препаратами.

1.3. Воспроизведенные зарубежные препараты

В результате экспериментального изучения воспроизведенного препарата должны быть получены данные, подтверждающие его идентичность с воспроизводимым по противоопухолевому и другим биологическим эффектам. При сравнительном изучении в качестве объекта сравнения предпочтительно берется препарат, выпущенный фирмой-создателем, а при недоступности последнего — один из известных препаратов, зарегистрированный в РФ и применяемый в клинике.

Обязательные исследования:

- изучение противоопухолевой активности на 1–2 наиболее чувствительных к прототипу опухолях;
- подтверждение диапазона терапевтических доз и схемы применения;
- сравнительное изучение эффективности субстанции и лекарственной формы (если создана новая лекарственная форма, исследование проводится по рекомендуемому для аналогов плану);
- доказательство идентичности фармакокинетических параметров.

2. Модели и методы *in vivo*

2.1. Изучение спектра противоопухолевой активности

2.1.1. Для препаратов, ориентированных на применение при гемобластозах

В исследованиях используются 2–20 генерации перевиваемых лейкозов [8, 11]. Путь введения вещества и путь прививки опухоли не должны совпадать. Для изучения спектра противоопухолевой активности используют не менее двух терапевтических доз вещества, при этом уменьшение массы тела животных должно быть $\leq 20\%$. Исследование проводится с субстанцией или лекарственной формой вещества, рекомендованной для доклинического изучения.

Перевиваемые лейкозы мышей

Обязательные:

— *Лимфолейкоз P388*. Прививается внутрибрюшинно, внутривенно или подкожно суспензией клеток, полученных из асцита, в разведении питательной средой. Прививочная доза 10^6 клеток. Штамм поддерживается на мышах линии DBA₂. Для исследования используются мыши линии DBA₂ или гибриды BDF₁ [DBA₂ × C₅₇BL/6j] обоего пола с массой тела 18–20 г (масса тела во всех случаях одинакова).

— *Лимфолейкоз L1210*. Прививается внутрибрюшинно, внутривенно или подкожно суспензией клеток, полученных из асцита, в разведении питательной средой. Прививочная доза 10^5 клеток. Штамм поддерживается на мышах DBA₂. Для исследования используются мыши линии DBA₂ или гибриды BDF₁ обоего пола.

Дополнительные:

— *Опухолевый плеврит лимфолейкоза P388 (ОП/P388)* [9]. Штамм поддерживается на мышах DBA₂. Для исследования используются мыши линии DBA₂ или гибриды

BDF₁ обоего пола. Лейкоз прививают суспензией асцитных клеток в разведении питательной средой, прививочная доза — $5 \times 10^5 - 1 \times 10^6$ кл./мышь в объеме 0,2–0,3 мл. Мышь фиксируют, кожу в области грудной клетки справа обрабатывают спиртовым раствором йода. По правой средней аксиллярной линии на 1 см выше края реберной дуги делают кожный разрез 1,0 см и обнажают операционное поле. На иглу на расстоянии 1,5–2 мм от среза надевают ограничитель для предотвращения перфорации легкого. Иглу вводят в межреберье в точке пересечения средней аксиллярной линии и границы нижнего края легкого на выдохе и быстро производят инъекцию. Модель используют для веществ, предназначенных для лечения опухолевых плевритов.

— *Лимфаденоз Фишера L5178Y*. Перевивается внутрибрюшинно суспензией клеток из асцита, в разведении питательной средой. Прививочная доза 106 клеток. Штамм поддерживается на мышах DBA2. Для исследования используются мыши линии DBA2 или гибриды BDF1 обоего пола. Начало лечения через 24 ч после прививки. Модель используют в основном при изучении аналогов L-аспарагиназы (иммобилизованные формы и пр.).

2.1.2. Для препаратов (цитостатиков),

ориентированных на применение в клинике солидных новообразований

Обязательные:

Культуры клеток опухолей человека. Адаптированные к росту *in vivo* и дающие подкожные ксенографты у иммунодефицитных мышей [8, 11, 12].

Подкожные ксенографты опухолей человека. Перевиваемые опухоли прививаются подкожно, прививочная доза соответственно Протоколу. Для уменьшения прививочной дозы клеток используются носители (Матригель и т.п). Начало лечения соответственно расчетной массе опухоли или задаче эксперимента. Наблюдение за мышами в течение 21–30 дней после окончания лечения. В исследовании используется 2 генерация перевиваемой опухоли на иммунодефицитных мышах (*nude*, *SCID*). В отдельных случаях используется внутривенная или внутрибрюшинная трансплантация. При подкожной трансплантации лечение начинают в разные сроки, определяя по диаметру опухоли ее массу: при массе 34 мг лечение считается ранним, при массе 68 мг лечение считается поздним или отсроченным. При других путях трансплантации возможно лечение в иные сроки. Возможно использование развившихся опухолей больших размеров, но следует учитывать их существенное меньшую лекарственную чувствительность.

Для исследований можно использовать штаммы опухолей из различных коллекций и хранений [7, 11], в том числе штаммы, находящиеся на хранении в Банках ведущих онкологических учреждений страны, например в ГУ РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. Наиболее прогностически значимы результаты, полученные на ксенографтах рака легкого A-549, Lung H125, рака толстой кишки Colon 116 и рака предстательной железы Ln/Car. При ортотопической трансплантации Colon 116 в стенку толстой кишки мыши существует высокая корреляция с чувствительностью рака толстой кишки человека [12, 13].

Путь введения вещества и путь прививки опухоли не должны совпадать. Для изучения спектра противоопухолевой активности используют не менее двух терапевтических доз вещества, при этом уменьшение массы тела животных должно быть <10%. Исследование проводится с лекарственной формой вещества, рекомендованной для доклинического изучения. Оценка эффективности проводят только по динамике размеров опухолевых узлов, продолжительность жизни иммунодефицитных мышей не входит в число критериев эффективности из-за непрогнозируемой гибели животных от неспецифических инфекционных причин. В этой связи следует также исходно увеличивать численность получающих вещество групп на 25–30%.

Меланома B16. Неиммуногенная, метастазирует в легкие. Прививается подкожно или внутрибрюшинно взвесью опухолевых клеток по 30–60 мг в 0,3–0,5 мл питательной среды на мышь. Штамм поддерживается на мышах C₅₇BL/6j. Для исследования использу-

ются мыши $C_{57}BL/6j$ и гибриды BDF_1 или F_1 [$CBA \times C_{57}BL/6j$] обоего пола. Для оценки эффекта используются специальные Рекомендации [8].

Эпидермоидная карцинома легкого Lewis (LLC, 3LL). Неиммуногенная, метастазирует в легкие. Прививается подкожно взвесью опухолевых клеток по 30–60 мг в 0,3–0,5 мл питательной среды на мышь. Штамм поддерживается на мышах-самцах $C_{57}BL/6j$. Для исследования используются мыши-самцы $C_{57}BL/6j$ и гибриды BDF_1 или F_1 . Для оценки эффекта используются специальные рекомендации.

Дополнительные

Рак шейки матки P3M5. (плоскоклеточный ороговевающий, метастазирует лимфогенно). Прививается подкожно взвесью опухолевых клеток по 30–60 мг в 0,3–0,5 мл питательной среды на мышь. Штамм поддерживается на мышах CBA. Для исследования используются мыши линии CBA обоего пола.

2.1.3. Для «таргетных» препаратов

Для изучения таргетных агентов используется опухолевый материал с высокой экспрессией маркера. Например, рак молочной железы человека *BT-474* PЭ⁺ и *SKBR3* PЭ⁻ или рак яичников *SKOV3* PЭ⁻ с высокой экспрессией *Her-2/neu*, рака предстательной железы *PC-3* ПСА⁺, в том числе с высокой экспрессией *NF/Kb*, *LNCap* ПСА⁺, эритробластоз *K562* с экспрессией *bcr/abl*, различные варианты меланомы с высокой экспрессией *VEGF* и других маркеров неангиогенеза пр. Эксперименты выполняются в системах *in vitro* и/или *in vivo*:

- Клеточные линии опухолей человека;
- Перевиваемые опухоли человека у иммунодефицитных мышей;
- Перевиваемые опухоли обычных инбредных мышей.

Оценка эффекта проводится по стандартным критериям, описанным в соответствующих разделах.

Условия проведения экспериментов

Лейкозы, привитые внутрибрюшинно, внутривенно или подкожно.

Начало лечения — через 24 ч после прививки. Наблюдение за мышами до гибели. Оценка эффективности терапии по увеличению продолжительности жизни, числу полных ремиссий или излечению.

Солидные опухоли, привитые внутрибрюшинно, внутривенно или подкожно.

Начало лечения через 48 ч после прививки или после достижения искомого размера опухоли. Наблюдение за мышами в течение 21–30 дней для оценки эффекта по торможению роста опухоли. Наблюдение только за изогенными мышами до гибели для оценки эффекта по увеличению продолжительности жизни, числу полных ремиссий и излечению. Для препаратов с опосредованным (цитостатическим) действием целесообразно определять скорость роста опухоли по соотношению размеров растущего узла к исходному отдельно в каждой группе мышей.

2.2. Современные доклинические критерии для противоопухолевых агентов, направленных на лечение солидных опухолей человека [11]

Таблица 1

Параметры доклинической оценки

Избирательная цитотоксичность	Лейкозы L1210, P388 нормальные клетки. Критерий — индекс цитотоксичности, определенный при широком диапазоне концентраций (желательно 6–7 порядков)
Активность против одной или более опухолей, Т/С < 42%	Мыши <i>nude</i> или <i>SCID</i> , билатеральная трансплантация фрагментами по 30–60 мг опухоли; Лечение в/в (водорастворимые), р/о (нерастворимые); Панель опухолей: <i>Lung H125</i> , <i>Colon 116</i> , <i>Prostata LNCap</i>

<p>Нетоксичный дозовый уровень</p>	<p>Отсутствие снижения или уменьшение <20% массы тела животного при ЛД₁₀ тестируемого агента. Агент должен убивать не менее 2,0 log₁₀ опухолевых клеток на 2-х опухолевых моделях при одном курсе введения (≤10 дней). Агент испытывается при разных путях введения на неиммуногенной опухолевой модели, что необходимо для преодоления разных физиологических барьеров. Для выявления возможного иммуномодулирующего действия агента проводят повторную трансплантацию фрагмента 60 мг чувствительной к нему опухоли. При отсутствии иммуногенности опухоль растет без изменения времени удвоения Td или не отвечает на ИЛ-2. Панель из 5-ти опухолей, в том числе с МЛУ: чувствительные <i>Colon38</i> и <i>51</i>, РМЖ-16/С, аденокарцинома протока поджелудочной железы-02 и 03, МЛУ-опухоль молочной железы 16/С-Adg (не р-гликопротеиновый механизм), 17/Adg (с р-гликопротеином), а также другие опухоли: недифференцированный <i>Colon-26</i>, меланома <i>B16</i>, аденокарцинома кишечника 09. Методы оценки эффекта подтверждаются гибелью опухолевых клеток.</p>
<p>Определение максимальной терапевтической дозы</p>	<p>Изучение эффективности при двух уровнях нетоксичных доз (ранг 0,62) на 3-х опухолевых моделях при разных путях введения, критерий эффективности Т/С<42%, построение кривой доза–эффект (исключение агентов, эффективных только в МПД).</p>
<p>Изучение отсроченной токсичности на мышях без опухоли</p>	<p>В случае отсутствия гибели в течение 15 дней после введения МПД наблюдение продолжается в течение 30–150 дней (максимальное время восстановления функций). В течение 12-ти дней должна восстановиться масса тела мышей без дальнейшей потери массы и уменьшения размеров скелета.</p>
<p>Выбор оптимальной структуры среди аналогов (если их не менее 3–4)</p>	<p>Для водорастворимых агентов достаточно 3 варианта структуры; если водонерастворимый агент активен при р/о введении, желательно получить растворимый в воде аналог, т.к. для него существует меньше физиологических барьеров и лучше терапевтический индекс; Неактивные нерастворимые агенты можно испытать повторно, если возможно повысить биодоступность любым современным способом.</p>
<p>Хорошая устойчивость тестируемого вещества в растворе</p>	<p>В растворе в течение 30 мин может распадаться не более половины вещества; чем больше устойчивость, тем лучше.</p>
<p>Максимальная терапевтическая доза не должна превышать 1100 мг/кг. Агент должен быть доступен по стоимости и в необходимом количестве</p>	<p>Доступность и достаточность вещества — необходимое условие успешного изучения.</p>
<p>Агент должен быть патентоспособен</p>	<p>Организация, которая берет на себя финансирование всех или части исследований, должна иметь возможность создавать коммерческий продукт и компенсировать затраты.</p>

2.3. Выбор оптимального пути введения в организм

Исследование проводится на высокочувствительной к изучаемому веществу опухолевой модели. Оптимальным считается путь введения, при котором достигается наибольшая эффективность по всем критериям эффективности.

Водорастворимые вещества

Вводят парентерально – внутривенно, внутримышечно, подкожно, внутримышечно или (при наличии показаний) внутриплеврально. При наличии местнораздражающего действия вещество вводят только внутривенно. В качестве растворителя для парентерального введения субстанции допустимо использование любого физиологически адекватного растворителя, не вызывающего местного раздражающего действия. Внутривенные инъекции производят в хвостовую вену (≤ 10 мл) или в супраорбитальный синус ($\leq 0,3$ мл). Внутримышечные инъекции (≤ 10 мл) производят в нижнюю треть брюшной полости. Подкожные инъекции ($\leq 0,3$ мл) производят в складку кожи на боку или спине животного. Внутримышечные инъекции ($\leq 0,1$ мл) производят в медиальную группу мышц бедра. Внутриплевральные инъекции осуществляют по методике, описанной в п. 2.1.

Нерастворимые в воде вещества

Вводят в желудок с помощью зонда или парентерально в специально разработанных лекарственных формах. В качестве растворителя используют физиологически адекватные наполнители и растворители, такие как 1%-ный крахмальный клейстер, растительное масло, поливинилпирролидон (ПВП) и пр.

2.4. Определение диапазона терапевтических доз

Исследование проводят при оптимальном пути введения вещества в организм в диапазоне доз от неэффективной до максимально переносимой (МПД). Целесообразно использовать не менее шести однократных или курсовых доз (при любой длительности курса). Для каждой дозы определяется максимальный противоопухолевый эффект по одному из возможных критериев.

С помощью построения графика «доза–эффект» определяется эффективная доза («*effective dose*») ED_{20} , ED_{50} и ED_{90} – расчетные дозы, вызывающие торможение роста опухоли (ТРО) на 20%, 50% и 90% соответственно. Затем рассчитываются терапевтические индексы (TI_{20} , TI_{50} или TI_{90}) как соотношение соответствующей летальной и эффективной доз [4]. TI является единственным показателем избирательности противоопухолевого действия, рекомендуемое значение $TI_{50} \geq 2$. Наиболее часто определяют TI_{50} по формуле:

$$TI_{50} = LD_{50} / ED_{50},$$

где LD_{50} – доза, вызывающая гибель 50% здоровых животных.

2.5. Выбор оптимальной схемы применения

Оптимальная схема применения зависит от биодоступности вещества, а также наличия кумуляции и обратимости противоопухолевого и токсического действия и определяется эмпирически в рамках серии исследований, проведенных на высокочувствительной опухолевой модели. Эмпирически найденная оптимальная схема (диапазон доз, количество введений, интервалы между введениями, путь введения), а также данные фармакокинетики вещества являются обоснованием для терапевтической схемы при проведении КИ.

2.6. Изучение действия на развившуюся опухоль

Исследования проводятся на наиболее чувствительной опухоли при среднем объеме ($V_{ср}$) к началу лечения не менее 500 мм^3 и колебании $V_{ср}$ в группе не более 10%. Учитывая большие размеры опухоли, целесообразно повысить величину суммарной дозы веще-

ства. Оценка противоопухолевого эффекта производится по торможению роста опухоли в динамике через более короткие интервалы, чем при обычной схеме лечения.

2.7. Изучение действия на опухоли с приобретенной лекарственной устойчивостью

Используются любые доступные опухолевые штаммы, например, лейкозы:

- лимфолейкоз Р388, резистентный к цисплатину (Р388/ДДП);
- лимфолейкоз Р388, резистентный к адриамицину (Р388/АдР);
- лимфолейкоз L1210, резистентный к циклофосфану (L1210/ЦФ).

Резистентные штаммы лейкоза Р388, полученные для большинства полициклических противоопухолевых препаратов (например, Р388/АСТ-D, Р388/VP-16 и Р388/VCR) не имеют общей резистентности с алкилирующими агентами или антиметаболитами [11].

Также может быть использован любой иной опухолевый штамм с приобретенной лекарственной устойчивостью. Штаммы ведутся на мышах линии DBA₂ при поддерживающей терапии веществом, к которому наработана резистентность. Лейкозные штаммы прививаются внутрибрюшинно. Для исследования используются мыши той линии, на которой индуцирована резистентность. Начало лечения через 24 ч после перевивки. Наблюдение за мышами продолжается до их гибели. Оценка противоопухолевого эффекта проводится по увеличению продолжительности жизни мышей. Сравнение эффекта нового тестируемого вещества проводится с эффектом взятого в оптимальной терапевтической дозе препарата, к которому индуцирована резистентность.

2.8. Оценка плевросклерозирующей активности

Исследование проводится на здоровых мышах обоего пола линейных или гибридных массой тела 20–25 г.

Индукция плевродеза

При индукции плевродеза используется методика внутривнутриплевральных инъекций. В плевральную полость здоровых мышей (n³⁶) однократно вводят тестируемое вещество в диапазоне доз в объеме от 0,05 до 0,5 мл. В зависимости от степени местнораздражающего действия (МРД) агента мыши переносят введение по-разному. При хорошей переносимости их можно сразу перенести в клетку. При ограничении подвижности и увеличении глубины легочных экскурсий (чрезмерное МРД) может наступить гибель от плевропульмонального шока. В этом случае следует снизить величину вводимой дозы вещества за счет уменьшения объема или концентрации раствора. В течение 4–5 дней после введения мыши малоподвижны, глубина дыхательных экскурсий увеличена. Эта симптоматика прямо связана с дозой и концентрацией склерозирующего агента. В случае применения переносимых доз и концентраций в последующие 2–3 недели состояние мышей нормализуется. В случае развития острого неспецифического серозного плеврита (чрезмерное МРД) в этот период может наступить гибель мышей. При вскрытии погибших мышей в плевральной полости обнаруживается трансудат до 1,0 мл. На 18–21 сутки после введения тестируемого агента всех мышей подвергают эвтаназии эфирным наркозом, после чего подвергают аутопсии, при которой визуально изучают состояние грудной полости.

Таблица 2

Шкала оценки плевросклерозирующего действия

Баллы	Симптоматика
1	Утолщение перикарда и легочной связки
2	То же + сращение перикарда с окружающими тканями вплоть до разделения единой плевральной полости мышей на две

3	То же + спайки между париетальной и висцеральной плеврой, занимающие до 1/3 поверхности плевры
4	То же + спайки между париетальной и висцеральной плеврой, занимающие до 1/2 поверхности плевры
5	Облитерация полости (плевродез)

Примечания: эталонный ПСС – 3% раствор тетрациклина.

2.8.1. Расчет терапевтического индекса (ТИ)

Первоначально экспериментально определяется доза, вызывающая максимальное склерозирование без гибели мышечной ткани (МСД). Затем на здоровых мышцах изучается острая токсичность агента при внутриплевральном введении и по общепринятому методу Литчфилда-Уилкоксона рассчитывается величина дозы, близкой к максимально переносимой (МПД, ЛД₅). После чего ТИ рассчитывается по формуле:

$$ТИ = ЛД_5 / МСД ,$$

где ТИ – терапевтический индекс, ЛД₅ – доза, близкая к максимально переносимой, МСД – максимальная склерозирующая доза.

Для 3% тетрациклина в исследовании на мышцах-самках линии BALB/c массой тела 20–25 г при введении ЛД₅=186,2 мг/кг максимальная склерозирующая доза МСД=150 мг/кг, ТИ тетрациклина=1,24. Эти цифры характеризуют тетрациклин как препарат с невысокой избирательностью терапевтического действия, поскольку для достижения полного склерозирования необходимо применение дозы, близкой к токсической. Полученные данные согласуются с клиническим опытом применения тетрациклина [14]. Совпадение экспериментальных и клинических данных говорит об адекватности модели тетрациклинового плевродеза на мышцах для оценки склерозирующего действия препаратов.

2.8.2. Заключение об эффективности ПСС

Эффект тестируемого вещества оценивается по 5-балльной шкале в сравнении с 3% тетрациклином (эталон). Критерий отбора – 4–5 баллов (склерозирование более 2/3 поверхности плевральной полости, плевродез).

О перспективности вещества для клинической апробации судят по терапевтическому индексу ТИ>1,24 (тетрациклин) при однократном внутриплевральном введении.

2.9. Оценка эффективности в комбинации с известными противоопухолевыми препаратами

Исследуемое вещество вводят в комбинации с доступными наиболее эффективными и широко используемыми в клинической онкологии препаратами (циклофосфаном, доксорубицином, цисплатином, метотрексатом, таксолом, гемзаром и пр.). Целесообразно использовать чувствительную и резистентную к известному препарату опухоли и вводить комбинанты в дозах, составляющих половину от МПД и максимальной эффективной дозы, если таковые не совпадают. В качестве положительного контроля вещество и препарат вводят в полных или удвоенных дозах, что позволяет при равном противоопухолевом эффекте в сравниваемых группах оценить терапевтический эффект комбинации (ЭК):

Аддитивный эффект – ЭК меньше суммы эффектов комбинантов, но больше эффекта более активного комбинанта: $A + B > ЭК_{AB} > Э_{\max}$ (A или B).

Синергический эффект – ЭК меньше суммарного эффекта равных по эффекту комбинантов, но больше, чем при введении одного из них $B < ЭК_{AB} < Э\Sigma$ (A + B).

Суммационный эффект – ЭК равен суммарному эффекту комбинантов: $ЭК_{AB} = Э\Sigma$ (A + B).

Потенцирующий эффект — ЭК больше суммарного эффекта комбинантов: $ЭК_{AB} > Э\Sigma (A + B)$.

Снижение эффекта — ЭК меньше эффекта более активного комбинанта: $ЭК_{AB} < Э_{\max} (A \text{ или } B)$.

Отсутствие эффекта — ЭК меньше минимального критерия эффективности: $ЭК_{AB} < Э_{\min}$.

2.10. Сравнительное изучение субстанции и лекарственной формы

Исследование проводится в прямом параллельном сравнении на 1–2 наиболее чувствительных опухолях при оптимальной схеме применения вещества в двух дозах.

3. Оценка эффективности противоопухолевого действия лекарственных средств

3.1. Оценка противоопухолевого эффекта по торможению роста опухоли

Проводится определение 2–3 размеров опухоли у каждого животного в группе, после чего вычисляется объем ($V \text{ мм}^3$) опухоли по формулам:

$$V = a \times b \times c \text{ или } V = (a \times b)^2 / 2,$$

где a , b и c — длина, ширина и высота опухолевого узла. Затем вычисляется средний объем опухоли в группе $V_{\text{ср}}$.

Степень торможения роста опухоли определяется по показателям ТРО и Т/С [4, 8, 9], вычисляемым по формулам:

$$\text{ТРО}\% = (V_{\text{контроля}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроля}} \times 100;$$

$$\text{Т/С}\% = (V_{\text{опыта}} / V_{\text{контроля}}) \times 100,$$

где V — средний объем опухоли (мм^3) в получавшей препарат и контрольной группах, соответственно, на конкретный срок; Т — леченая группа; С — контрольная группа, Т/С — величина, обратная ТРО, используется в случаях, когда имеется стимуляция роста опухоли и во всех случаях лечения развившейся опухоли.

Допустимо определять ТРО и Т/С, используя в качестве показателя среднюю массу опухоли у погибших и забитых в различные сроки исследования животных. ТРО и Т/С рассчитываются на 1, 7 и 14 сутки после окончания лечения. Значимый противоопухолевый эффект должен сохраняться не менее 7 суток.

Количественные критерии оценки ингибирующего эффекта на опухолях животных

ТРО < 20% 0

ТРО < 20 — 50% ±

ТРО < 51 — 80% +

ТРО < 81 — 90% ++

ТРО < 91 — 100% + < 50% ПР/излечения +++

ТРО < 91 — 100% + > 50% ПР/излечения ++++

Количественные критерии оценки активности на ксенографтах опухолей человека

Т/С = 51 — 100% 0

Т/С = 36 — 50% +

Т/С = 21 — 35% ++

Т/С = 6 — 20% +++

Т/С < 5% ++++

Минимальные значения для трех обязательных для изучения чувствительных к препарату солидных опухолей или подкожно перенесенных лейкозов:

$$TPO \geq 70\%, T/C \leq 30\%.$$

Минимальные значения для единственной чувствительной к препарату опухоли из всего спектра обязательных для изучения опухолей:

$$TPO \geq 90\%, T/C \leq 10\%.$$

3.2. Оценка ингибирующего рост опухоли эффекта по логарифму погибших клеток

Дополнительно может быть рассчитано количество погибших клеток в подкожно привитых опухолях. Для этого в контрольной (t контроля) и леченой (t опыта) группах определяется среднее время удвоения объема опухоли или достижения определенной величины. Разница между показателями « t контроля» и « t опыта» (время задержки роста опухоли в получавшей препарат группе) находится в прямой связи с величиной пула погибших клеток к данному сроку. Рассчитывается \lg числа погибших клеток ($\lg n$) по формуле [8]:

$$\lg n = \frac{tk - to}{3,32Td},$$

где $tk - to$ — время задержки роста опухоли в опыте; Td — время удвоения размеров опухоли, рассчитанное по экспоненциальной кривой роста опухоли в контроле; 3,32 — число удвоений, необходимое для увеличения $\lg n$ на один порядок.

Критерий активности

Лечение должно сопровождаться увеличением \lg погибших клеток не менее чем в 2–4 раза.

3.3. Оценка противоопухолевого эффекта по увеличению продолжительности жизни

Проводится по окончании исследования и гибели всех животных. Определяется средняя продолжительность жизни (СПЖ, дни) в группе и вычисляются показатели увеличения продолжительности жизни (УПЖ%) ($УПЖ = T/C - 100$) и T/C по формулам:

$$T/C\% = (СПЖ_{опыта} / СПЖ_{контроля}) \times 100;$$

$$УПЖ\% = (СПЖ_{опыта} - СПЖ_{контроля}) / СПЖ_{контроля} \times 100.$$

Таблица 3

Количественные критерии активности [8]

T/C	<125%	0
	125–160%	±
	161–200%	+
	201–300% или 161 – 200% при однократном введении	++
	>200+ПР<50% или 201-300% при однократном введении	+++
	>300%+ПР>50% или <50% при однократном введении	++++

Минимальные значения T/C для животных:

с лейкозами: $T/C \geq 175\%$, $УПЖ \geq 75\%$;

с асцитными и солидными опухолями: $T/C \geq 150\%$, $УПЖ \geq 50\%$;

с опухолевыми плевритами (ОП): $T/C \geq 150\%$, $УПЖ \geq 50\%$.

3.4. Оценка противоопухолевого эффекта по числу полных ремиссий и излечению от опухоли

Подсчет числа полных ремиссий производится не ранее чем через 30 дней (лейкозы) или 60 дней (солидные опухоли, развивающиеся в брюшной полости гемобластозы), а подсчет числа излеченных животных производится не ранее чем через 90 дней после окончания курса терапии. Отсутствие признаков опухолевого поражения определяют при патологоанатомическом вскрытии.

3.5. Статистический анализ результатов изучения *in vivo*

Результаты, полученные при проведении экспериментов, подвергаются статистической обработке с целью установления степени варибельности вычисленных показателей и достоверности выявленных различий.

При статистической обработке результатов исследований, проведенных на опухолях, характер роста которых подчиняется законам нормального распределения, возможно применение параметрических методов статистики (метод Стьюдента-Фишера, критерий Т, доверительный интервал). Для опухолей, рост которых не подчиняется законам нормального распределения, используется любой из непараметрических методов статистической обработки результатов биологического эксперимента (критерий U, критерий Уилкоксона и т.п.). Различия можно считать достоверными при $p < 0,05$.

4. Исследование цитотоксического эффекта лекарственных средств *in vitro*

Основной целью исследований *in vitro* является оценка прямого цитотоксического эффекта потенциальных противоопухолевых препаратов и выявление возможной дифференциальной чувствительности опухолевых клеток человека различного генеза к изучаемым соединениям. Исследование может проводиться на всех стадиях разработки новых препаратов.

4.1. Методы изучения

Система отбора и изучения соединений с потенциальной противоопухолевой активностью *in vitro* основана на определении степени подавления роста клеток под влиянием тестируемого агента, которое вычисляется по формуле: $N\% = (1 - \text{Опыт}/\text{Контроль}) \times 100$.

При этом используются следующие методы оценки:

- метод подсчета клеток (преимущественно для лейкоза MOLT-4),
- МТТ-тест,
- ³H-тимидиновый тест.

Перечисленные методы предусматривают ведение клеточных культур в условиях, указанных далее по тексту. При всех методах изучаемое соединение тестируют в трех параллельных измерениях при 4-х концентрациях — 10^{-7} М, 10^{-6} М, 10^{-5} М и 10^{-4} М, для аналогов сахаров — до 10^{-3} М. Затем по кривой зависимости роста культуры клеток от концентрации соединения определяют ИК₅₀ и ИК₉₀, то есть концентрации препарата, вызывающие торможение роста клеток на 50% и 90%.

После определения ИК₅₀ проводится дополнительное тестирование при 4–5 концентрациях, близких к ИК₅₀.

4.2. Критерии оценки цитотоксического эффекта

Соединение нового класса считается цитотоксически активным при $ИК_{50} \leq 10^{-4}$ М, аналог известного противоопухолевого препарата оценивается как цитотоксичный, если его $ИК_{50} \leq ИК_{50}$ препарата сравнения [2, 8, 15].

4.2.1. Метод подсчета клеток (лейкоз MOLT-4)

Соединение полностью растворяют в питательной среде RPMI-1640 без сыворотки в двукратной концентрации по отношению к конечной и стерилизуют через мембранный

фильтр с $d=0,22$ м. Если для растворения требуется специальный растворитель, он добавляется в эквивалентных концентрациях в контрольные образцы. В остальных случаях в качестве контроля используют среду RPMI-1640, содержащую 20 мМ буфера Нерес.

Суспензию разбавляют до концентрации 1×10^5 кл/мл средой RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной сыворотки теленка и 20 мМ буфера Нерес, и распределяют в пробирки для клеточных культур из боросиликатного стекла. В каждую пробирку помещают 1 мл среды, содержащей культуру, и 1 мл среды, содержащей исследуемое вещество в определенной концентрации. В итоге конечное разведение клеток составляет 5×10^4 кл/мл в общем объеме среды 2 мл. Закрытые пробками пробирки инкубируют в вертикальном положении в течение 48 ч при 37°C . По окончании инкубации содержание клеток в пробах (число клеток в мл среды) измеряют с помощью автоматического счетчика клеток. Для каждой концентрации испытуемого соединения вычисляют среднее значение из трех параллельных измерений и рассчитывают отношение к контрольному (без соединения) росту в процентах.

4.2.2. МТТ-тест для линий опухолевых клеток человека

МТТ-тест основан на ферментном восстановлении неокрашенной соли тетразолия (3-[4,5-диметилтиазол-2-ил]-2,5-дифенилтетразолия бромид, МТТ) в живых метаболически активных клетках с образованием голубых кристаллов формазана.

Клетки в концентрации 1×10^3 – 5×10^3 в 100 мкл среды RPMI-1640, содержащей 20% эмбриональной сыворотки теленка и 20 мМ буфера Нерес, помещают в лунки 96-луночных микролитровых пластин с объемом лунки 200 мкл и инкубируют 24 ч при 37°C . Затем добавляют исследуемое соединение в различных концентрациях в объеме 100 мкл и инкубируют в течение 48 ч при тех же условиях. После этого содержащую препарат среду удаляют, в лунки добавляют 200 мкл среды без сыворотки, вносят 10 мкл готового раствора МТТ (исходная концентрация 5 мг/мл в фосфатном буфере) и дополнительно инкубируют в течение 4-х ч. По окончании инкубации удаляют среду из лунок и добавляют по 150 мкл диметилсульфоксида (ДМСО) для растворения образовавшихся в результате реакции синих кристаллов формазана. Оптическую плотность растворенного в ДМСО формазана измеряют колориметрически на оптическом счетчике для многолуночных планшетов при $\lambda=570$ нМ. Вычисляют величины $ИК_{50}$ и $ИК_{90}$.

4.2.3. ^3H -тимидиновый тест

^3H -тимидиновый тест может выполняться с использованием дисков для определения ^3H тимидина, включившегося в клетки, или с помощью измерения радиоактивности кислотных гидролизатов кислотонерастворимой фракции клеток (РКГКФ).

4.2.3.1. С использованием дисков

Исследуемое соединение растворяют в среде RPMI-1640, содержащей 20 мМ буфера Нерес, в концентрации, превышающей конечную в 4 раза. Полученный раствор стерилизуют фильтрованием через мембранный фильтр с $d=0,22$ мк и делают серийные разведения в той же среде. Суспензию опухолевых клеток разбавляют средой RPMI-1640 (+20 мМ Нерес) до $3,2 \times 10^5$ кл/мл, распределяют по лункам в равных объемах по 50 мкл и инкубируют в течение 24 ч при 37°C . После этого в лунки вносят растворы соединения по 50 мкл из расчета 4 измерения на одну исследуемую концентрацию и продолжают инкубацию в течение 48 ч при 37°C . За 1 ч до окончания инкубации в лунки вносят ^3H -тимидин aliquвтами по 100 мкл до конечной концентрации 0,2 мкСи/мл. После инкубации клетки собирают на диски из фильтровальной бумаги и промывают 10 раз изотоническим раствором хлорида натрия на автоматическом сборщике клеток. Высушенные диски помещают в сцинтилляционные флаконы, содержащие 3 мл сцинтиллятора, и с помощью жидкостного сцинтилляционного счетчика подсчитывают радиоактивность в распадах в минуту на пробу. Среднее значение для четырех измерений уровня радиоактивности при каждой исследуемой концентрации выражают в % от контроля и вычисляют $ИК_{50}$ и $ИК_{90}$.

4.2.3.2. С измерением РКГКФ

Опухолевые клетки в количестве $1,0-2,0 \times 10^5$ кл/мл в 2 мл среды RPMI-1640 помещают в стеклянные флаконы с $d=2$ см и инкубируют в течение 24 ч при 37 °С. Затем в инкубационную среду вносят исследуемое соединение, растворенное в минимальном объеме среды (100 мкл), и инкубируют в течение 48 ч в тех же условиях. За 1 ч до окончания инкубации в образцы вводят специфический предшественник ДНК ^3H -тимидин аликвотами по 100 мкл до конечной концентрации 1 мкСи/мл. По окончании инкубации клетки промывают раствором Хенкса и 2,5% HClO_4 и гидролизуют в 5% HClO_4 в течение 20 мин при 80 °С. Образцы гидролизатов в объеме по 0,1 мл помещают в сцинтилляционную жидкость ЖС-8. Уровень радиоактивности проб измеряют на жидкостном сцинтилляционном счетчике, выражают в % к контролю и вычисляют значения ИК₅₀ и ИК₉₀.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Бычков М.Б. Опухолевые плевриты (дифференциальная диагностика и лечение) // Русский медицинский журнал. — 1999. — Т. 7, № 10. — С. 458–461. — www.rmj.ru/rmj/t7/n10/3.htm.
2. Жукова О.С., Хадув С.Х., Добрынин Я.В. и соавт. Влияние L-лизин-а-оксидазы на кинетику клеточного цикла культивируемых клеток лимфомы Беркита // Экспериментальная онкология. — 1985. — Т. 7, № 6. — С. 42–44.
3. Лайт Р.У. Болезни плевры. — М., 1986.
4. Ларионов Л.Ф. Химиотерапия злокачественных опухолей // М.: Изд. «Медицинская литература», 1962. — С. 98.
5. Правила производства и контроля качества лекарственных средств // Технический регламент РФ. — М., 2003.
6. Противоопухолевая активность веществ природного происхождения // Трещалина Е.М., М.: Изд. «Практическая медицина», 2006. — С. 299.
7. Российская коллекция клеточных культур позвоночных (РККК П) / Составители Г.Г. Полянская, Г.А. Сакута, М.Ю. Еропкина и соавт.; Коллекция АТСС CCL 185; ЕСАСС 86012804 // НИИ вирусологии РАМН; НИИ гриппа РАМН; ИНИЦ РАН. — J. Natl. Cancer Inst. — 1973. — V. 51; Int. J. Cancer, 1976. — V.17; Tissue Antigens, 1978. — V.11.
8. Трещалина Е.М., Жукова О.С., Герасимова Г.К., Андропова Н.В., Гарин А.М. Методические указания по изучению противоопухолевой активности фармакологических веществ. — В кн.: Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / под общей ред. член-корр. РАМН проф. Р.У. Хабриева. — 2 изд., перераб. и доп. — М.: ОАО изд. «Медицина», 2005. — 832 с. — С. 637–651.
9. Трещалина Е.М., Андропова Н.В. Новые модели, созданные в ОНЦ для целей экспериментальной химиотерапии // Официальный сайт отделения химиотерапии НИИ КО РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН. — www.oncomed.ru/text/new_models.html.
10. Энциклопедия лекарств, РЛС, 2006. — Вып. 14, Rlsnet.ru. — С. 1391.
11. Anticancer Drug Development Guide. Preclinical screening, clinical trials, and approval. Second ed. // ed. by B.A. Teicher and P.A. Andrews. — Humana Press. — Totowa. — New Jersey. — 2004. — p. 450.
12. Bujlamwini J.K. Novel anticancer drug discovery. — Current opinion in chemical biology, 1999. — 3. — p. 500–509.
13. Jones D.A., Fitzpatrick F.A. // Genomics and the discovery of new drug target. — Current opinion in chemical biology, 1999. — № 3. — p. 71–76.
14. Shan S.A. Malignant pleural effusion // Clin. Chest Med. — 1985. — V. 6. — p. 113–125.
15. Survey of antitumor and toxicity test systems//EORTC.-Screening and Pharmacology Group. — October. — 1989. — p. 23–25.

ГЛАВА 40

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ФОТОИНДУЦИРОВАННЫХ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. б. н., проф. Р.И. Якубовская; Н.И. Казачкина; Т.А. Кармакова;
Н.Б. Морозова; к. б. н. А.А. Панкратов; А.Д. Плотинская; д. фарм. н. А.В. Феофанов;
академик РАМН, проф. В.И. Чиссов; к. м. н. А.И. Зебрев; А.В. Тихомирова*

Введение

В настоящее время все большее распространение в медицине находят новые методы лечения, использующие достижения в области фотохимии, фотобиологии и квантовой физики. Особенно успешно в онкологии развивается метод фотодинамической терапии (ФДТ), основанный на разрушении опухолевого очага активными свободнорадикальными частицами, возникающими в результате взаимодействия фотоактивного соединения — фотосенсибилизатора, аккумулировавшегося в опухоли, с лазерным излучением определенной длины волны. На сегодняшний день ФДТ применяется в качестве радикальной терапии, как один из альтернативных методов наряду с криодеструкцией и лучевой терапией.

Молекула фотосенсибилизатора при поглощении кванта света (длина волны в области от 400 нм до 860 нм) переходит в возбужденное короткоживущее состояние. Затем происходит либо обратный переход в основное состояние, сопровождающийся излучением кванта света — флуоресценцией, либо переход на триплетный уровень [1].

Фотосенсибилизатор в возбужденном триплетном состоянии может взаимодействовать непосредственно с окружающими его молекулами (субстратом) органического и неорганического характера, отрывая от них электрон или атом водорода. В результате образуются свободные радикалы, которые затем могут вступать во взаимодействие с другими субстратами, вызывая их окисление, или с молекулярным кислородом, образуя его радикалы, способные вызывать деструктивные изменения в патологическом очаге. Наибольший вклад в фотоиндуцированное повреждение вносят активные формы кислорода (АФК) [2].

Селективность метода ФДТ создается за счет определенной тропности фотосенсибилизатора к патологически измененным тканям и селективности доставки света к патологическому очагу.

Первые сообщения о возможностях использования красителей для выявления и разрушения патологических тканей были сделаны более 100 лет назад, однако активно метод ФДТ начал развиваться лишь 20–25 лет назад как новый подход в лечении злокачественных новообразований. Развитию этого метода способствовал бурный прогресс в области лазерных технологий и тонкого химического синтеза [3]. В настоящее время известно множество различных красителей природного и синтетического происхождения, обладающих фотодинамической активностью.

В качестве первого фотосенсибилизатора был использован препарат «Фотофрин-1» (США) на основе производного гематопорфирина (ППП). Затем появились препараты, приготовленные также с использованием других ППП («Фотофрин-2», США; «Фотосан», Канада; «Фотогем», Россия и т.д.), а также препараты на основе производных порфинов, азопорфинов и других красителей [4]. В конце 20-го века внимание исследовате-

лей привлекла 5-аминолевулиновая кислота (5-АЛК) как эндогенный предшественник протопорфирина IX (ППИХ), накапливающийся в опухолевых клетках [5].

В России разработка фотосенсибилизаторов началась в 1980 г. К настоящему моменту зарегистрировано три отечественных препарата: Фотогем (производное гематопорфирина — аналог Фотофрина II), Фотосенс® (производное фталоцианина), Аласенс® (на основе 5-аминолевулиновой кислоты — предшественника ППИХ). КИ проходят два аналогичных препарата — Радахлорин и Фотодитазин (производные хлорина).

КИ, проведенные к настоящему моменту, свидетельствуют об эффективности метода ФДТ при тяжелых дисплазиях, начальных поверхностно расположенных опухолях различных локализаций, первично выявленном раке у некурабельных больных с тяжелой сопутствующей патологией, в случаях функциональной нерезектабельности опухолей при первично-множественном поражении, а также при рецидивах опухолей после хирургического, комбинированного и других видов противоопухолевого лечения. Появились сообщения об успешном применении ФДТ при раннем раке вульвы, внутриорганных опухолях печени, поджелудочной железы, плевры, наиболее эффективным методом лечения которых до сих пор является хирургический. Внедрение в клиническую практику метода ФДТ позволило существенно расширить диапазон оказания радикальной, а также паллиативной помощи онкологическим больным при стенозирующем раке пищевода и желудка с целью реканализации, внутрикожных метастазах рака молочной железы и меланомы, мезотелиоме или метастатическом поражении плевры, сопровождающихся специфическим экссудативным плевритом.

В настоящее время метод ФДТ успешно применяется и в других областях медицины: дерматологии, офтальмологии, кардиологии, стоматологии и др.

Исследования в области ФДТ злокачественных новообразований позволили сформулировать следующие требования, предъявляемые к идеальному фотосенсибилизатору:

- наличие полосы (полос) интенсивного поглощения в спектре возбуждения;
- высокий квантовый выход триплетного состояния;
- постоянный химический состав;
- технологичность производства;
- устойчивость при хранении и введении в организм;
- высокая селективность накопления в ткани опухоли по сравнению с окружающими нормальными тканями;
- слабое накопление в коже;
- сравнительно быстрое выведение из организма;
- низкая токсичность.

Эффективность ФДТ обусловлена множеством факторов, главными из которых являются фотоактивность красителя, характер его накопления в опухолевом очаге и окружающей опухоль ткани, напряжение кислорода в зоне облучения и режим облучения.

Фотоактивность красителя зависит от его химической структуры, которая определяет способность молекулы Фс поглощать свет и переходить в активированное триплетное состояние, индуцирующее фотохимическое повреждение тканей.

Уровень накопления фотосенсибилизатора и характер его внутритканевого и внутриклеточного распределения в значительной степени зависит от его дозы, способа введения, а также времени, прошедшего после введения. По современным представлениям для реализации противоопухолевого эффекта ФДТ имеет значение не только прямое повреждение опухолевых клеток, но и поражение стромы, в частности, кровеносных сосудов, обеспечивающих питание опухоли. Менее значимый, но существенный вклад в эффективность воздействия могут вносить цитотоксические процессы, опосредованные иммунными реакциями, которые развиваются в ответ на фотоиндуцированное повреждение. Так как накопление вводимого в организм препарата в опухолевой ткани может быть крайне гетерогенным, то комплексное поражение сосудов, стромы и активация иммунных механизмов может обеспечивать наиболее полное уничтожение опухолевых

элементов. Биораспределение фотосенсибилизатора также зависит от структуры его молекулы, которая влияет на способность красителя связываться с макромолекулярными носителями в организме, преодолевать биологические барьеры, достигать определенных мишеней и накапливаться в них в мономерной, т.е. фотоактивной форме.

Одним из определяющих моментов в реализации эффекта ФДТ является степень оксигенации опухолевой ткани, которая зависит как от объективных причин (особенности кровоснабжения опухоли), так и от режима и параметров облучения. Установлено, что при высоком уровне накопления Фс в ткани, высокой плотности энергии света и, соответственно, высокой скорости генерации синглетного кислорода происходит резкое снижение напряжения кислорода в области светового воздействия. Это приводит к развитию глубокой гипоксии и ингибированию фотохимической реакции, следствием чего может быть снижение эффективности лечения.

Идеальный режим облучения должен обеспечить проникновение квантов света по всему объему опухолевого поражения, многократную активацию фотосенсибилизатора без деструкции красителя с эффективным выбросом АФК и других свободных радикалов, а также рациональный расход кислорода в зоне воздействия, исключая резкое и необратимое снижение степени оксигенации ткани-мишени. Как правило, наилучший эффект ФДТ достигается при использовании низких и средних доз фотосенсибилизатора и плотностей энергии оптического излучения.

Перспективность метода ФДТ стимулирует очень динамичное развитие экспериментальных исследований в этой области, как в фундаментальном, так и в прикладном аспекте. Однако доклиническое изучение фотосенсибилизаторов как фармакологических средств для онкологии не приобрело пока соответствующей методической базы, как, например, изучение противоопухолевых средств для химиотерапии. Это привело к произвольному использованию разнообразных методов для исследования фотосенсибилизаторов, а также способов оценки противоопухолевой активности ФДТ. Отсутствие стандартных методологических подходов делает затруднительным сравнение эффективности различных субстанций и препаратов с противоопухолевыми фотосенсибилизирующими свойствами, а также недостаточно полному их доклиническому изучению.

Эти обстоятельства побудили нас обобщить 15-летний опыт изучения более 200 красителей различных классов (ариламинов, ксантенов, гематопорфиринов, хлоринов, бактериохлоринов, фталоцианинов, нафталоцианинов, тераазохлоринов, тетраазобактериохлоринов и других экзогенных фотосенсибилизаторов, а также предшественника эндогенного ППХ — 5-АЛК и ее эфиров) в виде методических рекомендаций. Формально разработанная нами Программа изучения фотосенсибилизаторов сходна с таковой для доклинических исследований противоопухолевых препаратов — цитостатиков, однако его методическое осуществление существенно сложнее. Бинарный характер воздействия и многообразие биологических и химических свойств фотосенсибилизаторов диктуют необходимость их мультипараметрического изучения, что обеспечит объективную оценку их эффективности как потенциальных средств для противоопухолевой ФДТ. Особое внимание следует уделять стандартизации используемых объектов, методикам измерения флуоресценции, схемам проведения фотодинамического воздействия *in vitro* и *in vivo*, стандартизации аппаратуры и оценке результатов.

Программа изучения фотосенсибилизаторов включает 3 этапа: I этап — скрининг *in vitro*, II этап — изучение в системе *in vivo*, III этап — доклиническое исследование.

1. Скрининг фотосенсибилизаторов

Задачами скрининга являются поиск веществ, обладающих противоопухолевыми фотоиндуцированными свойствами, и отбор наиболее активных из них для дальнейшего изучения.

Скрининг фотосенсибилизаторов включает:

— изучение абсорбционных и флуоресцентных спектральных свойств красителей в водных средах (в том числе содержащих соли, поверхностно активные соединения, белки и пр.);

— изучение фотоиндуцированной и «темновой» цитотоксичности фотосенсибилизаторов *in vitro* на опухолевых клетках млекопитающих;

— изучение фотоиндуцированной противоопухолевой активности *in vivo* на мышах со стандартными перевиваемыми злокачественными опухолями различного гистогенеза.

Изучение спектральных и физико-химических свойств фотосенсибилизатора позволяет отобрать красители с оптимальными характеристиками, а именно — обладающие высоким коэффициентом экстинкции ($\epsilon > 30000$), имеющие интенсивную полосу поглощения в длинноволновой области спектра ($\lambda > 640$), стабильные при хранении и световом воздействии, а также растворимые в биологически совместимых средах, пригодных для работы с клеточной культурой и введения в организм животного.

Противоопухолевый эффект ФДТ может быть обусловлен как прямым повреждением опухолевых клеток, так и их опосредованной гибелью, возникающей вследствие разрушения стромальных элементов — кровеносных сосудов, соединительной ткани. В связи с этим первоначальный скрининг соединений целесообразно проводить как в системе *in vitro*, так и в системе *in vivo* на животных-опухоленосителях.

Скрининг *in vitro* направлен на отбор соединений, не обладающих токсичностью в отсутствие светового воздействия и проявляющих высокую фототоксичность. Эти исследования позволяют выявить и адекватно сравнить фотоиндуцированную активность красителей, обусловленную прямым повреждением опухолевых клеток, прогнозировать способность фотосенсибилизаторов диффундировать в паренхиму опухолевого узла и проникать в опухолевые клетки при системном или местном применении.

Исследования *in vivo* на этапе скрининга направлены на подтверждение высокой эффективности красителя, зафиксированной *in vitro*, а также на выявление фотоактивных соединений, противоопухолевое действие которых преимущественно опосредовано повреждением стромы опухоли. Конечной целью этого этапа является отбор оптимального по фотобиологическим свойствам фотосенсибилизатора для его дальнейшего изучения.

1.1. Скрининг фотосенсибилизаторов в системе *in vitro*

Возможные модели и параметры изучения фотоиндуцированной цитотоксичности экзогенных красителей *in vitro* представлены в таблице 1.

В качестве модели могут быть использованы суспензионные или прикрепляющиеся культуры клеток. В начале исследования целесообразно использовать одну клеточную линию при постоянной посевной концентрации клеток, с фиксированным временем инкубации — 30 мин или 2 ч и фиксированной дозой света — 10 Дж/см², с облучением клеток в среде инкубации, содержащей сенсибилизатор, варьируя только один параметр — концентрацию тестируемой субстанции. При отсутствии фотоиндуцированной активности субстанции в отношении этой клеточной линии рекомендуется повторить тест в тех же условиях на одной или двух других культурах клеток, чтобы исключить получение ложно отрицательного результата, обусловленного низкой чувствительностью избранной культуры к фотодинамическому воздействию с использованием данного конкретного красителя.

После установления факта наличия фотоиндуцированной цитотоксичности у испытуемого соединения следует приступить к оценке его фототоксических свойств по расширенной схеме.

Расширенное изучение фототоксических свойств сенсибилизаторов проводят на клетках опухолей человека и животных, используя не менее 3-х клеточных линий вследствие возможных различий в их чувствительности к фотодинамическому воздействию. При этом варьируют ряд параметров:

- посевную концентрацию клеток;
- концентрацию сенсibilизатора (100 мкМ и ниже) при постоянной посевной концентрации клеток;
- время инкубации клеток с сенсibilизатором до облучения (15, 30 мин, 2, 4 и 24 ч);
- плотность энергии (5, 10 и 20 Дж/см²).

В условиях, приводящих к наибольшему фототоксическому эффекту, облучение проводят параллельно в двух вариантах: как в среде инкубации, содержащей сенсibilизатор, так и после смены среды перед облучением на среду, не содержащую сенсibilизатор. Сопоставление эффектов, полученных в этих двух вариантах облучения, позволяет косвенно оценить вклад фотоиндуцированного повреждения, обусловленного красителем, накопившимся внутри клеток.

Таблица 1

Скрининг потенциальных фотосенсibilизаторов на культуре клеток in vitro

Культуры клеток	A549 (аденокарцинома легкого человека)	
	HEp2 (плоскоклеточный рак гортаноглотки человека)	
	HT 29 (карцинома толстой кишки человека) при постоянной посевной концентрации клеток	
Варьируемые параметры	концентрация сенсibilизатора (от 100 мкМ и ниже)	
	режим облучения светом: Dt (от 15 мин до 18 ч)	доза света (от 5 до 20 Дж/см ²) кратность (однократно, многократно)
	время роста культуры после облучения (24, 48 ч)	
Варианты тестирования	облучение в среде инкубации, содержащей сенсibilизатор	
	облучение после замены среды инкубации на среду, не содержащую сенсibilизатор	
Контроли	без воздействия	
	только сенсibilизатора	
	только облучение	
	референс-препарат (официальный фотосенсibilизатор)	
Методы оценки выживаемости клеток	метод подсчета жизнеспособных клеток с трипановым синим или другими витальными красителями	
	МТТ-тест	

Критерии оценки фото- и цитотоксического действия:	ИК50 — концентрация сенсibilизатора, при которой наблюдается ингибирование роста культуры на 50%	
	ИК90 — концентрация сенсibilизатора, при которой наблюдается ингибирование роста культуры на 90%	

В качестве контролей используют постановки исследований в аналогичных условиях при инкубации клеток без сенсibilизатора и без облучения (контроль 1), при инкубации клеток с сенсibilизатором, но без облучения («темновой» контроль — контроль 2), при инкубации клеток без добавления сенсibilизатора, но с облучением (контроль на воздействие света — контроль 3).

Оценку эффективности проводят, используя метод подсчета клеток или МТТ-тест.

Критериями оценки цитотоксического действия являются величины ИК₅₀ и ИК₉₀ — концентрации сенсibilизатора, при которых наблюдается ингибирование роста клеток культуры на 50% и 90%, соответственно.

Высокоэффективные фотосенсibilизаторы характеризуются низкими величинами ИК₅₀ и ИК₉₀ — от 10⁻⁵ М и ниже.

1.2. Скрининг фотосенсibilизаторов *in vivo*

Исследования на данном этапе целесообразно проводить с использованием субстанции сенсibilизатора, приготовление которой для введения животному в наибольшей степени приближено к предполагаемой лекарственной форме препарата. Используемый растворитель должен быть разрешен для клинического применения у человека в соответствии с предполагаемым способом введения. Если существуют несколько вариантов растворителей, отбор оптимального из них целесообразно провести уже на этом этапе.

Параметры изучения фотосенсibilизаторов по системе скрининга в модельных исследованиях на животных приведены в таблице 2.

На начальном этапе в системе *in vivo* возможно использование одной опухолевой модели, чувствительной к ФДТ (используемые нами модели перечислены в табл. 2). Выбор опухолевой модели может осуществляться в соответствии с задачами исследования и материально-техническими возможностями. Место инокуляции опухолевого материала выбирают таким образом, чтобы исключить повреждение внутренних органов животного при облучении. Рекомендуется прививать опухоль подкожно на наружную поверхность бедра.

Изучение фотоиндуцированной противоопухолевой активности красителя следует начинать, используя внутривенный способ введения фотосенсibilизатора в двух-трех дозах. Выбор стартовых доз осуществляется исходя из максимально переносимой дозы (МПД). Если МПД недостижима вследствие низкой токсичности соединения или его ограниченной растворимости, рекомендуется использовать дозы от 10 мг/кг и ниже.

Рекомендуемые интервалы времени между введением сенсibilизатора и облучением — 5 мин, 2 ч и 24 ч. Воздействие светом, длина волны которого должна соответствовать максимуму поглощения сенсibilизатора, проводится при одной фиксированной плотности мощности и постоянной плотности энергии. В случае использования лазерных и светодиодных источников излучения плотность мощности выбирают в диапазоне от 50 до 100 мВт/см², а плотность энергии — в диапазоне от 45 до 180 Дж/см². При использовании ламповых источников с широкополосными фильтрами параметры облучения выбирают в диапазоне от 200 до 300 мВт/см² и в диапазоне от 180 до 270 Дж/см² соответственно.

Критериями оценки противоопухолевой фотоиндуцированной эффективности фотосенсibilизаторов являются параметры, общепринятые в экспериментальной онкологии при

изучении противоопухолевых цитотоксических средств. Это — торможение роста опухоли (ТРО) более 70%, увеличение продолжительности жизни животных-опухоленосителей (УПЖ) более 50%, а также коэффициент их излеченности (КИ) более 50 % [7].

Таблица 2

Скрининг сенсibilизаторов для фотодинамической терапии в системе *in vivo*

Модели:	карцинома легких Льюис (LLC), мыши BDF ₁	
	саркома 37 (S37), мыши BDF ₁	метод инокуляции опухоли — подкожно на бедро начало воздействия — 6–7 день роста опухоли
Фотодинамическая терапия: Варьируемые параметры	доза фотосенсибилизатора	
	интервал времени между введением фотосенсибилизатора и облучением (5 мин, 2 ч, 24 ч)	
Критерии оценки	кинетика роста опухоли, см ³	
	торможение роста опухоли, %	
	увеличение продолжительности жизни, %	
	излеченность, %	
Контроли	только фотосенсибилизатор	
	только облучение	
	без воздействия	

Если при выбранных условиях наблюдается гибель животных от фототоксического шока или развитие травмирующих животное отсроченных реакций (ампутация конечности), рекомендуется снижение дозы тестируемого сенсibilизатора. Токсичные дозы и режимы исключаются из дальнейшего исследования.

При отсутствии специфической фотоиндуцированной активности для исключения ложно-отрицательных результатов целесообразно исследование интервалов времени от 2 до 24 ч, а также более длительных интервалов — 48 ч и более.

Фотосенсибилизатор, проявивший высокую фототоксичность в системе *in vitro* и противоопухолевую активность в системе *in vivo* без проявлений токсичности как при облучении, так и без него, может быть рекомендован для дальнейшего, более глубокого исследования по расширенной схеме.

1.2.1. Углубленное изучение фотосенсибилизаторов *in vivo*

Параметры изучения фотосенсибилизаторов на животных по углубленной схеме приведены в таблице 3.

В этом исследовании, во-первых, варьируют дозу фотосенсибилизатора и интервалы времени между его введением и световым воздействием в более широких пределах при постоянных плотности мощности и плотности энергии. Это позволяет определить диапазон доз фотосенсибилизатора и интервалов времени, соответствующих максимальному противоопухолевому эффекту, при заданных параметрах облучения.

Во-вторых, изучают эффекты ФДТ в зависимости от параметров светового воздействия. Для этого на одной модели с использованием эффективных доз фотосенсибилизатора и интервалов времени варьируют плотность мощности и дозу света.

Результатом этого исследования является определение эффективных экспериментальных терапевтических режимов с использованием данного фотосенсибилизатора.

Поскольку одним из основных критериев оценки перспективности фотосенсибилизатора является селективность его накопления в опухоли по сравнению с окружающими тканями и длительность удержания в органах и тканях, важным аспектом является изучение биораспределения соединения. Данное исследование целесообразно проводить на нескольких перевиваемых опухолях животных различного гистогенеза.

Большинство фотосенсибилизаторов способны флуоресцировать при введении в организм, что позволяет их детектировать при помощи лазерной контактной спектроскопии. Для возбуждения флуоресценции фотосенсибилизаторов используют лазеры с длиной волны генерации, соответствующей полосе поглощения в спектре возбуждения фотосенсибилизатора.

Исследования начинают с использования терапевтической дозы фотосенсибилизатора. Если при этом высокая интенсивность флуоресценции в тканях не позволяет провести измерение специфического сигнала, дозу снижают.

Специфическую флуоресценцию у интактных животных измеряют в извлеченных органах и тканях через 1, 7, 14 суток, 1, 1,5, 3 и 6 месяцев. Полученные данные позволяют оценить фармакокинетику фотосенсибилизатора и, в частности, длительность удержания фотоактивной формы соединения в коже, что позволяет прогнозировать его потенциальную кожную фототоксичность.

У животных-опухоленосителей флуоресценцию измеряют в опухоли и окружающих нормальных тканях (коже и мышце) через 5 с, 5, 15, 30 мин, 1, 2, 4, 24, 48 и 72 ч. Оценивают интенсивность нормированной флуоресценции (Φ_n) фотосенсибилизатора в тканях и рассчитывают отношение между Φ_n в опухоли и в нормальных тканях, определяя, таким образом, показатели селективности накопления фотосенсибилизатора: $\Phi_n_{\text{опухоль}}/\Phi_n_{\text{кожа}}$ и $\Phi_n_{\text{опухоль}}/\Phi_n_{\text{мышца}}$. Высокая селективность накопления в опухоли является одним из факторов, обеспечивающих наиболее избирательное поражение опухолевого очага при световом воздействии, а также может быть основанием для того, чтобы рассматривать данный фотосенсибилизатор как перспективный для флуоресцентной диагностики.

Таблица 3

Углубленное изучение эффективности сенсбилизаторов для фотодинамической терапии в системе in vivo

Модели	опухоль Эрлиха (ОЭ), мыши BDF ₁	
	карцинома легких Льюис (LLC), мыши BDF ₁	
	саркома 37 (S37), мыши BDF ₁	
	меланома B16 (B16), мыши BDF ₁	
	карцинома толстой кишки C-26 (C-26), мыши BALB/C	
	слизистый альвеолярный рак печени (PC-1), неинбредные крысы	метод инокуляции опухоли — подкожно на бедро начало воздействия — 6–7 день роста опухоли
Фотодинамическая терапия:		
Варьируемые параметры	доза фотосенсибилизатора	

	интервал времени между введением фотосенсибилизатора и облучением	
	плотность мощности	
	плотность энергии	
Критерии оценки	кинетика роста опухоли, см ³	
	торможение роста опухоли, %	
	увеличение продолжительности жизни, %	
	излеченность, %	
Контроли:	только фотосенсибилизатор	
	только облучение	
	без воздействия	
Флуоресцентный анализ:		
Варьируемые параметры	доза фотосенсибилизатора (от 0,1 до 10 мг/кг веса);	
	время регистрации флуоресценции в опухоли и окружающей ткани (от 5 с до 72 ч);	
	время регистрации флуоресценции в коже и внутренних органах (от 1 сут до 6 месяцев)	
Оцениваемые показатели	уровень нормированной флуоресценции в опухолевом очаге;	
	показатель селективности $\frac{\Phi_{\text{н}} \text{ опухоль}}{\Phi_{\text{н}} \text{ кожа}}$ и $\frac{\Phi_{\text{н}} \text{ опухоль}}{\Phi_{\text{н}} \text{ мышца}}$	
	уровень нормированной флуоресценции в коже и внутренних органах (от 1 сут до 6 месяцев).	

1.3. Доклиническое изучение фотосенсибилизирующего лекарственного средства на основе перспективной субстанции

Этот этап программы включает разработку лекарственной и потребительской формы препарата на основе стандартной субстанции красителя, его стандартизацию по физико-химическим и биологическим параметрам, а также изучение его специфической активности (биораспределения, фотоиндуцированной противоопухолевой эффективности) и безвредности («острая», «субхроническая», «хроническая» токсичность, алергизирующие свойства, местнораздражающее действие, кожная фототоксичность, иммунотоксичность, репродуктивная токсичность, оценка мутагенных свойств; см. рисунок 1).

Изучение специфической активности препарата проводят аналогично таковому для стандартной перспективной субстанции (см. этап II) на 3–4 моделях опухолей различного гистогенеза с использованием наиболее эффективных терапевтических режимов. Фотосенсибилизатор можно считать высокоэффективным, если при использовании этих моделей результаты исследования удовлетворяют одному из следующих критериев: излеченность животных (КИ) составляет от 50 до 100%; увеличение продолжительности жизни живот-



Рисунок 1. Этапы доклинического изучения препаратов для фотодинамической терапии злокачественных новообразований

ных (УПЖ) — от 50% и более; торможение роста опухоли в течение 14–20 дней составляет не менее 80%. Приоритетным критерием оценки является излеченность животных.

Безвредность ЛС оценивают в соответствии с «Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия ЛС» в отсутствии светового воздействия.

На данном этапе исследования фотосенсибилизаторов желательны также изучение механизма противоопухолевого действия ФДТ с использованием конкретного фотосенсибилизатора. Информативным методом является изучение распределения красителя в ткани-мишени, а именно — накопление фотосенсибилизатора в стенках кровеносных сосудов, строме или паренхиме опухоли, что может определять основную мишень поражения ткани при облучении светом и преимущественный вклад прямого или опосредованного механизма повреждения опухоли при ФДТ.

Изучение микрораспределения флуорохрома в ткани осуществимо с использованием методики на основе флуоресцентной микроспектроскопии. Данный подход позволяет не только дифференцировать происхождение флуоресценции из отдельных структур ткани, но и получить количественную информацию о содержании фотосенсибилизатора в ткани-мишени. Метод предполагает использование специализированной установки для конфокальной сканирующей микроспектроскопии, оснащенной спектрографом, микроскопом, предметным столиком с электронной системой микропозиционирования и системой детекции. Материалом для измерений служат криостатные срезы органов и/или тканей животных, приготовленные после введения фотосенсибилизатора. Возбуждение флуоресценции фотосенсибилизаторов осуществляют лазером с соответствующей длиной волны. После измерения флуоресценции срезы докрашивают гематоксилином и эозином для идентификации тканевых структур. Спектральные изображения подвергаются обработке, позволяющей выделить специфический сигнал, и распределение специфической флуоресценции сопоставляется с соответствующими участками срезов, окрашенных гистологическими красителями. Концентрацию фотосенсибилизатора выражают в условных единицах, соответствующих интенсивности флуоресценции флуорохрома, или в единицах концентрации (мг/мл, моль/мл), после измерения интенсивности флуоресценции данного соединения в соответствующих калибровочных растворах. Оценку содержания фотосенсибилизатора в определенном типе ткани проводят на основании расчета средних величин по результатам измерения не менее чем 6 сканированных областей на серийных срезах.

2. Материально-техническое обеспечение изучения новых фотосенсибилизаторов

2.1. Методика исследования *in vitro*

Культуры клеток. Исследования проводят на клетках культур эпидермоидной карциномы гортаноглотки человека (HEp2), аденокарциномы легкого человека (A549), карциномы толстой кишки человека (HT 29). Сертифицированные клеточные линии предоставляются НИИ вирусологии им. Д.И. Ивановского РАМН.

Клетки культивируют в 25 см² флаконах на соответствующей среде при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% двуокиси углерода. Снятие клеток с поверхности культуральных флаконов проводят теплым раствором Версена в течении 3–5 мин. Открепившиеся клетки суспендируют в среде и в отдельной аликвоте определяют общее количество жизнеспособных клеточных элементов, окрашивая клетки раствором трипанового синего. Клетки засевают на новые флаконы в концентрации 5'10⁴–1'10⁵ клеток/мл. Пассирование всех клеточных линий проводят 2 раза в неделю. В работе используются клеточные линии от 3 до 18 пассажей.

Фотодинамическое воздействие. Для экспериментов клетки засевают в лунки двух 96-луночных микропланшетов по 100 мкл в соответствующей концентрации (для определения фототоксичности и «темновой» цитотоксичности соединения, планшеты №1 и №2 соответственно).

Количество засеянных лунок и их расположение на планшете №1 определяются размерами участка на планшете, на котором обеспечивается равномерное его освещение при определенной плотности мощности. Границы этого участка предварительно оценивают при помощи измерителя мощности.

Через 24 ч после посева в лунки планшета вносят по 50 мкл раствора красителя в последовательных разведениях, приготовленных на среде инкубации, не содержащей ЭТС. На этом же планшете размещают лунки, в которые добавляют по 50 мкл среды, не содержащей фотосенсибилизатор (контроль 3). После соответствующего времени инкубации проводят световое воздействие.

В качестве источника оптического излучения возможно применение галогеновой лампы (мощность 500 Вт). Требуемый спектральный диапазон светового излучения создают при помощи фильтров, пропускание которых должно максимально соответствовать спектральному диапазону поглощения сенсибилизатора: ЗС-8 (1,450–620 и ³1000 нм), КС-10 (1³600 нм), КС-13 (1³640 нм) и др. Облучение проводится через водный фильтр толщиной 5 см, оснащенный системой циркуляции жидкости. Время облучения рассчитывается исходя из плотности мощности и заданной плотности энергии. После облучения светом клетки инкубируют в стандартных условиях в течение 24 ч.

Для оценки цитотоксической активности клетки на планшете № 2 инкубируют с красителем и в отсутствие красителя в затемненных условиях соответствующее время (контроли 2 и 3).

При всех вариантах постановки эксперимента изучаемое соединение тестируют в трех параллельных пробах не менее 3-х раз.

Оценку выживаемости клеток проводят как визуально, оценивая с помощью световой микроскопии морфологические изменения клеток, так и колориметрическим методом с использованием МТТ-теста [6].

Уровень ингибирования роста (ИР) клеток в культуре вычисляют по формуле:

$$\text{ИР (\%)} = [(\text{OD}_k - \text{OD}_0) / \text{OD}_k] \times 100\%,$$

где OD_0 — оптическая плотность в опытных лунках; OD_k — оптическая плотность в контрольных лунках без воздействия.

2.2. Исследования фотодинамической активности *in vivo*

Животные. Исследования проводят на мышах линии Balb/c, самках; C57Bl/6, самцах и самках; гибридах 1-го поколения BDF1 (C57Bl/6 x DBA), самках; нелинейных мышах SHK, самках. Животные и их содержание должны соответствовать требованиям, предъявляемым к экспериментальной лабораторной практике.

Опухолевые модели. В качестве опухолевых моделей используют опухоль Эрлиха (ОЭ) — спонтанный рак молочной железы мыши, эпидермоидную карциному легких Льюис (LLC), меланому В16 (В16), саркому 37 (S37) и карциному толстой кишки С26. Опухолевые штаммы поддерживаются *in vivo* (ОЭ, LLC, В16 и S37) и *in vitro* (С26) на линейных животных. В исследованиях используют 2-ую — 8-ую генерации перевиваемых опухолей *in vivo*.

Опухоли перевивают лабораторным животным по стандартным общепринятым методикам для лейкоемий, асцитных и солидных перевиваемых опухолей [10]. Взвесь опухолевых клеток или ткани опухоли в питательной среде 199 (или растворе Хенкса), полученной от соответствующих доноров, используют *ex tempore*.

Опухоль Эрлиха (ОЭ) прививают мышам BDF1 подкожно по $(0,5-1,0) \times 10^6$ клеток на животное в объеме 0,05 мл. Штамм поддерживают в асцитном варианте на нелинейных мышах SHK, которым прививают внутрибрюшинно по 0,25 мл асцитической жидкости через 7–9 дней.

Эпидермоидную карциному легкого Льюис (LLC) прививают подкожно мышам BDF1 по 10–20 мг опухолевой ткани на животное в объеме 0,05 мл. Штамм поддерживают на

мышьях самцах С57BL/6J путем внутримышечной перевивки по 20 мг опухолевой ткани на мышшь в объеме 0,3 мл через 9–11 дней.

Меланому В16 (В16) прививают подкожно мышам ВDF1 по 10–20 мг опухолевой ткани на мышшь в объеме 0,05 мл. Штамм поддерживают на мышьях-самках С57BL/6 путем внутримышечной перевивки по 30–60 мг опухолевой ткани на мышшь в объеме 0,3–0,5 мл через 12–14 дней.

Саркому 37 (S37) прививают подкожно мышам ВDF1 по $(1,0–1,5) \times 10^6$ клеток на мышшь в объеме 0,05 мл. Штамм поддерживают в асцитном варианте на нелинейных мышьях SHK, которым прививают внутрибрюшинно по 0,25 мл асцитической жидкости через 7–9 дней.

Альвеолярный рак печени (РС-1) прививают неинбредным белым крысам по 50–100 мг опухолевой ткани на животное в объеме 0,3 мл. Штамм поддерживают на неинбредных белых крысах, самцах (масса 85 ± 15 г), которым прививают подкожно на бок по 100 мг/животное опухолевой ткани в объеме 0,5 мл подкожно через 30 дней.

Клетки культуры аденокарциномы толстой кишки С26 культивируют в 25 см² флаконах на среде DMEM с добавлением 2 мМ L-глутамин и 8% ЭТС, при 37 °С в увлажненной атмосфере, содержащей 5% двуокиси углерода. Пассирование проводят 2 раза в неделю. Клетки, снятые с флакона Версеном, имплантируют подкожно мышам Balb/c по $(0,05–0,1) \times 10^6$ клеток на животное в 0,05 мл среды DMEM. В работе используются клеточные линии от 3 до 18 пассажей.

2.2.1. Изучение биораспределения методом флуоресцентной спектроскопии

Исследования проводят на интактных животных и на мышьях с перевиваемыми злокачественными опухолями (ОЭ, LLC, В16, S37, С26), инокулированными на наружную поверхность бедра подкожно.

Регистрацию флуоресценции в тканях животных проводят контактным способом с использованием лазерного спектрального анализатора. Принципы и порядок работы с конкретной моделью оборудования должны соответствовать инструкции, предоставляемой производителем.

Измерения флуоресценции тканей проводят *in vivo*, а также *ex vivo* в извлеченных образцах органов и тканей сразу после эвтаназии животного дислокацией шейных позвонков. На каждый срок наблюдения проводят измерение флуоресценции в органах и тканях не менее чем у трех животных. При измерении флуоресценции с поверхности кожи за 3–4 дня до проведения исследований шерстный покров предварительно удаляют путем химической депиляции.

Принимая во внимание возможное выгорание сенсibilизатора, продолжительность регистрации одного флуоресцентного спектра не должна превышать 2–3 с. Для получения достоверных результатов при регистрации флуоресценции рекомендуется проводить не менее 3 точечных измерений в интересующих участках ткани.

2.2.2. Изучение эффективности ФДТ

Работа с животными. Исследования проводят на мышьях с перевиваемыми злокачественными опухолями (ОЭ, LLC, В16, S37, С26), инокулированными на наружную поверхность бедра подкожно. Перед сеансом ФДТ в зоне роста опухоли шерстный покров удаляют путем химической депиляции.

На моделях мышинных опухолей ФДТ проводят на 6–7 день роста опухоли, когда размеры опухоли в диаметре достигают 0,4–0,6 см. На модели опухоли крыс РС-1 ФДТ проводят по достижении опухолью размера в диаметре $0,8 \pm 0,2$ см. Фотосенсibilизаторы вводят системно (внутривенно) за определенное время до сеанса ФДТ. ФДТ проводят под общим обезболиванием. Во время процедуры животное фиксируют и накрывают защитным экраном из черной фотобумаги. Световое пятно должно перекрывать не только область пальпируемой опухоли, но и захватывать окружающие ткани.

День проведения ФДТ считают нулевым днем фотодинамического воздействия.

Аппаратура. При проведении ФДТ используют дистанционный метод светового воздействия. Для облучения должны быть использованы ламповые, лазерные или светодиодные источники, выбор которых определяется длиной волны оптического поглощения фотосенсибилизатора. Принципы и порядок работы с конкретной моделью источника излучения должны соответствовать инструкции, предоставляемой производителем. Необходимым условием является контроль плотности мощности светового потока с использованием измерителя мощности.

Параметры светового воздействия (плотность мощности, время облучения) подбираются экспериментальным путем в зависимости от имеющегося источника излучения и наблюдаемых эффектов воздействия.

Расстояние между торцом световода и объектом должно быть таким, чтобы у контрольных животных, которым не вводили фотосенсибилизатора, после облучения не развивался термический ожог как следствие воздействия тепловой составляющей излучения источника.

Расчет световых доз осуществляют по формуле

$$W_s = P_s \times t, P_s = P/S,$$

где W_s – заданная плотность энергии (Дж/см²), P_s – заданная плотность мощности (Вт/см²), P – мощность на выходе световода (Вт), S – площадь светового пятна (см²), t – время облучения (сек).

Критерии оценки эффективности ФДТ:

1. Ингибирование роста опухоли.

Степень ингибирования роста опухоли определяют по торможению роста опухоли (ТРО), которое вычисляют по формуле:

$$\text{ТРО} = [(V_{\text{контроль}} - V_{\text{опыта}}) / V_{\text{контроль}}] \times 100\%,$$

где V – средний объем опухоли (мм³) в получавшей препарат и контрольной группах животных, соответственно.

2. Увеличение продолжительности жизни (УПЖ).

УПЖ определяют, исходя из средней продолжительности жизни (СПЖ, дни) животных в получавшей препарат и контрольных группах. Вычисление проводят по формуле:

$$\text{УПЖ} = [(СПЖ_{\text{опыта}} - СПЖ_{\text{контроля}}) / СПЖ_{\text{контроля}}] \times 100\%.$$

3. Излеченность животных.

Критерий излеченности (КИ) оценивают через 90 сут после проведения ФДТ и рассчитывают по формуле:

$$\text{КИ} = [N_i / N_o] \times 100\%,$$

где N_i – количество излеченных животных в получавшей препарат группе; N_o – общее количество животных в получавшей препарат группе.

Статистическая обработка результатов. Для установления степени вариабельности вычисленных показателей и достоверности выявленных различий результаты подвергаются статистической обработке. Если полученные результаты подчиняются законам нормального распределения, возможно применение параметрических методов статистики (метод Стьюдента-Фишера, критерий Т, доверительный интервал). В противном случае используется любой из непараметрических методов статистической обработки результатов (критерий U, критерий Уилкоксона и т.п.). Различия можно считать достоверными при $p \leq 0,05$.

Заключение

Фармакологические вещества могут быть отнесены к специфическим фотосенсибилизирующим средствам, если в условиях моделей *in vivo* на мышах со стандартными перевиваемыми злокачественными опухолями различного гистогенеза они обладают доказанной фотоиндуцированной противоопухолевой активностью.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Красновский А.А. Синглетный кислород и первичные механизмы фотодинамического действия оптического излучения // Итоги науки и техники. Сер.: Современные проблемы лазерной физики. ВИНТИ, 1990, №3, с. 630-635.
2. Окислительный стресс, под ред. Меньшиковой Е.Б., Ланкина В.З., Венлова Н.К. и др., Москва, 2006.
3. Dougherty J. Photodynamic Therapy / Ed. T. Patrice Nantes. France, 2004.
4. Bonnet R., Chemical aspects of PDT, Gordon and Bruech Science Publishes., 2000.
5. Якубовская Р.И. Аласенс — новый отечественный препарат для флуоресцентной диагностики и фотодинамической терапии злокачественных новообразований (предклинические испытания) // Онкология на рубеже XXI века. Возможности и перспективы. 1999, с. 457-456.
6. Mausmann T. // Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. // J. Immunol. Methods, 1983, vol. 65, p. 55-63.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. — М., 2005, с. 637-651.
8. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. Под ред. Р.У. Хабриева. — М., 2005, с. 41-54, 54-69, 70-86.
9. Цимбал Т.И., Петрова А.С., Зубрихина Г.Н., Кочеткова О.Д. // Лабораторное дело, 1985, №4, с. 220-223.

Список сокращений

аФК — активные формы кислорода
5-АЛК — 5-аминолевулиновая кислота
в/в — внутривенно
в/м — внутримышечно
ИР — уровень ингибирования роста клеток в культуре
ИК₅₀ — концентрация, при которой наблюдается 50% гибель клеток в культуре
ИК₉₀ — концентрация, при которой наблюдается 90% гибель клеток в культуре
КИ — критерий излеченности
LLC — карцинома легких Льюис
OD₀ — оптическая плотность в опыте
OD_к — оптическая плотность в контроле
ОСТ — окружающая соединительная ткань
п/к — подкожно
ППХ — протопорфирин IX
СПЖ — средняя продолжительность жизни животных
ТРО — торможение роста опухоли
УПЖ — увеличение продолжительности жизни животных
ФДТ — фотодинамическая терапия
Фн — нормированная флуоресценция
ЭТС — эмбриональная телячья сыворотка

ГЛАВА 41

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ПЕРОРАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ ЛЕЧЕНИЯ САХАРНОГО ДИАБЕТА

*Составители: акад. РАМН, З. Д. Н. РФ, проф. А.А. Спасов; д. б. н. М.П. Воронкова;
к. м. н. Г.Л. Снугур; Е.В. Тибирькова; к. м. н. И.А. Проскурина*

Введение

В патогенезе сахарного диабета 2 типа (СД 2) обычно лежат четыре составляющих: периферическая инсулинорезистентность (особенно скелетных мышц, печени, жировой ткани), избыточная продукция глюкозы печенью, нарушение секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы, снижение продукции инкретиннов. На ранних этапах заболевания концентрация глюкозы в плазме крови сохраняется нормальной, несмотря на инсулинорезистентность, так как β -клетки компенсаторно увеличивают выброс инсулина. Однако впоследствии эти возможности истощаются и толерантность к глюкозе увеличивается, что вызывает повышение постпрандиальной концентрации глюкозы. В дальнейшем инсулинорезистентность и нарушение секреции инсулина приводят к тому, что глюконеогенез не подавляется и развивается гипергликемия натощак. Внешние или разрешающие факторы СД 2 многочисленны, некоторыми из них могут быть ожирение (особенно центральный или абдоминальный тип) с сопутствующими метаболической инсулинорезистентностью, повышенной экспрессией генов ГЛЮТ-2 и глюкокиназы.

В связи с этим тактически обоснованным следует признать применение препаратов, направленно влияющих на то или иное патогенетическое звено как сахарного диабета 1 типа (СД 1) так и СД 2. Наряду с инсулинотерапией важное значение придается пероральным гипогликемическим препаратам, которые занимают лидирующее положение по частоте назначения в клинической практике. Спектр современных средств этой группы достаточно широк: секретогены инсулина (производные сульфонилмочевины; несульфонилмочевинные стимуляторы секреции инсулина — прандиальные регуляторы гликемии (меглитиниды); ингибиторы продукции глюкозы печенью (бигуаниды); ингибиторы α -глюкозидазы; сенситайзеры инсулина (тиазолидиндионы). Рациональные подходы, используемые для любой парадигмы создания новых гипогликемических средств, могут быть разделены на две категории — модифицирование известных или создание оригинальных молекул с гипогликемической активностью, поиск агонистов биомиметической действия препаратов. Это указывает на применимость молекулярных исследований для анализа взаимодействия рецептора и ЛС, изучения особенностей механизма действия потенциальных гипогликемических препаратов. Ожидается, что идентификация цели и ее структурный анализ будут способствовать облегчению поиска новых гипогликемических средств. Исходя из вышесказанного, можно выделить следующие основные направления поиска потенциальных гипогликемических средств: **нормализация действия инсулина и снижение инсулинорезистентности** — регуляция секреции гастроинтестинальных гормонов (инкретиномиметики: синтетические аналоги GLP-1 и GIP; вещества, повышающие чувствительность рецепторов GLP-1 и GIP; инкретин-активаторы: ингибиторы DPP-4); **восстановление физиологических механизмов секреции инсулина** —

деактивация инсулинового рецептора через протеинтирозинфосфатазу; инозитол-5 фосфатаза и $I\kappa\beta$ -киназа- β , отрицательные регуляторы сигнальных путей инсулина; агонисты $\beta 3$ -адренергических рецепторов; отрицательная регуляция киназного фактора — NF- κ B; **угнетение образования глюкозы печенью** (экспрессия гена глюкокиназы; ингибирование гликогенфосфорилазы; антагонисты глюкагоновых рецепторов; угнетение глюкозо-6-фосфатазы и фруктозо-1,6-фосфатазы (мутантной формой фруктозо-2,6-бисфосфата; антагонист канабионидного рецептора CB1 — снижает инсулинорезистентность); **нормализация нарушенного обмена липидов** (применение адипонектина; активация AMP-протеинкиназы, использование агонистов рецепторов PPAR α , агонисты PPAR β двойного действия; **β -цитопротекция** (использование никотинамида для уменьшения повреждающего действия β -цитотоксинов).

Несмотря на то, что поиск новых гипогликемических средств ведется с помощью современных технологий, для подтверждения наличия гипогликемической активности все новые фармакологические средства (ФС) в обязательном порядке должны быть протестированы на животных (в условиях целого организма). Ниже приводятся методы, которые позволяют получить объективные данные о гипогликемической активности новых веществ.

1. Фармакологические исследования новых гипогликемических лекарственных средств

Поиск потенциальных гипогликемических веществ может вестись по нескольким направлениям, например: модификация химической структуры известных ЛС и поиск веществ с гипогликемической активностью среди вновь синтезированных оригинальных химических соединений.

1.1. Первичная оценка эффективности потенциальных гипогликемических веществ

Задачами классических подходов к первичной оценке помимо выявления гипогликемической активности у группы вновь синтезированных соединений или веществ природного/иногo происхождения, является выявление специфичности их действия на углеводный обмен в условиях *in vivo*, сопоставление величины эффективности изучаемого средства с эталонным(и) препаратами, определение острой токсичности препаратов-лидеров.

Для реализации данных задач исследователю прежде всего необходимо решить, обладает ли исследуемое вещество гипогликемической активностью при однократном пероральном введении на двух видах животных (желательно грызунах и негрызунах). Для повышения процента обнаружения соединений со специфическим действием рекомендуется проведение выборочных исследований на интактных животных, животных с экспериментальным сахарным диабетом (СД) или с гипергликемией, моделированной экстрапанкреатическим путем. Если новое соединение принадлежит к известному классу лекарственных веществ, то гипогликемический эффект оценивается на одном виде животных, чувствительных к гипогликемическому действию соединений данной группы.

Необходимо учесть, что обнаружение гипогликемического эффекта зависит не только от дозы используемого соединения, но и от условий его всасывания в ЖКТ. Так, у грызунов — кроликов, крыс, мышей, морских свинок — по сравнению с человеком и плотоядными животными (собаками, кошками) замедлена всасываемость препаратов сульфонилмочевины из-за незначительного количества щелочей в кишечнике. Поэтому этим животным препараты сульфонилмочевины должны вводиться в виде натриевой соли, или с добавлением щелочи — достаточное ее добавление способствует быстрому всасыванию препаратов сульфонилмочевины, которые, соединяясь с щелочами, образуют хорошо растворимые соли [8]. Поскольку выраженность гипогликемического эффекта пероральных гипогликемических препаратов у интактных животных зависит от характе-

ра питания, то стандартный корм (ГОСТ Р 50258-92) должен быть видоспецифичным и полнорационным, сбалансированным по содержанию питательных веществ. Для мелких лабораторных грызунов (крысы) возможно использование экструдированных гранулированных кормов для щенков мелких пород.

Первичные исследования фармакологической активности проводятся на животных, получающих в течение минимум одной недели стандартный рацион питания с пищевой депривацией за 16–18 ч до проведения эксперимента у кроликов, собак и других крупных животных, за 4–6 ч — у мышей, крыс и других мелких животных. Этот срок достаточен для исключения влияния пищи на всасываемость испытуемого вещества. Более длительное голодание снижает выраженность гипогликемического эффекта, так как в эти периоды концентрация циркулирующего в крови инсулина недостаточна для контроля печеночного глюконеогенеза, а скорость продукции глюкозы не соответствует скорости ее утилизации.

Выполняется 2–3 серии экспериментов на животных с использованием не менее 3 доз, отражающих диапазон, при котором у животных данного вида ($n \geq 7$) реализуется гипогликемический эффект без признаков побочного действия. Испытуемое вещество вводится перорально при помощи зонда. Доза препарата, частота и длительность взятия проб крови для определения глюкозы устанавливается экспериментатором с учетом класса соединения, а также вида животных. Обязательно наличие контрольной группы (животные получающие растворитель), рекомендуется одновременное проведение опытов с известным гипогликемическим препаратом из группы, к которой принадлежит испытуемое вещество (при исследовании новых веществ, относящихся к классу химических соединений, неиспользуемых ранее в клинике, применяется наиболее эффективный известный пероральный гипогликемический препарат). Целесообразность такого «двойного» контроля обусловлена временной организацией эндокринных циркадных систем, так как установлены факты суточных и годичных изменений секреции инсулина и его биологического эффекта [8].

При проведении экспериментов первоначально оценивается эффективность вещества при однократном введении, производится оценка продолжительности гипогликемического действия вещества и его степень, соотнесенная к гипогликемическому действию известного перорального гипогликемического препарата, исследованного параллельно. Если эксперименты проводятся на половозрелых белых неинбредных/линейных крысах-самцах/самках массой 210–250 г, то пробы крови забираются из хвостовой вены крыс до введения; после введения — через 30 и 60 мин в течение 8 ч. У кроликов (самки/самцы массой 4–4,5 кг) и более крупных животных (собаках массой 8–12 кг) пробы крови берут (из краевой ушной вены, атравматичным способом) до- и после перорального введения вещества, ежедневно в течение 8–12 ч. В аликвотах определяют содержание глюкозы в плазме капиллярной крови, измерения могут производиться глюкозооксидазным способом.

В последующем оценивается дозозависимый эффект (не менее 3 доз) фармакологического вещества и описывается выраженность гипогликемического эффекта по сравнению с исходным периодом и его степень, соотнесенная к гипогликемическому действию известного перорального гипогликемического препарата, исследуемого параллельно.

Необходимо попытаться получить предварительные данные о механизме гипогликемического действия ФС и его влияния на базовые показатели углеводного обмена. Одним из таких легкодоступных методов является определение плазменной концентрации инсулина или С-пептида (иммуноферментативным способом), который широко используется как косвенный способ оценки чувствительности к инсулину. Обычно оценивается концентрация инсулина как натощак, так и после введения вещества. В ряде исследований используется гликемический индекс, рассчитываемый по соотношению содержания глюкозы в крови натощак к инсулину натощак, а также инсулин-глюкозный индекс

(ИГТ), представляющий собой отношение площади под кривой концентрации инсулина к площади под кривой концентрации глюкозы.

На завершающем этапе проводится количественная оценка эффекта изучаемого вещества и препарата сравнения ($ЭД_{20}$; $ЭД_{50}$) и определяется значение терапевтического индекса (ТИ): $ТИ = ЛД_{50} / ЭД_{20}$. Острая токсичность ($ЛД_{50}$) определяется на том же виде животных и при том же пути введения, на котором производились исследования гипогликемической активности и который может быть впоследствии рекомендован для КИ [11].

На основании экспериментов на этапе скрининга исследователь должен получить предварительные сведения о силе и эффективности гипогликемического действия нового фармакологического вещества, сравнить широту его терапевтического действия с адекватно выбранным препаратом сравнения, получить некоторое представление о возможных побочных эффектах вещества. После этого возможно проведение следующей фазы доклинических исследований нового ФС.

1.2. Исследование эффективности фармакологического средства на толерантность к нагрузке глюкозой

Изучение специфического эффекта вещества (при однократном и повторном его введении) должно быть проведено на интактных животных и на животных с гипергликемией, полученной как путем нагрузки глюкозой, так и созданием дефицита инсулина в организме. В последнем случае для оценки действия инсулина может быть предложено использование соотношения концентраций глюкозы и инсулина плазмы крови натощак. Известно, что концентрация инсулина зависит не только от чувствительности к нему тканей, но и от скорости его секреции, распределения и разрушения. С другой стороны, концентрация глюкозы крови зависит от множества факторов (например, от концентрации глюкагона в поральной системе). В рутинной практике большую ценность представляет определение соотношения тощачковой и постпрандиальной концентрации инсулина плазмы крови. В связи с этим выделяют не прямые и прямые методы оценки действия инсулина *in vivo*. Непрямые методы (эндогенные) направлены на оценку эффектов эндогенного инсулина. К ним относятся пероральный глюкозотолерантный тест (ПГТТ), внутривенный глюкозотолерантный тест (ВВГТТ). При проведении прямых методов (экзогенные) осуществляют инфузию инсулина и оценивают его эффекты на метаболизм глюкозы. Среди них — инсулиновый тест толерантности (ИТТ) и облигатный эугликемический гиперинсулинемический клэмп-метод (ЭГК). Однако в связи с инвазивностью и методической сложностью ЭГК используется только в специальных исследованиях и не подходит для широкого применения. Наиболее простыми, экономичными и широко используемыми, в том числе и для первоначальных фармакологических исследований, являются методы ВВГТТ, ПГТТ.

1.2.1. Непрямые методы оценки эффектов эндогенного инсулина

Методика проведения теста ПГТТ: проводят измерение глюкозы и инсулина крови натощак и через 30, 60, 90 и 120 мин. после внутрижелудочного введения глюкозы в дозе 3 г/кг [3]. Величину гипогликемического действия оценивают исходя из степени снижения площади под кривой «концентрация глюкозы — время». Для оценки изменения концентрации глюкозы между 15 и 60 минутами используют критерий толерантности к глюкозе (К-критерий), вычисляющийся по формуле $K = \ln 2 \times 100 / T_{1/2}$ [20].

Методика проведения теста ВВГТТ: внутривенную нагрузку глюкозой (1 г/кг, в/в) проводят по методу Р. Masiello [18] с отбором проб крови в течение 90 мин с 15-минутными интервалами для определения концентраций глюкозы и инсулина плазмы. В одном варианте метода чувствительность к инсулину оценивают по наклону кривой снижения плазменной концентрации глюкозы, измеренной после внутривенного введения глюкозы (так называемая константа снижения глюкозы или константа Конарда, k).

В другом варианте, по методу Bergman и соавт., учитывают изменение концентрации как инсулина, так и глюкозы во время ВВГТТ, используя соотношение инсулина и глюкозы, описывая кривую поглощения глюкозы с помощью дифференциальных уравнений кинетики глюкозы и эффектов инсулина. Предполагается, что внутривенно введенная глюкоза быстро распространяется по клеткам, а плазменная глюкоза снижается по одному из двух механизмов: независимо от возрастающей концентрации инсулина (индекс эффективности глюкозы SG) и под действием инсулина (индекс чувствительности к инсулину SI). Основные преимущества ВВГТТ по сравнению с ПГТТ заключаются в том, что, во-первых, абсорбция глюкозы происходит быстрее и не зависит от функционирования кишечной стенки. Во-вторых, этот метод позволяет оценивать обе фазы секреции инсулина, т.е. глюкозозависимый механизм выделения инсулина. В-третьих, ВВГТТ — это динамический тест, позволяющий воспроизвести нормальную физиологическую реакцию действия инсулина от начала до конца.

1.2.2. Прямые методы оценки эффектов эндогенного инсулина

Методика проведения теста ИТТ: для определения динамики чувствительности организма к биологическому действию инсулина исследуется гликемия до и через 10, 30, 60, 120, 180 мин после внутривенного (крупным животным) или внутривентриального (мышам, крысам) введения инсулина в дозе 0,1–0,3 ЕД/кг массы тела. Сроки введения перорального гипогликемического вещества до начала инсулиновой пробы определяются скоростью развития появления специфического эффекта соединения (инъекция инсулина проводится на фоне развившегося гипогликемического эффекта исследуемого вещества).

Методика проведения ЭГК: после определения базальной концентрации инсулина (натошак) начинается его постоянная внутривенная инфузия (скорость введения 10 МЕ/кг/мин), при этом каждые 5 мин. определяется концентрация глюкозы артериальной крови. Через 120 мин., когда скорость инфузии глюкозы равна скорости периферической утилизации глюкозы, происходит эффективное подавление эндогенного синтеза глюкозы, и далее, по существу, вся метаболизируемая глюкоза имеет экзогенное происхождение. В этом состоянии осуществляется расчет общего потребления глюкозы организмом в мл/мин/кг на 1 мкЕд инсулина, которое и характеризует чувствительность тканей к инсулину.

Учитывая литературные данные о возможности экстрапанкреатической реализации гипогликемического эффекта пероральных гипогликемических средств и необходимости составления патогенетически обоснованных показаний для клинического применения новых гипогликемических соединений, целесообразно определить вызываемую последними динамику чувствительности организма к биологическому действию инсулина.

Методика проведения теста чувствительности к инсулину: исследуется гликемия до и через 10, 30, 60, 120, 180 мин. после внутривенного (крупным животным) или внутривентриального (мышам и крысам) введения инсулина в дозе 0,1–0,3 ЕД/кг массы тела. Сроки введения перорального гипогликемического вещества до начала инсулиновой пробы определяются скоростью появления специфического эффекта соединения (инсулиновая проба проводится на фоне развившегося гипогликемического эффекта исследуемого вещества).

2. Изучение механизма действия веществ с выявленной гипогликемической активностью

2.1. Схема поиска веществ панкреатического действия

Использование β -цитотоксинов является общепринятым для моделирования различных состояний углеводного обмена, в зависимости от доз повреждающего агента, соответствующих определенным клиническим классам диабета (явный СД различной формы: СД 1, СД 2, смешанная форма СД и нарушенная толерантность к углеводам, при-

равниваемая к латентному или скрытому СД) [21]. При изучении веществ центрального механизма действия, т.е. веществ, оказывающих непосредственное влияние на функциональное состояние инсулинпродуцирующего аппарата поджелудочной железы, исследования проводят на животных с экспериментальным СД.

Целесообразно использовать экспериментальные модели (таблица 1) как острой (панкреатэктомия, нейтрализация инсулина введением антител к нему), так и хронической (генетические и негенетические модели СД) инсулиновой недостаточности. Выбор модели СД определяется экспериментатором с учетом принадлежности нового вещества к тому или иному классу химических соединений и описанному в литературе их механизма действия. В случае изучения нового вещества, принадлежащего к ранее не применявшемуся в клинике оригинальному классу соединений, необходимо исследовать его специфическое действие на интактных животных и на животных с инсулиновой недостаточностью.

Таблица 1

Генетические и негенетические формы СД

Экспериментальная модель СД	Вид животных	Тип СД	Автор
негенетические формы СД			
Панкреатэктомия	собаки	СД 1	Banting FG and Best CH (1922)
Интоксикация аллоксаном 60–200 мг/кг, однократно, в/в, в/бр	кролики крысы собаки	Смешанная форма (1–2 типа)	Baily CC, Baily OT (1943) Katsumata K, Katsumata(1990) Geisen K (1988)
Интоксикация стрептозотоцином 35 -70 мг/кг, однократно, в/бр, в/в	крысы	Смешанная форма (1–2 типа)	Rakieten N, Rakieten ML, Nadkarni MV (1963)
Иммуннозависимый СД — полным адьювантом Фрейнда 0,2 мл однократно, п/к, и стрептозотоцином 25 мг/кг, в/в, ежедневно, 5 дней	крысы	СД 1	B. Ziegler et al. (1990)
Интоксикация стрептозотоцином 65 мг/кг в/бр, в/в через 15 мин после в/бр введения никотинамида (230 мг/кг)	крысы	СД 2	Sh.Islam, Y.Choi, 2007
Генетические формы СД			
Спонтанно-диабетические животные	Bio Breeding rat WBN\Kob Rat Zucker – fatt rat WDF\Ta-Fa rat Cohen Diabetic rat	СД 1 (аутоиммунный) СД 1, СД 2 СД 2 СД 2 СД 2	Nakhooda AF, Like AA, Chapel CL et al. (1978) Nakama K., et al. (1985) Yogihashi S, Wada RI, et al. (1993) Ikeda H, Shino A, et al. (1981) Cohen AM, Teitelbaum A, Saliternik R (1972)

2.1.1. Влияние нового фармакологического вещества на базовые показатели углеводного обмена и на толерантность к нагрузке глюкозой

В ходе эксперимента производится оценка влияния нового фармакологического вещества на базовые показатели углеводного обмена и на толерантность к нагрузке глюкозой:

- оценка влияния средства на **базовые** показатели углеводного обмена — концентрации глюкозы, инсулина и С-пептида, гликозилированного гемоглобина; и на **вспомогательные** показатели: наличие/отсутствие глюкозурии, кетонурии или ацетонурии, микроальбуминурии или протеинурии.
- исследование эффективности ФС на толерантность к нагрузке глюкозой — пероральный [3] и внутривенный [4,18] глюкозотолерантные тесты.

2.1.2. Изучение действия пероральных гипогликемических веществ на образование и выделение инсулина при их хроническом введении

При изучении пероральных сахароснижающих веществ, действующих на уровне β -клеток, желательным определением их эффекта на образование и выделение инсулина при их хроническом введении (30–56 дней) для прогнозирования влияния испытуемого соединения на состояние компенсаторных свойств β -клеток и обеспечение преимущественного выбора препаратов для долгосрочного применения. Целесообразность сочетанного определения биосинтеза и секреции инсулина обоснована данными литературы о возможности диссоциированного влияния ЛП на оба эти процесса в условиях целого организма и тормозящим действием отдельных гипогликемических сульфаниламидов на образование инсулина, приводящим к снижению его содержания в поджелудочной железе.

2.1.3. Изучение показателей жирового обмена

Другим аспектом исследования, наряду с определением гликемии и других показателей, является изучение показателей жирового обмена (холестерин, липопротеины, неэстерифицированные жирные кислоты и др.). Концентрации общего холестерина и триглицеридов определяют в сыворотке крови, а холестерин липопротеинов высокой плотности в супернатанте после преципитации липопротеинов, содержащих липопротеины низкой (ХС — ЛПНП) и очень низкой плотности, с использованием ферментативных колориметрических тестов, и вычисляют значение концентрации ХС — ЛПНП и индекс атерогенности. Изменения этих показателей и сравнение их с показателями углеводного обмена позволяют более конкретно осветить гипогликемическое действие нового ФС и четко определить показания к его применению.

2.2. Схема поиска веществ с экстрапанкреатическим механизмом действия

Известно, что помимо прямого воздействия на систему утилизации углеводов, гипогликемические средства могут повышать чувствительность тканей к инсулину через другие механизмы. Например, производные тиазолидиндиона оказывают влияние на рецепторном уровне, усиливая связывания инсулина с рецепторами в органах-мишенях — мышцах и жировой ткани, а также на пострецепторном уровне, влияя не только на переносчиков глюкозы, но и на ее метаболизм. Известны препараты, которые при курсовом введении крысам с ожирением увеличивают чувствительность тканей к инсулину и, как следствие этого, улучшают метаболизм глюкозы в мышечной ткани и на изолированных адипоцитах тучных крыс. Есть данные, полученные в исследованиях на крысах с аллоксановым и стрептозотоциновым диабетом (в тех случаях, когда первопричиной СД является инсулиновая недостаточность), об уменьшении влияния инсулина на утилизацию глюкозы, а также на синтез липидов в изолированной жировой ткани, на синтез гликогена в диафрагме. Поэтому для уточнения механизма действия изучаемого вещества на β -клетки поджелудочной железы и на процесс утилизации глюкозы необходимо провести ряд экспериментов, в которых исключены отдельные факторы регуляции гомеостаза глюкозы. Данные исследования целесообразно проводить на нескольких экспериментальных моделях: на панкреатэктомированных животных (модель полного отсутствия эндогенного инсулина) и на моделях экспериментального ожирения, инсулинорезистентности и латентной формы СД.

2.2.1. Изучение влияния нового фармакологического вещества на эффекты экзогенно введенного инсулина

В эксперименте используются панкреатэктомизированные собаки. Удаление поджелудочной железы у собак проводят под гексеналовым наркозом (50 мг/кг внутривенно) в асептических условиях. Исследование проводят на 7 день после операции, когда концентрация глюкозы в крови собак достигает 23–26 ммоль/л, к этому времени у животных развиваются клинические признаки, характерные для тяжелой формы СД, основной причиной которого является дефицит инсулина. Изучаемые вещества (новое вещество и препарат сравнения) вводят (в эффективной дозе) перорально, пробы крови забирают натошак из вены передней конечности до и через 0,5 ч и через 1; 2; 4, 6, 8 ч после введения растворов веществ. Далее животным контрольной группы вводят инсулин внутривенно в дозе 0,4 ЕД/кг в течение 3 ч с 30-минутными интервалами. Пробы крови для определения глюкозы отбирают через каждый час до исчезновения гипогликемического эффекта инсулина у контрольных животных и прекращения гипогликемического действия у исследуемых соединений, введенных совместно с инсулином.

2.2.2. Изучение гипогликемической активности фармакологического средства

При изучении гипогликемической активности ФС у крыс с экспериментальным ожирением патологию моделируют на крысах (самцах/самках), находящихся на диете с повышенным содержанием жиров (более 80% от общей калорийности рациона). Животных с ожирением тестируют на толерантность к углеводам при внутривенной нагрузке глюкозой в дозе 1 г/кг (п. 1.2).

2.2.3. Действие исследуемого средства на концентрацию глюкозы в крови крыс с экспериментальным синдромом инсулинорезистентности

Патологию моделируют двукратным ежедневным подкожным введением инсулина из расчета 2 ЕД/жив на протяжении 28 дней. Для оценки состояния углеводного обмена используют ПГТТ (п. 1.2). Крыс с нарушенной толерантностью к углеводам проверяют на наличие инсулинорезистентности, используя пробу Химсворда, позволяющую оценить чувствительность тканей к инсулину. Раствор глюкозы вводят перорально из расчета 30 г/м² поверхности тела. Инсулин вводится внутримышечно (5 ЕД/м² поверхности тела), концентрацию глюкозы в крови определяют в течение 1 ч каждые 10 мин., после чего проводят анализ гликемических кривых. Отсутствие изменений в площади под кривой «глюкоза–время» в течение 1 ч после нагрузки свидетельствует о снижении чувствительности к инсулину у данного животного. Влияние средства на изменение концентрации глюкозы в крови оценивают натошак.

Животных с нарушенной толерантностью к углеводам (по результатам проведения глюкозотолерантного теста) и синдромом инсулинорезистентности (диагностика с использованием пробы Химсворда) делят на три группы: первой — вводят однократно перорально исследуемое вещество, второй группе — препарат сравнения, а третьей — растворитель (отстоянная вода). За динамикой изменений концентрации глюкозы в крови наблюдают на фоне ПГТТ глюкозой в течение последующих 2 ч, отбирая пробы крови через каждые 30 мин.

2.2.4. Влияние изучаемого вещества при пероральном применении на концентрацию глюкозы в крови проводят на крысах с латентной формой СД

Патологию моделируют, применяя преддиабетогенные дозы (35 мг/кг) свежеприготовленного на цитратном буфере раствора стрептозотоцина («Sigma»). Цитотоксин вводят внутривенно натошак. Через неделю после инъекции проводят диагностику патологии, используя пероральный нагрузочный тест глюкозой. Животных для экспериментов отбирают в соответствии с критериями, позволяющими констатировать нарушенную толерантность к углеводам. С этой целью также используют ПГТТ и ВТТТ

(п. 1.2). Замена смешанной пищи пероральным введением глюкозы не влияет на основные этапы регуляции секреции инсулина через энтероинсулярную ось и имитирует процессы, происходящие при естественном употреблении пищи.

2.3. Схема поиска веществ, влияющих на всасывание глюкозы в ЖКТ

Внепанкреатические эффекты некоторых групп гипогликемических препаратов могут быть связаны с их способностью замедлять всасывание глюкозы и повышать скорость ее метаболизма в кишечнике, связанную с ингибированием энергозависимого транспорта глюкозы. Например, ингибиторы глюкозидаз препятствуют расщеплению олигополисахаридов до моносахаридов путем подавления активности сахаролитических ферментов слизистой тонкого кишечника, замедляя процессы всасывания углеводов в кишечнике и препятствуя постпрандиальному повышению концентрации глюкозы. Для изучения веществ с такого рода активностью предлагается проведение следующих экспериментов.

2.3.1. Исследование влияния нового вещества

на процессы всасывания глюкозы и жирных кислот из тонкого кишечника крыс

В ходе эксперимента исследуемое вещество вводят перорально в течение 7 дней в эффективной дозе. Канюлированный участок тонкой кишки перфузируют раствором Рингера рН 7,6 с добавлением 0,5 мМ олеиновой кислоты, 5 мМ глюкозы, 10 мМ натрия таурохолатата с постоянной скоростью потока 3 мл/мин в течение 30 мин при температуре 37 °С. Далее, через каждые 15 мин от начала перфузии производится забор двух аликвот по 0,5 мл. для подсчета концентрации олеиновой кислоты и глюкозы (ингибиторный эффект поглощения вычисляется соотношением количества поглощенной олеиновой кислоты или глюкозы (мМ/л на 30 см кишечника) в час в контрольной пробе к экспериментальной пробе. Предлагается проведение трех блоков исследования: 1) изучение влияния вещества на процессы всасывания глюкозы и олеиновой кислоты; 2) действие вещества на поглощение глюкозы и олеиновой кислоты при перфузии кишечника у крыс при введении исследуемого вещества в буфер ex tempore в различных концентрациях; 3) влияние исследуемого вещества в эффективной дозе при недельном пероральном введении на процессы восстановления всасывания глюкозы и олеиновой кислоты после отмены препарата в течение 2, 6, 12 и 24 ч при перфузии кишечника крыс.

2.3.2. Действие препаратов на всасывание олигосахаридов в кишечнике оценивают по Н.°Луо [17], при этом лабораторным животным оцениваемое вещество вводится перорально за 1 ч до проведения эксперимента. В качестве препарата сравнения используют акарбозу в дозе 10 мг/кг. Мальтозу вводят перорально в 50% растворе в дозе 3 г/кг. Пробы крови для определения гликемии забирают до введения мальтозы, через 30 мин после введения и затем в течение двух часов с 30 минутными интервалами. Содержание глюкозы определяют ферментативным методом. Замедление процессов всасывания и процессов расщепления дисахаров оценивают по постпрандиальному повышению глюкозы, исходя из расчета площади под кривой из степени снижения площади под кривой «концентрация глюкозы–время», рассчитанной по правилу трапеций.

2.4. Схема поиска веществ — цитопротекторов β -клеток, стимуляторов регенерации и апоптоза β -эндокриноцитов

Стратегия профилактики стрептозотоцинового СД включает несколько подходов, среди которых наибольшую распространенность получило применение никотинамида [8]. Механизм протекторного эффекта данного препарата включает антиоксидантное действие, ингибирование активности ПАРП, а также прямое восстановление уровня никотинамидадениндинуклеотида (НАД). При применении стрептозотоцина в качестве цитотоксина для моделирования экспериментальной формы сахарного диабета в β -клетках

накапливается большое количество его метаболита — оксида азота, который превращается в пероксонитрит и ведет к активации свободнорадикального окисления [4]. Интенсификация этих процессов способствует нарушению целостности клеточных мембран и снижению эффективности окислительного фосфорилирования в митохондриях, а также возникновению точечных мутаций ДНК. Кроме того, стрептозотозин и его метаболиты являются алкилирующими агентами, вызывающими метилирование остатков гуанина и аденина в ДНК. Одним из ключевых ферментов, обеспечивающих репарацию при точечных мутациях, является поли-(АДФ-рибозо)-полимераза (ПАРП), которая формирует разрывы нити ДНК и замещает дефектное основание хвостом из поли-АДФ-рибозы. Этот процесс энергозависим и протекает с расходом НАД, что ведет к истощению клеточного пула НАД и некрозу клетки.

Методика изучения цитопротекторного действия: СД 2 моделируют стрептозотозином (в/бр, 65 мг/кг) после предварительного (за 15 мин) введения никотинамида (в/бр, 230 мг/кг). В данном случае целесообразно вводить изучаемые препараты в течение длительного времени (30–90 дней). Концентрацию глюкозы определяют на 3, 7 и далее через каждые 7 сут ферментативным способом и производят регистрацию количества потребляемой животными воды в сутки и массы тела (мониторинг 1 раз в неделю в течение всего исследования). Один раз в 14 дней проводят ПГГТ. Тестируемые препарат и препарат сравнения вводят перорально в эффективных дозах. Концентрацию глюкозы оценивают через 2, 4, 6, 8 ч после введения препаратов.

Несмотря на пристальное внимание исследователей к проблеме СД, остаются недостаточно ясными многие механизмы его развития и особенности изменения морфологических структур в поджелудочной железе [E. Bertalli, 2005]. Поджелудочные железы человека и крысы различаются по анатомическому строению, однако единый план гистологической организации железы у позвоночных животных и человека позволяет моделировать патологические процессы и изучать лекарственный патоморфоз. Имеющиеся в современной литературе данные свидетельствуют не только о том, что СД развивается при повреждении β -эндокриноцитов, связанном с воспалительными или аутоиммунными процессами в поджелудочной железе, но также может быть проявлением нарушения баланса между процессами апоптоза и пролиферации клеток панкреатических островков (ПО) [12].

Морфологическое исследование поджелудочной железы крыс проводят по общепринятым гистологическим методикам [12] с оценкой размеров ядер β -клеток и площади, занимаемой α - β -клетками, размеров и объемной доли островка Лангенгарса (ОЛ) по отношению к экзокринной части органа. *Пролиферативную активность* β -клеток ОЛ оценивают по количеству митозов с помощью моноклональных антител к ядерному антигену пролиферирующих клеток PCNA и Ki-67. Для выявления *процессов апоптоза* используют поликлональные антитела к Вах и к каспазе-3; и моноклональные антитела к P53 и к Bcl-2. Визуализирование проводят непрямым иммунопероксидазным методом с высокотемпературной и ферментной демаскировкой антигенов по С.В. Петрову, Н.Т. Райхлину (2004). Проводят анализ морфологических показателей и оценивают количество иммунопозитивных клеток к общему количеству клеток ОЛ.

2.5. Дополнительные методы исследования

В ходе проведения дополнительных исследований потенциально эффективных гипогликемических средств у испытателя может возникнуть необходимость в проведении ряда дополнительных исследований, направленных на углубленное изучение как механизма действия ФС, так и на его влияние на отдельные звенья патогенеза СД, например: исследование влияния ФС на реологические свойства крови, на процессы свободнорадикального окисления липидов и др. Эксперименты по изучению острой и хронической токсичности, а также специфических видов токсичности: эмбрио-гонадотоксичности, иммунотоксичности, аллергенности, мутагенности проводятся в соответствии с методи-

ческими рекомендациями доклинических (токсикологических) исследований и правилами лабораторной практики в РФ (Приказ Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н).

3. Моделирование отдаленных последствий сахарного диабета: лекарственные препараты и их поиск

Высокая и постоянно увеличивающаяся заболеваемость СД в масштабах всего мира, очевидно, приводит к увеличению распространенности его хронических осложнений. В качестве фактора, лимитирующего качество и продолжительность жизни, выступают поздние осложнения СД: нейропатия, ретинопатия, нефропатия и макроангиопатия.

Доказано, что основой профилактики и лечения осложнений СД является коррекция углеводного обмена и достижение нормогликемии [22]. Однако жесткий контроль уровня гликемии у большинства пациентов недостижим и может сопровождаться увеличением частоты гипогликемий. Кроме того, на практике врачи сталкиваются со случаями длительных и выраженных осложнений СД, регресс которых только под действием нормализации углеводного обмена будет неизмеримо долгим или невозможным.

С учетом современных представлений о механизмах развития осложнений СД разработан ряд патогенетически обоснованных методик их лечения:

- назначение ингибиторов альдоредуктазы — фермента, ответственного за превращение внутриклеточной глюкозы в сорбитол (изодибут);
- агентов, подавляющих образование конечных продуктов избыточного гликозилирования (аминогуанидин, бенфотиамин);
- ингибиторов свободнорадикального окисления (α -липовая кислота, флавоноиды);
- факторов роста нерва для регенерации нервного волокна и восстановления аксонального транспорта при диабетической полинейропатии;
- ингибитора васкулярного эндотелиального фактора роста — митогена, ответственного за новообразование сосудов и их повышенную проницаемость при диабетической ретинопатии (РКС-beta);

— препаратов из группы гликозаминогликанов, восстанавливающих структуру базальной мембраны клубочков почек при диабетической нефропатии (сулодексид) и т.д.

Однако, несмотря на широкий спектр препаратов для патогенетического лечения осложнений СД, возникают проблемы, связанные с использованием существующих средств: некоторые препараты при КИ оказались токсичными; полученные одними авторами результаты не всегда находят подтверждение в других исследованиях; изучение действия других препаратов еще не закончено. Это объясняет интерес к экспериментальным исследованиям веществ, оказывающих патогенетическое действие на лечение осложнений СД.

3.1. Экспериментальная модель для изучения отдаленных последствий сахарного диабета

Наиболее часто используемой моделью осложнений СД является стрептозотоциновый диабет. Различные виды животных значительно различаются по чувствительности к стрептозотоцину. Максимальной чувствительностью обладают крысы. Оптимальная диабетогенная доза для крыс массой 175–200 г составляет 60 мг/кг; 201–249 г — 55 мг/кг; 250–299 г — 50 мг/кг; > 300 г — 45 мг/кг [16]. Диабетогенные дозы для других видов грызунов (например, мышей) значительно выше (порядка 140–160 мг/кг).

Введение стрептозотоцина, растворенного *ex tempore*, рекомендуют осуществлять однократно внутривенно или внутривентально в кислой среде цитратного буфера (рН 4,5) [21]. В исследование берут животных с уровнем гликемии через 72 ч после введения стрептозотоцина ≥ 15 ммоль/л [16]. С целью моделирования осложнений СД используют крыс со стрептозотоциновым диабетом длительностью 6–12 месяцев.

В ходе эксперимента оценивают: массу тела — ежедневно, потребление животными воды и корма — ежедневно [23], концентрацию глюкозы в плазме крови — еженедельно [16]. Изучаемые вещества вводят животным с минимальной длительностью СД 6 месяцев с развившимися диабетическими поражениями.

3.2. Изучение диабетической полинейропатии

Характерным осложнением СД являются различные варианты нейропатии. Около 70% поражений нервной системы при СД приходится на полинейропатию, характеризующуюся диффузным или локальным повреждением периферических соматических нервных волокон.

О формировании диабетической полинейропатии судят по изменению порогов тактильной и болевой чувствительности у крыс через 4 недели после инъекции стрептозотоцина на моделях тактильной аллодинии, механической гипералгезии, в формалиновом тесте, а также в тесте «горячая пластина» [16]. Исследования проводят ежемесячно.

Термином «аллодиния» обозначают феномен появления болевых ощущений в ответ на неноцицептивные раздражители. *Тактильную аллодинию* у крыс оценивают регистрацией давления, при котором животные отдергивают правую заднюю лапу, избегая воздействия нарастающих по степени стимулов. Для этого серию волосков Фрея в диапазоне давления от 0,6 до 15 г прикладывают перпендикулярно подошвенной поверхности лапы с таким давлением, чтобы волосок согнулся. Отрыв лапы расценивают как положительный ответ. 50% порог отдергивания лапы определяют последовательным увеличением и уменьшением силы стимула и анализом данных по отдергиванию лапы с использованием непараметрического критерия Dixon.

Под «гипералгезией» понимают появление интенсивного болевого ощущения при нанесении легкого ноцицептивного раздражителя [3]. Определение болевого порога у крыс на *модели механической гипералгезии* проводят с применением постоянно увеличивающегося механического давления, точно приложенного к правой задней лапе. Величиной болевого порога является вес, при достижении которого проявляется рефлекс отдергивания лапы [15].

При проведении формалинового теста очаг боли создают путем подкожной инъекции 0,05 мл 0,5% раствора формалина в тыльную поверхность стопы правой задней конечности. Поведенческие ответные реакции наблюдают с 5-минутными интервалами в течение 60 мин после введения формалина подсчетом числа вздрагиваний животного [16].

В тесте «горячая пластина» оценку болевой чувствительности проводят по величине порогов болевых реакций, о которых судят по латентному периоду реакции избавления у животного (облизывание задней лапы), помещенного на пластину, нагретую до температуры 55°С.

У крыс через 4 недели после инъекции стрептозотоцина регистрируются проявления диабетической полинейропатии в виде снижения порогов тактильной и болевой чувствительности, что обусловлено нарушением функции пораженных нервных волокон при СД [16].

3.3. Изучение диабетической ретинопатии

Диабетическая ретинопатия является естественным результатом развития патологических изменений в микрососудистой сети центральной артерии сетчатки при СД. О наличии диабетических изменений глазного яблока можно косвенно судить по состоянию переднего отрезка, так как сосудистые изменения переднего отрезка глаза при СД развиваются параллельно с сосудистыми изменениями сетчатки и нередко предшествуют им.

Микрогемодинамику конъюнктивы крыс изучают в пределах глазной щели биомикроскопически с помощью фотоцелевой лампы. Анализируют форму и калибр сосудов, их ход, наличие микроаневризм, фон и густоту сосудистого рисунка, характер кровотока, агрегацию форменных элементов крови, периваскулярные изменения. Для получения

количественного представления о состоянии микроциркуляции используют оценочную шкалу в баллах [6]. Определяют общий конъюнктивный индекс и его парциальные величины: сосудистый, вне- и внутрисосудистый индексы.

Начиная с 8–10 недель стрептозотоцинового диабета, появляются сужение артериол и расширение венул, крупнозернистая агрегация форменных элементов крови. К 9–12 месяцам присоединяются микроаневризмы и кровоизлияния, участки гемостаза и тромбоза; у 75% животных развивается катаракта.

Существенным дополнением к описанному методу изучения диабетической ретинопатии является гистологическое исследование препаратов сетчатки [23]. Первым и наиболее характерным патоморфологическим признаком диабетической ретинопатии считаются рассеянные мешотчатые аневризматические расширения капилляров. Микроаневризмы можно выявить при гистологическом исследовании препаратов сетчатки крыс с 6-месячным стрептозотоциновым диабетом [23].

3.4. Изучение диабетической нефропатии

Диабетическая нефропатия представляет собой специфическое поражение почек, прежде всего сосудов клубочков (гломерулярная микроангиопатия). О развитии диабетической нефропатии судят по наличию микроальбуминурии [9]. Увеличение проницаемости клубочковых капилляров возникает вследствие роста гломерулярного давления и изменений толщины и заряда базальной мембраны [8]. Через 5 месяцев после инъекции стрептозотоцина у диабетических крыс отмечается экскреция альбумина с мочой, что является подтверждением развития ранней стадии диабетической нефропатии. С целью верификации микрососудистой патологии в почках желательное проведение морфологического исследования для выявления характерного признака диабетической нефропатии — утолщения базальной мембраны клубочковых капилляров, являющимся следствием изменения ее биохимического состава [8]. Утолщение стенок капилляров приводит к сужению их просвета с последующей обтурацией. При длительности стрептозотоцинового диабета до 9–12 месяцев, по данным гистологических исследований, наблюдаются глубокие дистрофические и деструктивные изменения в почках. Ведущим признаком повреждения является гломерулосклероз.

3.5. Изучение диабетической кардиомиопатии

Под термином «диабетическая кардиомиопатия» понимают поражение сердца, в основе механизма которого лежат метаболические факторы, нарушение нервной регуляции, микроангиопатия и, по мере развития атеросклероза венечных сосудов, ишемия миокарда. Характерным признаком диабетической кардиомиопатии является снижение сократительной функции левого желудочка. Выраженность нарушений сократительной активности миокарда левого желудочка при стрептозотоциновом диабете оценивают методом эхокардиографии каждые 4 недели [23]. Регистрируют следующие основные показатели: конечно-диастолический и конечно-систолический диаметры левого желудочка, изменение толщины задней стенки и фракцию укорочения. После 24 недель стрептозотоцинового диабета при эхокардиографическом исследовании отмечают уменьшение толщины стенки и увеличение внутреннего диаметра левого желудочка. Систолическая функция левого желудочка в данные сроки остается неизменной, в то время как диастолическая функция значительно снижается [23].

Сократительную функцию сердца изучают также с использованием препарата изолированного извольномически сокращающегося сердца [23]. Сердца извлекают и перфузируют по Лангендорфу раствором Кребса-Хензелейта в условиях постоянного давления. Через 30 мин перфузии, необходимой для стабилизации работы сердца, записывают кривую давления в левом желудочке. На основании графического материала рассчитывают скорость сокращения ($+dP/dt$) и расслабления ($-dP/dt$) левого желудочка. У крыс после 24 недель стрептозотоцинового диабета регистрируется снижение $+dP/dt$ и $-dP/dt$, что

свидетельствует о характерном для диабетической кардиомиопатии уменьшении сократительной функции миокарда.

3.6. Изучение гемореологических нарушений при диабетических ангиопатиях

В патогенезе диабетических ангиопатий большое внимание уделяется гемореологическим нарушениям. Нарушения текучести крови выявляются по результатам прямых методов исследования вязкости крови. О функциональном состоянии тромбоцитов судят на основании определения спонтанной и АДФ-индуцированной агрегации тромбоцитов. Наблюдается определенная согласованность между изменениями реологических свойств крови и «сладж»-феноменом конъюнктивальных сосудов [6], который возникает на 8–10 неделях стрептозотоцинового диабета. Повышение агрегации тромбоцитов отмечается у крыс с 6-недельным стрептозотоциновым диабетом.

Заключение

Таким образом, современная экспериментальная фармакология располагает комплексом методов моделирования и диагностики осложнений СД, благодаря чему становится возможным поиск веществ для их патогенетического лечения.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицу как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Основы количественной патологической анатомии / Г.Г. Автандилов. — М.: Медицина, 2002. — 240 с.
2. Антонова К.В. Роль и место тиоктовой кислоты в комплексной терапии сахарного диабета / К.В. Антонова, Л.В. Недосугова // Трудный пациент. — 2008. — Т. 6. — № 10. — С. 17–22.
3. Баринов А.Н. Лечение невропатических болевых синдромов / А.Н. Баринов // Укр. мед. часопис. — 2007. — Т. 2. — №58. — С. 91–96.
4. Бондарь И.А. Гликозаминогликаны и диабетическая нефропатия / И.А. Бондарь, В.В. Климонтов // Проблемы эндокринологии. — 2004. — Т. 50. — № 2. — С. 29–34.
5. Гурьева И.В. Новые возможности применения бенфотиамина для предупреждения сосудистых осложнений сахарного диабета / И.В. Гурьева // Русский медицинский журнал. — 2005. — №15. — С. 999–1002.
6. Данилова А.И. Состояние кровообращения в сосудах конъюнктивы глаза у больных сахарным диабетом / А.И. Данилова // Проблемы эндокринологии. — 1980. — № 4. — С. 9–14.
7. Данилова А.И. Состояние микроциркуляции у родственников больных СД / А.И. Данилова // Проблемы эндокринологии. — 1979. — №2. — С. 20–24.
8. Полторац В.В. Влияние витамина Е на развитие нефропатии у кроликов с дитизоновым диабетом / В.В. Полторац, Н.И. Горбенко [и др.] // Проблемы эндокринологии. — 2000. — № 6. — С. 41–44.
9. Преображенский Д.В. Микроальбуминурия: диагностическое, клиническое и прогностическое значение (часть первая) / Д.В. Преображенский, А.В. Маренич [и др.] // Российский кардиологический журнал. — 2000. — №3. — С. 79–86.
10. Руководство по иммуногистохимической диагностике опухолей человека / 3-е изд., доп. и перераб.; под общ. ред. С.В. Петрова, Н.Т. Райхлина. — Казань, 2004. — 456 с.
11. Руководство по проведению клинических исследований новых лекарственных средств / под ред. Р.У. Хабриева, И.А. Денисова, В.Б. Герасимова, В.Г. Кукеса. — М., 2005. — 359 с.
12. Севергина Э.С. Инсулинзависимый сахарный диабет — взгляд морфолога / Э.С. Севергина. — М.: Издательский дом «Видар», 2002. — 152 с., ил.
13. Северина Т.И. Трометамоловая соль тиоктовой (альфа-липовой) кислоты в лечении диабетической нейропатии / Т.И. Северина, А.В. Тарасов [и др.] // Проблемы эндокринологии. — 2002. — Т. 48. — №1. — С. 18-21.

14. Функціональні методи дослідження в ендокринології / З.И. Цюхно [и др.]. — Киев: Здоровье, 1981. — 240 с.
15. Bujalska M. $\alpha 1$ - and $\alpha 2$ -adrenoreceptor antagonists in streptozotocin- and vincristine-induced hyperalgesia / M. Bujalska, M. Arazna [et al.] // Pharmacological Reports. — 2008. — Vol. 60. — P. 499–507.
16. Calcutt N.A. Modeling diabetic sensory neuropathy in rats / №.A. Calcutt // Methods in Molecular Medicine. — 2004. — Vol. 99. — P. 55–65.
17. Luo H. Inhibitory effect of voglibose and gymnemic acid on maltose absorption *in vivo* / H. Luo, T. Imoto Y. Hiji // World J Gastroenterol. — 2001. — Vol. 7, № 2. — P. 270–274.
18. Masiello P. Development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamid / P. Masiello, M. Broca [et al.] // Diabetes. — 1998. — Vol. 47. — P. 224–229.
19. Mortari M.R. Inhibition of acute nociceptive responses in rats after i.c.v. injection of Thr6-bradykinin, isolated from the venom of the social wasp, *Polybia occidentalis* / MR Mortari, AOS Cunha [et al.] // British Journal of Pharmacology. — 2007. — Vol. 151. — P. 860–869.
20. Rossetti L. Glucose toxicity / L. Rossetti, A. Giaccari // Diabetes Care — 1990. — Vol. 136. — P. 610–640.
21. Srinivasan, K. Animal models in type 2 diabetes research: An overview / K. Srinivasan, P. Ramarao // Indian J Med Res. — 2007. — Vol. 125. — P. 451–472.
22. Vincent A.M. Oxidative stress in the pathogenesis of diabetic neuropathy / A.M. Vincent, J.W. Russell [et al.] // Endocrine Reviews. — 2004. — Vol. 25. — №4. — P. 612–628.
23. Wei M. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes / M. Wei, L. Ong [et al.] // Heart, lung and circulation. — 2003. — Vol. 12. — №1. — P. 44–50.
24. Ziegler B. The possibility that pancreatic beta cell destruction leading to type 1 diabetes is initiated by the release of cytokines by polyclonal activation of the immune system / B. Ziegler, M. Ziegler // Exp Clin Endocrinol — 1990. — Vol. 95, № 1. — P. 110–111.

ГЛАВА 42

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ КОРРЕКЦИИ САХАРНОГО ДИАБЕТА, ОЖИРЕНИЯ И МЕТАБОЛИЧЕСКОГО СИНДРОМА

*Составители: д. м. н., проф. В.Г. Макаров; к. б. н. М.Н. Макарова;
к. м. н. И.А. Проскурина, д. м. н. А.Н. Богданов, к. ф. н. Д.В. Сомов*

Введение

По определению Международного Экспертного Комитета по диагностике и классификации сахарного диабета (1997), сахарный диабет — это группа метаболических (обменных) заболеваний, характеризующихся гипергликемией, которая является результатом нарушения секреции инсулина, действия инсулина или обоих этих факторов. Хроническая гипергликемия при сахарном диабете сочетается с повреждением, дисфункцией и недостаточностью различных органов, особенно глаз, почек, нервов, сердца и кровеносных сосудов. С этим связана и большая социальная значимость сахарного диабета, т.к. он приводит к ранней инвалидизации и летальности в связи с поздними сосудистыми осложнениями диабета.

Подавляющее большинство случаев сахарного диабета относится к двум обширным этиопатогенетическим категориям: сахарный диабет 1 типа и сахарный диабет 2 типа. Причина сахарного диабета 1 типа — абсолютный дефицит секреции инсулина. При сахарном диабете 2 типа причина заключается в комбинации инсулинорезистентности и неадекватного компенсаторного инсулин-секреторного ответа.

В развитие сахарного диабета вовлечены несколько патогенетических процессов: от аутоиммунного повреждения β -клеток поджелудочной железы с последующим дефицитом инсулина до нарушений, провоцирующих инсулинорезистентность. Основой нарушения метаболизма углеводов, жиров и белков при сахарном диабете является недостаточность действия инсулина в тканях-мишенях.

Модели сахарного диабета на животных делятся на генетически детерминированные, вызванные химическими или диетическими агентами или хирургическими манипуляциями и/или комбинацией этих методов. В последние годы получено большое количество новых генетически измененных линий животных, включая трансгенных, генерализованно нокаутных или нокаутных по определенным генам.

1. Индукция сахарного диабета 1 типа

В патогенезе сахарного диабета 1 типа факторы внешней и внутренней среды (вирусы, химические вещества, пищевые факторы, интерлейкин 1 β) вызывают активацию процесса свободнорадикального окисления в клетках. Под воздействием свободных радикалов белки β -клеток меняют свои природные свойства (денатурируют) и становятся антигенами для собственной иммунной системы. Повышенная чувствительность β -клеток поджелудочной железы к действию свободных радикалов объясняется тем, что в них снижена активность собственной антиоксидантной защитной системы. Свободные радикалы вызывают нарушения в структуре ДНК инсулинпродуцирующих клеток, что и приводит к последующей гибели β -клеток.

Наиболее распространенными моделями сахарного диабета 1 типа являются химически-индуцированный сахарный диабет и хирургический сахарный диабет.

1.1. Химически-индуцированный сахарный диабет

Основными агентами, избирательно поражающими β -клетки поджелудочной железы, являются аллоксан (ALX) и стрептозотозин (STZ).

Аллоксан (2, 4, 5, 6-тетраоксогексагидропиримидин) — производное мочевой кислоты. Обычно используется в форме моногидрата. Аллоксан хорошо растворим в воде и слабых растворах (рК 6,6). При рН ниже 3 аллоксан в растворе довольно устойчив при комнатной температуре. При рН 7 раствор должен сохраняться ниже 4 °С, чтобы предотвратить преобразование до аллоксановой кислоты.

Уникальная способность аллоксана избирательно уничтожать панкреатические β -клетки была впервые описана Dunn и соавторами в 1943 г. Хотя в основном причиной сахарного диабета при введении аллоксана является прямое токсическое действие на β -клетки, точный механизм его токсичности полностью не изучен. Множество исследований показали, что аллоксан разрушает целостность мембраны β -клетки. Например, аллоксан увеличивает проницаемость плазматической мембраны для внеклеточных маркеров типа маннитола и инулина. Морфологические изменения в плазматической мембране у грызунов, подвергнутых действию аллоксана, приводят к нарушению транспорта ионов через мембрану β -клеток.

Аллоксан может вводиться множеством путей, но самый эффективный и логичный — внутривенный путь. Диабетогенная доза — приблизительно 40–45 мг/кг. Аллоксан вызывает сахарный диабет у собак, кошек, овец, кроликов, крыс, мышей, обезьян, рыб, черепах, птиц. Морские свинки устойчивы к аллоксан-индуцированному сахарному диабету, причина этой невосприимчивости неизвестна.

Стрептозотозин (2-деокси-2-(3-метил-3-нитрозомочевина)) 1-D-глюкопираноза, обнаруженный в 1960 г., является метаболитом почвенного микроорганизма *Streptomyces achromogenes*.

Это вещество содержит метилнитрозомочевину, связанную в С2 положении с D-глюкозой. В кристаллическом состоянии обычно состоит из смеси α - и β -изомеров глюкозы (1:1). В водном растворе стрептозотозин быстро разлагается при нейтральном рН, и его оптимальная стабильность в растворе — рН 4. Как и аллоксан, стрептозотозин оказывает прямое токсическое действие на β -клетки, при этом участок связывания с мембраной также до конца не известен. Некоторые факты свидетельствуют, что плазматическая мембрана β -клеток повреждается стрептозотозином, приводя к морфологическим изменениям и изменениям в проницаемости клетки аналогично введению аллоксана. Поскольку стрептозотозин содержит глюкозу, можно предположить, что он связывается с рецептором глюкозы на мембране и при этом блокирует глюкозостимулируемый выброс инсулина.

Диабетогенная доза стрептозотозина приблизительно 65 мг/кг. У грызунов сахарный диабет может быть вызван многократным введением субдиабетогенной дозы. Стрептозотозин вызывает сахарный диабет у многих видов животных, включая собак, кошек, свиней, обезьян, кроликов, крыс, мышей, хомяков, и морских свинок. У грызунов эффективность стрептозотозина уменьшается с увеличением возраста животных.

*Таблица 1
Дозы и пути введения аллоксана и стрептозотозина для индукции сахарного диабета*

Агент	Вид	Доза (в мг/кг)	Ссылка
Аллоксан	Крысы	40–200 (внутривенно или внутрибрюшинно)	McNeil JH., 1999, Vogel HG, Vogel WH., 1997, Rerup CC., 1970, Kasiviswanath R. et al., 2005.

Агент	Вид	Доза (в мг/кг)	Ссылка
Аллоксан	Мыши	50–200 (внутривенно или внутрибрюшинно)	McNeil J.H., 1999, Rerup C.C., 1970, Sheng X.Q. et al., 2005.
	Кролики	100–150 (внутривенно)	McNeil J.H., 1999, Vogel H.G., Vogel W.H., 1997, Battell M.L. et al., 1999.
	Собаки	50–75 (внутривенно)	Vogel H.G., Vogel W.H., 1997, Rerup C.C., 1970.
Стрептозотоцин	Крысы	35–65 (внутривенно или внутрибрюшинно)	McNeil J.H., 1999, Ozturk Y. et al., 1996, Rerup C.C., 1970, Junod A. et al., 1967, Jones R.B. et al., 1997, PeleTounian A. et al., 1998.
	Мыши	100–200 (внутривенно или внутрибрюшинно)	McNeil J.H., 1999, Ozturk Y. et al., 1996, Rerup C.C., 1970, Battell M.L. et al., 1999, Junod A. et al., 1967.
	Хомяки	50 (внутрибрюшинно)	Miller D.L., 1990.
	Собаки	20–30 (внутривенно)	Rerup C.C., 1970, Battell M.L. et al., 1999.
	Свиньи	100–150 (внутривенно)	Battell M.L. et al., 1999, Grussner R. et al., 1993, Dufrane D. et al., 2006.
	Приматы	50–150 (внутривенно)	Battell M.L. et al., 1999, Dufrane D. et al., 2006, Theriault B.R. et al., 1999.

Стрептозотоцин — предпочтительный агент для индукции экспериментального сахарного диабета, так как имеет некоторые преимущества перед аллоксаном: относительно более длинный период полувыведения (15 мин), более длительный срок вызываемой гипергликемии, имеет хорошо охарактеризованные диабетические осложнения с менее выраженным кетозом и смертностью. Модели аллоксанового и стрептозотоцинового сахарного диабета могут быть рекомендованы для скрининга ЛП, включая препараты растительного происхождения, для демонстрации их инсулиноподобного действия, инсулинотропного действия и гипогликемической активности.

1.2. Хирургические модели сахарного диабета 1 типа

Этот метод основан на полной или частичной резекции поджелудочной железы у животных. Диабетическая модель на собаке, полученная Оскаром Минковским в результате полной резекции поджелудочной железы, была первой моделью сахарного диабета у животного и теперь редко используется для исследования. Однако частичная резекция и/или методы комбинации на животных, особенно на негрызунах, время от времени используются для исследования сахарного диабета.

Для развития сахарного диабета 1 типа требуется панкреатэктомия не менее чем на 90%. При этом наблюдается селективное ухудшение стимуляции глюкозой выброса инсулина, но нестимулированная секреция инсулина сохраняется.

Лучшая модель длительной гипергликемии или устойчивой формы сахарного диабета может быть достигнута комбинацией частичной панкреатэктомии и инъекций химических агентов, аллоксана и стрептозотоцина, животным типа собак, свиней, обезьян и других. В такой комбинации есть преимущества, поскольку это позволяет минимизировать риск ненужного неблагоприятного эффекта от применения химического агента в высокой дозе и уменьшить постоперативные осложнения. Вместе с тем в таких экспериментах необходимо учитывать панкреатическую регенерацию, которая весьма существенна и в течение 1–2 месяцев может свести гипергликемию и дефицит инсулина к минимальному уровню.

2. Индукция сахарного диабета 2 типа

Патогенез сахарного диабета 2 типа — это комплексный процесс, включающий инсулинорезистентность в печени и периферических тканях и дефект секреции инсулина β -клетками поджелудочной железы, что приводит к гипергликемии. Несмотря на генетическую предрасположенность, риск развития сахарного диабета 2 типа у людей увеличивается с возрастом, ожирением, сердечно-сосудистыми заболеваниями (артериальная гипертензия, дислипидемия), недостатком физической активности. Набор ЛП для лечения сахарного диабета ограничен инсулином и четырьмя главными классами пероральных гипогликемических средств, которые:

- стимулируют секрецию панкреатического инсулина (производные сульфонилмочевины, например, глибенкламид, гликлазид, глипизид);
- уменьшают синтез глюкозы в печени (бигуаниды, например, метформин);
- снижают всасывание глюкозы в кишечнике (ингибиторы α -глюкозидазы, например, акарбоза);
- повышают чувствительность периферических тканей к инсулину (тиазолидиндионы, например, пиоглизатон, росиглизатон).

Из-за многофакторности сахарного диабета до сих пор плохо понятен его генетический аспект, а также взаимосвязь между генетическими и экологическими факторами. Кроме того, широким КИ препятствуют очевидные этические нормы, потому что провокация болезни является невозможной. Экспериментальные модели сахарного диабета выгодны в биомедицинских исследованиях для установления механизмов заболевания и методов фармакотерапии. Животные с врожденным сахарным диабетом, у которых генетический фон гомогенен и экологические факторы управляемы, являются необходимым объектом в исследовании этого многофакторного заболевания. Большинство доступных моделей базируется на грызунах из-за их маленького размера, короткого интервала между поколениями и экономичности, однако модели на негрызунах также необходимы как ценный материал для экстраполяции полученных данных на человека.

Классификация моделей сахарного диабета 2 типа

Животные, имеющие синдром инсулинорезистентности, представлены широким диапазоном видов с генетической, экспериментальной или алиментарной причинами развития сахарного диабета.

Таблица 2

Классификация сахарного диабета 2 типа у животных

Категория модели	Тучный	Не тучный
I. Спонтанно- или генетически модифицированное животное с сахарным диабетом	ob/ob мышь db/db мышь KK мышь (Kuo Kondo) KK/Au мышь (желтые KK с ожирением) NZO мышь (Новозеландская с ожирением) NONcNZO10 мышь TSOD мышь (Tsumara Suzuki тучный диабет) M16 мышь Zucker крыса с ожирением ZDF крыса (с ожирением) SHR/N-ср крыса (спонтанно гипертензивная крыса/NIH- с ожирением)	Cohen крыса с диабетом GK (Goto-Kakizaki) крыса Torgi крыса без ожирения C57BL/6 (Акита) мутантная мышь ALS/Lt мышь (аллоксанчувствительные)

Категория модели	Тучный	Не тучный
	JCR/LA-ср крыса (Джеймс К. Рассэль) OLETF крыса (Otuska Long Evans Tokushima с ожирением) резус-обезьяна с ожирением	
II. Диета/питание индуцированный сахарный диабет у животных	Песочная крыса C57/BL 6J мышь «Колочая» мышь	—
III. Химически индуцированный сахарный диабет у животных	GTG мыши с ожирением	Низкая доза аллоксана или стрептозотоцина взрослым крысам, мышам и т.д. Неонатальное введение стрептозотоцина крысам (новорожденным)
IV. Хирургически полученные диабетические животные	VMH (вентромедиальный гипоталамус)-повреждение + диетическое ожирение у крыс	Частичная панкреатэктомия у животных, например собака, примат, свинья и крысы
V. Трансгенные / нокаутированные диабетические животные	β3-рецептор нокаутированные мыши несцепленный белок (UCP1) нокаутированные мыши	Трансгенные или нокаутированные мыши, включая гены инсулина и инсулиновые рецепторы и их компоненты вниз по сигнальному пути инсулина, например IRS-1, IRS-2, GLUT 4, PTP-1B (фосфотирозинфосфатаза) и другие. PPAR-γ ткань специфически нокаутированные мыши (активизированный рецептор пролиферации пероксисом) Глюкокиназа или GLUT-2 ген нокаутированные мыши. Человеческий островок амилоид полипептид. Сверхэкспрессия у крысы (HIP крыса)

2.1. Модели спонтанного диабета 2 типа

Спонтанно диабетические животные с сахарным диабетом 2 типа могут быть получены в результате одной или нескольких генетических мутаций, передаваемых по наследству от поколения к поколению (например, ob/ob, db/db мыши), или могут быть отобраны из аутбредных животных без сахарного диабета, через несколько поколений (например, (GK) крыса, Tsumara Suzuki диабет с ожирением (TSOD) мышь). Эти животные наследуют сахарный диабет как моногенный или мультигенный дефект. Метаболические особенности сахарного диабета в этом случае определяются либо дефектом одного гена, например в результате появления доминирующего гена: желтая тучная или KK/Au мышь или рецессивного гена (db/db мышь, Zucker крыса), либо могут иметь полигенное происхождение, например, Куо Kondo (KK) мышь, новозеландская тучная (NZO) мышь.

Сахарный диабет 2 типа, встречающийся в большинстве случаев у человека, является результатом взаимодействия между экологическим и полигенными дефектами. Существует один подтип сахарного диабета с хорошо определенной причиной (сахарный диа-

бет подростков (MODY)): в этом случае дефект наблюдается в глюкокиназном гене, но в целом дефекты в отдельном гене могут вызвать сахарный диабет 2 типа крайне редко. Поэтому полигенные животные предпочтительнее по сравнению с моногенными животными для моделирования сахарного диабета у человека.

Для выбора модельных животных, которых целесообразно использовать при изучении ЛС разного механизма действия, ниже представлена более подробная характеристика некоторых из них.

2.1.1. Модели спонтанного сахарного диабета 2 типа с ожирением

1. Мыши *ob/ob* (мыши с ожирением), теперь названные *Lepob*. Поражение наследуется как моногенная аутосомальная рецессивная мутация на 6 хромосоме у *C57BL/6J*-мышей. Мутация у мышей *ob/ob* теперь идентифицирована в лептин-гене. Гомозиготы мышей-мутантов демонстрируют быстрое увеличение массы тела до трехкратного от нормальной массы контрольных животных. Очень рано (с 10 дневного возраста) наблюдается нарушение терморегуляции. Кроме того, отмечается гиперфагия и уменьшение расхода энергии, заканчивающееся увеличением уровня липидов и ожирением приблизительно к 4 неделе. В дополнение к ожирению (грушеобразное тело), у животных наблюдается гипергликемия и снижение толерантности к глюкозе, что приводит к гиперинсулинемии и плохому заживлению ран. Гиперинсулинемия развивается по мере увеличения массы тела и, вероятно, является результатом ожирения. Инсулинорезистентность связана с образованием глюкозы в печени, увеличением активности ферментов глюконеогенеза, уменьшением активности гликолитических ферментов, ферментов синтеза гликогена и увеличением липогенеза в печени.

На молекулярном уровне инсулинорезистентность у мышей *ob/ob* определяется снижением связывания инсулина с рецепторами, ухудшением автофосфорилирования рецепторов инсулина (IR) и снижением трансдукции сигнала.

Дефицит лептина — фактора насыщения у этих мышей — значительно изменяет пищевое поведение, метаболизм и эндокринную функцию, что приводит к гиперфагии, уменьшению расхода энергии и ожирению. Уровень нейропептида (NPY), мощного стимулятора аппетита, у этих мышей существенно повышен, что, возможно, является результатом дефицита лептина. Недостаток лептина ведет к увеличению уровня кортизола, который может внести свой вклад в состояние инсулинорезистентности в мышцах.

Инъекция лептина тучным мышам приводит к уменьшению массы тела, снижению рациона питания, увеличению расхода энергии и улучшает чувствительность к инсулину. Так как эта модель строго связана с ожирением и гиперинсулинемией, препараты, которые уменьшают массу тела и улучшают периферическую чувствительность к инсулину, снижают ожирение и концентрацию глюкозы в крови, проявляя антидиабетическую активность.

2. Мыши *db/db* (диабетические мыши), теперь названные *leprdb*, первоначально выведены из аутосомальной рецессивной мутации на хромосоме 4 у мышей *C57BL/KsJ*. Мутация была прослежена по гену *db*, который кодирует рецепторы лептина. Эти мыши со спонтанной избыточной секрецией инсулина становятся тучными, с гипергликемией, гиперинсулинемией и инсулинорезистентностью в течение первого месяца после рождения. Позже развивается гипоинсулинемия с пиком между 3–4 месяцами возраста. Животные в этот период имеют кетоз, прогрессивную потерю массы тела и не выживают дольше чем 8–10 месяцев. В отличие от мышей *ob/ob* экзогенное введение лептина не оказывает влияния на рацион их питания и массу тела, в связи с наличием дефекта в рецепторах лептина. Мыши *db/db* обычно используются для исследования дислипидемии при сахарном диабете 2 типа и оценки эффективности препаратов типа инсулиновых миметиков и инсулиновых сенситизаторов.

3. Мыши *KK* (*Kuo Kondo*) — модель полигенного ожирения и сахарного диабета 2 типа — получены в Японии в результате селекции межродственным скрещиванием по

принципу наибольшей массы тела, поэтому их называют японской КК мышью. Эти животные характеризуются гиперфагией, гиперинсулинемией, толерантностью к инсулину, умеренной тучностью к 2-х месячному возрасту, которая достигает максимума к возрасту 4–5 месяцев. Толерантность к инсулину предшествует началу тучности. Увеличение синтеза инсулина связано с увеличением числа и размера панкреатических островков Лангерганса, но гистологически наблюдается дегрануляция β -клеток и гипертрофия островков. При этом инсулин избирательно подавляет глюконеогенез и индуктивный эффект на гликолиз и липогенез при наличии толерантности клеток печени к инсулину, как и у мышей db/db.

4. Мыши КК/Ау (Желтая КК мышь с ожирением) является носителем 2-х генов: летального желтого тучного (Ау) и диабетического гена. Этим она отличается от КК мыши, которая является носителем только диабетического гена. Мыши-гомозиготы желтой спонтанной мутации (Ау) умирают в течение короткого времени. КК/Ау мышь — гетерозиготна, показывает выраженную тучность, гипергликемию, гиперинсулинемию и отсутствие толерантности к глюкозе в возрасте 8-ми недель. Гиперфагия и тучность у молодых животных более явно выражены у самцов, чем у самок. На изолированных адипоцитах установлено, что отклик ткани на инсулин уменьшен прогрессивно с 5-недельного возраста. Гисто- и иммунохимические исследования показали, что панкреатические островки гипертрофированы, а β -клетки — дегранулированы.

Таким образом, основная причина сахарного диабета у этих мышей — толерантность к инсулину, которая связана с дефектами в рецепторе инсулина и в системе передачи сигналов от рецептора. Кроме того, наблюдается ингибирование инсулин-чувствительных фосфодиэстераз в жировых клетках.

5. Новозеландская Тучная (NZO) мышь представляет собой модель полигенной тучности и сахарного диабета. Животные получены путем межродственного скрещивания нескольких поколений родителей. Животные демонстрируют полигенный синдром: гиперфагия, тучность, умеренная гипергликемия, гиперинсулинемия, снижение толерантности к глюкозе и толерантности к инсулину.

Масса тела повышается быстро в течение первых 2 месяцев жизни из-за гиперфагии. Гиперлептинемия и толерантность к лептину может объясняться гиперфагией, характерной для этой породы. Гипергликемия и снижение толерантности к глюкозе непрерывно возрастает с увеличением возраста животных. Наблюдается гиперплазия и гипертрофия островков, на 90% состоящих из β -клеток. Сниженная активность гликогенсинтазы в печени может рассматриваться как первичный ранний дефект. Увеличение глюконеогенеза и синтеза глюкозы в печени связывают с дефектом в регуляции глюконеогенеза, у мышей экспрессирован фермент фруктозо-1,6-бисфосфатаза. Эти мыши имеют также высокую предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям и являются хорошей моделью для того, чтобы изучать отношения между аутоиммунными реакциями, тучностью и сахарным диабетом.

6. Мыши TSOD получены размножением тучных мышей-самцов породы ddY. Tsumara и Suzuki описали две породы: одну с ожирением и с увеличением глюкозы в моче — TSOD (Tsumara Suzuki Тучный диабет) и другую без них (TSNO, Tsumara Suzuki Не тучный). TSOD мышь имеет полигенное происхождение и характеризуется полидипсией и полиурией приблизительно с двухмесячного возраста только у мышей-самцов, что сопровождается гипергликемией и гиперинсулинемией. Ожирение постепенно развивается до 12 месяцев. Панкреатические островки у TSOD мышей-самцов гипертрофированы без признаков фиброза. Показано, что уменьшенная чувствительность к инсулину у диабетических TSOD мышей обусловлена, по крайней мере, частично, снижением транслокации транспортеров глюкозы инсулином (GLUT4) в скелетных мышцах и в адипоцитах.

7. Zucker крыса с ожирением. Спонтанная мутация «ожирения» была найдена у крыс в США в 1961. Zucker (fa/fa) крыса с ожирением (теперь названа как Lep^{fa}) яв-

ляется результатом простого аутосомального рецессивного гена (*fa*) на хромосоме 5. Порода характеризуется гиперфагией и ранним началом ожирения, что проявляется к 4-недельному возрасту наряду с увеличенным ростом подкожной жировой складки. Также наблюдается умеренная гипергликемия, инсулинорезистентность, умеренная толерантность к глюкозе, гиперлипидемия, гиперинсулинемия и умеренная артериальная гипертензия. Гиперфагию, отмеченную для этой породы, приписывают гипоталамическому дефекту в передаче сигналов от рецептора лептина. Другие гормональные изменения в Zucker крысах включают гиперсоматостатинемию, несмотря на гипергликемию, особенно у взрослых и старых животных. Есть уменьшение уровня гормона роста и уровня пролактина. Сообщается, что толерантность к глюкозе, найденная у этих крыс, происходит из-за метаболических дефектов в печени, поскольку концентрация глюкозы у тучной крысы нормальная. Порода полезна как модель человеческой тучности, сахарного диабета 2 типа, связанного с IV типом гиперлипидемии (увеличение ЛПОНП и уровня триглицеридов в крови) и артериальной гипертензии. Эта модель главным образом используется для скрининга эффектов различных препаратов, повышающих чувствительность к инсулину и способствующих снижению массы тела, а в немногих случаях подходит и для тестирования препаратов, увеличивающих секрецию инсулина или миметиков инсулина.

8. Zucker диабетическая крыса с ожирением (ZDF) — подпорода Zucker крыс, которая характеризуется врожденной гипергликемией, очень полезна для исследования механизма сахарного диабета 2 типа. В отличие от основной породы самец крысы ZDF менее тучный, но более устойчивый к инсулину. У самцов развитие сахарного диабета фиксируется к 7–10 неделе. Женские особи также тучны, инсулин-резистентны, но сахарный диабет не развивается, и поэтому они служат контролем. В отличие от *fa/fa* крыс способность к компенсаторной секреции инсулина ограничена. Гипергликемия у ZDF крыс связана с нарушением регуляции синтеза инсулина в β -клетках и GLUT 2 транспортера.

Наиболее часто ZDF крысы используются для исследования механизмов, связанных с инсулинорезистентностью и дисфункцией β -клеток, а также для оценки инсулиновых сенситизаторов, инсулинотропов и других агентов.

9. Крысы SHR/N-ср (спонтанно гипертензивные крысы/NIH-с ожирением) получены межродственным скрещиванием пород SHR/N в национальном Институте Здоровья, США. Представляют собой генетическую модель ожирения с сахарным диабетом 2 типа и артериальной гипертензией.

Самцы SHR/N-ср крыс, гомозиготные по гену ожирения (*ср*), демонстрируют гиперфагию и раннее начало ожирения на фоне слабо выраженной гипергликемии, дислипидемии. При этом у них регистрируется выраженная гиперинсулинемия, гиперлептинемия, инсулинорезистентность, толерантность к глюкозе и существенная артериальная гипертензия. SHR/N-ср крысы очень полезны для исследования ожирения, связанного с сахарным диабетом 2 типа, а также оценки влияния пищевых углеводов на развитие сахарного диабета у генетически предрасположенных индивидуумов.

10. Крысы JCR/LA-ср получены обратным скрещиванием LA/N-ср самцов с капюшонными видами аутбредных крыс подпороды JCR (Джеймс К Рассэль). LA-ср имеют только 3% SHR генов, но представленных в *fa*-аллели. Животные, рецессивные по гену (*ср/ср*), показывают чрезвычайно высокий метаболический профиль, включая инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, гиперлипидемию, гиперплазию панкреатических β -клеток, тучность, толерантность к глюкозе и серьезную гиперлипидемию. Ген *ср* кодирует стоп-кодон при создании рецептора лептина, что переводит его в нефункциональный рецепторный белок. Неполноценный статус рецептора лептина наряду с гипоталамической дисрегуляцией пептидов вносят вклад в гиперфагию и другие метаболические отклонения у этих крыс. Главный недостаток этой крысы как чистой модели сахарного диабета состоит в том, что они являются нормогликемическими при голодании.

Однако основная привлекательность JCR/LA-ср крыс как модели для исследования заключается в развитии атеросклеротических и миокардиальных повреждений в комплексе с метаболическим профилем X-синдрома. Отличительная особенность этого животного — развитие патологии сосудистого русла, что характерно для диеты с высоким содержанием холестерина и жиров. Эта модель рекомендуется для изучения влияния фармакологических средств и диет на развитие сердечно-сосудистой патологии при гиперинсулинемии.

11. Крысы OLETF (Otsuka Long Evans Tokushima Fatty) — крысы с умеренным ожирением — были получены селективным размножением крыс со спонтанным сахарным диабетом от аутбредной колонии крыс Long Evans, поддерживаемых в Японии. У этой полигенной крысы сахарный диабет развивается в пределах 18–25 недель жизни и наследуется преимущественно самцами. OLETF крысы демонстрируют врожденную полифагию, умеренную тучность, гиперинсулинемию, гипертриглицеридемию, гиперхолестеринемию, гипергликемию и толерантность к глюкозе. Предполагают, что дефекты пролиферации β -клеток сами по себе ответственны за развитие сахарного диабета у OLETF крыс, так как 70% панкреатэктомированных животных имеют гипергликемию из-за низкой способности панкреатических островков к регенерации после эктомии, а лечение никотинамидом корректирует гипергликемию, увеличивая пролиферацию β -клеток. В последние годы модель OLETF крысы чрезвычайно часто используются в фармакологических исследованиях при исследовании гипогликемических и гипотензивных лекарств.

2.1.2. Модели спонтанного сахарного диабета 2 типа без ожирения

1. Cohen диабетическая крыса — исключительная экспериментальная модель диетиндуцированного сахарного диабета 2 типа, которая воспроизводит особенности болезни у людей. Ее наиболее выдающаяся и отличительная особенность — то, что она отражает генетическую восприимчивость к богатой углеводами диете, то есть воспроизводит основную особенность сахарного диабета 2 типа. Недавно в этой породе были обозначены врожденные и метаболические фенотипы колонии CD_s (Cohen diabetic sensitive) и CD_r (Cohen diabetic resistant). Cohen диабетическая крыса — полезная экспериментальная модель, которая очень подходит для изучения взаимодействия между пищевыми, метаболическими и экологическими факторами, а также восприимчивости при развитии сахарного диабета 2 типа.

2. GK крыса (Goto-Kakizaki) — полигенная модель сахарного диабета 2 типа — была выведена Goto и его сотрудниками через селективное инбредное скрещивание крыс Wistar с неправильной толерантностью к глюкозе в Японии в 1973 г. Порода характеризуется отсутствием тучности, умеренной, но стойкой гипергликемией, гипоинсулинемией, нормолипидемией, толерантностью к глюкозе, что проявляется в двухнедельном возрасте у всех животных и сопровождается ранним началом диабетических осложнений. У взрослых GK крыс полная масса панкреатических β -клеток уменьшена на 60%. Дефектная масса и функция β -клеток у GK крыс могут быть результатом несоответствия панкреатических факторов роста, необходимых для роста и развития эмбриональных панкреатических клеток в течение беременности, и вторичной потери дифференцирования β -клеток из-за хронического воздействия гипергликемии (глюкотоксичность). Эта модель показывает, что сахарный диабет 2 типа основан не только на генетических факторах, в его развитии также вовлекаются транскгенный и эпигенный ответы. В дополнение к дефектам в β -клетках снижается чувствительность к инсулину в печени, скелетных мышцах и жировой ткани. Изменение секреции инсулина и перепроизводство глюкозы в печени — первые нарушения у диабетических GK крыс, способствующие в последующем развитию гипергликемии. GK крыса — одна из лучших моделей сахарного диабета на животных, которая используется для изучения отношения изменений в массе β -клеток и возникновении сахарного диабета 2 типа, а также диабетических осложнений (особенно диабетическая нефропатия).

3. Torri крыса — это новая спонтанно диабетическая крыса без ожирения, полученная от Sprague-Dawley породы, выведенная в 1997 в Torri Pharmaceutical Co, Япония. Эта порода характеризуется толерантностью к глюкозе, гипергликемией, гипоинсулинемией и гипертриглицеридемией. Гистологически наблюдается накопление гемосидерина и фиброз панкреатических островков. Torri крысы способны выживать длительное время без лечения инсулином и, следовательно, более полезны для изучения диабетических осложнений. Отличительные характеристики — катаракта и ретинопатия с частичным отслоением сетчатки глаза, фиброзированием и массивными геморрагиями в 70–77 недельном возрасте.

4. Мутантные C57 BL/6 мыши без ожирения (Акита). Эта порода была получена из колонии C57 BL/6 (B6) в Аките (Япония) и теперь коммерчески доступна для исследования. Ins2 ген — мышинный гомолог человеческого гена препроинсулина. Мыши обладают другим активным геном инсулина, Ins1, который представлен отсутствием в интроне в С-полипептидной-некодируемой области. Акита (Ins2Akita) спонтанная мутация (обычно передаваемая как Mody) — аутомальная доминирующая мутация в инсулине II генов (Ins2).

Ins2Akita мутация разрушает нормальный процессинг инсулина, что приводит к дефекту в синтезе зрелого инсулина и заканчивается ранним развитием гипергликемии.

Порода характеризуется гипергликемией, гипоинсулинемией, полидипсией и полиурией, начиная приблизительно с 3–4 недельного возраста. Ни ожирение, ни инсулит не сопровождают сахарный диабет у этих животных. Гистологически в 4–35 недельном возрасте наблюдается снижение плотности активных панкреатических β -клеток без инсулина, и островки вырабатывают очень небольшое количество зрелого инсулина. Эти мыши-мутанты хорошо отвечают на экзогенное введение инсулина. Мыши с уменьшенной массой β -клеток и отсутствием устойчивости β -клеток служат превосходной заменой тем моделям сахарного диабета, которые индуцируются химическими агентами.

5. ALS/Lt мышь — это аллоксан-восприимчивые (ALS) мыши, выведенные инбредным скрещиванием аутбредных CD-1 мышей (коммерческая популяция ICR мышей, от которых были получены инбредные NSY и NON мыши), с селекцией по восприимчивости к аллоксану, который является генератором активных форм кислорода и мощным токсином для β -клеток. Первоначально предрасположенность к сахарному диабету 2 типа у мышей ALS была вызвана мутацией схожей с желтой мутацией (Ay) в локусе агуты на 2 хромосоме. Действительно, в ALS/Lt подпороде, выведенной в Джэксонской Лаборатории, мыши имели гиперинсулинемию и сниженную толерантность к глюкозе, которые развивались спонтанно между 6 и 8 неделями возраста у аллоксан-необработанных самцов. Эта модель мыши с уменьшенной способностью к диффузии свободных радикалов представляет очевидный интерес, потому что свободно-радикальное повреждение вовлечено в патогенез и развитие осложнений сахарного диабета 1 и 2 типа.

2.2. Модели диета-индуцированного сахарного диабета 2 типа

Существуют несколько моделей на животных, у которых сахарный диабет индуцируется только на фоне алиментарных факторов, при этом отсутствует воздействие химических агентов и генетические дефекты.

1. Песчаная крыса (*Psammomys obesus*) остается нормальной в ее естественной среде обитания, но тучность и сахарный диабет развиваются у нее при питании высокоэнергетической диетой, вместо обычной низкоэнергетической овощной диеты. Первоначально у песчаных крыс развиваются гиперфагия, тучность, гиперинсулинемия, толерантность к глюкозе с неповрежденными β -клетками, в дальнейшем сопровождаемое вырождением β -клеток и некрозом, с глубоким дефицитом инсулина, сахарным диабетом и кетозом, в конечном счете ведущим к смерти животного. В этой модели инсулин, даже в высокой концентрации, не способен преодолеть инсулинорезистентность в мышцах. Частично неэффективность инсулина обусловлена увеличением отношения проинсулин/инсулин в

панкреатических β -клетках, аналогично тому, как это наблюдается у человека при сахарном диабете 2 типа. На более поздних стадиях развития у этих животных наблюдается уменьшение жировой ткани, истощение гранул β -клеток, апоптоз и развитие кетоацидоза. На этой стадии животным для выживания требуется инсулиновая поддержка. Песчаные крысы широко используются для проверки препаратов типа ингибитора тирозинфосфатазы и аналогов глюкагон-подобного пептида 1 (GLP-1).

2. Мыши C57BL/6J. Сахарный диабет развивается у них при нахождении на высокожировой диете. Эта порода характеризуется тучностью, гиперинсулинемией, инсулинорезистентностью и толерантностью к глюкозе. Кроме того, на фоне голодания у них сохраняется высокая концентрация глюкозы в отличие от нормальной основной концентрации глюкозы, характерной в этих условиях для C57BL/6J (ob/ob) мыши.

Эти мыши демонстрируют развитие резистентности к лептину и хорошо моделируют состояние пациентов с генетической предрасположенностью к сахарному диабету 2 типа. Эта модель животного включает и генетические, и экологические факторы риска в отличие от C57BL/6J (ob/ob) мыши, у которой начало признаков генетически определено. О полноценности этой модели для проверки ЛП говорит позитивное влияние на состояние животного ингибитора дипептидилпептидазы-4, который нормализует толерантность к глюкозе и увеличивает секрецию инсулина.

2.3. Модели химически-индуцированного сахарного диабета 2 типа

Модель развития сахарного диабета с ожирением у мышей под воздействием золотой тиоглюкозы.

Сахарный диабет 2 типа с ожирением индуцируется у мышей золотой тиоглюкозой (GTG — aurothioglucose, $C_6H_{11}O_5SAu$, мол. масса 392,2), введенной интраперитонеально в дозе 150–350 мг/кг. У мышей постепенно развиваются ожирение, гиперинсулинемия, гипергликемия, инсулинорезистентность в течение 16–20 недельного возраста после инъекции GTG.

GTG транспортируется в клетки вентромедиального гипоталамуса и вызывает некротические повреждения, которые впоследствии приводят к развитию гиперфагии, ожирения, дислипотеинемии, усилению липогенеза в печени и жировой ткани, секреции триглицеридов, уменьшается метаболизм глюкозы в мышцах, т.е. развиваются отклонения, наблюдаемые у тучных мышей (ob/ob). Наблюдается много молекулярных дефектов сигнального пути инсулина. Однако модель невыгодна, поскольку требуется очень долгое время, чтобы индуцировать ожирение/сахарный диабет. Кроме того, наблюдается высокая смертность животных после инъекции GTG.

2.4. Модели химически-индуцированного сахарного диабета без ожирения

2.4.1. Аллоксан/стрептозотоциновый сахарный диабет у взрослых животных

Восприимчивость животных к аллоксан/стрептозотоцину зависит от возраста, вида и непостоянна даже в пределах одной линии животных.

Модель сахарного диабета 2 типа у животных может быть вызвана комбинированным введением стрептозотоцина и никотинамида взрослым крысам. Никотинамид вводится крысам (230 мг/кг, внутривентриально) за 15 мин до стрептозотоцина (65 мг/кг, внутривенно). При этом развивается умеренная и устойчивая неголодная гипергликемия без существенного изменения уровня инсулина в плазме. Никотинамид проявляет защитный эффект, снижая цитостатическое действие стрептозотоцина, что приводит к умеренному повреждению панкреатических β -клеток. Эта модель — выгодный инструмент для исследования инсулинотропных агентов в лечении сахарного диабета 2 типа.

2.4.2. Неонатальный аллоксан/стрептозотоцин-индуцированный сахарный диабет у крыс

В отличие от инъекции отдельной высокой дозы стрептозотоцина, который может вызвать сахарный диабет 1 типа у взрослых крыс, стрептозотоцин, введенный неонатально или немедленно после рождения, приводит в последующем к развитию у крысы сахарного диабета 2 типа. Как правило, стрептозотоцин вводится однократно в диапазоне доз 80–100 мг/кг внутривенно, внутривентриально или подкожно. Используются крысы линий Wistar или Sprague-Dawley в возрасте 1, 2 или 5 дней. Данная модель является лучшей моделью для выявления механизмов, связанных с регенерацией β -клеток, функциональным истощением β -клеток и для оценки дефектов в действии инсулина. Неонатальный сахарный диабет 2 типа можно вызвать аллоксаном (200 мг/кг, внутривентриально) у новорожденных крыс-самцов в возрасте 2, 4 или 6 дней после рождения. Эта модель позволяет оценить отсроченные осложнения сахарного диабета 2 типа.

2.4.3. Стрептозотоцин-алиментарный индуцированный сахарный диабет

Вызывается комбинацией короткого периода высокожировой диеты и низкой дозой стрептозотоцина (35 мг/кг, внутривентриально). Комбинация высокожировой диеты и низкой дозы стрептозотоцина вызывает устойчивую, длительную гипергликемию, полиурию, полидипсию, полифагию, а также диабетические осложнения. Эта модель генетически не детерминирована и может быть хорошей и рентабельной альтернативой генетическим моделям.

Модель отражает ситуацию у людей с факторами риска (ожирение и инсулинорезистентность). При этом уровень инсулина не снижен. В этом случае целесообразно проводить тестирование веществ, повышающих чувствительность к инсулину (пиоглизатон) и инсулинотропных агентов (глибенкламид, гликлазид, глипизид).

2.5. Хирургические модели сахарного диабета 2 типа

Частичная панкреатэктомия для индукции сахарного диабета 2 типа выполняется на 70% поджелудочной железы у различных видов животных, главным образом у собак, свиней, кроликов и крыс. Эта модель не вызывает тяжелую форму сахарного диабета и характеризуется умеренной гипергликемией, сохранением нестимулированной секреции инсулина в плазме.

Снижение гипергликемии и инсулинорезистентности получают введением инсулина или флоризина (ингибитора реабсорбции глюкозы в почках).

Еще одна модель устойчивой формы сахарного диабета 2 типа достигается комбинацией 50% панкреатэктомии наряду с введением никотинамида (350 мг/кг) и стрептозотоцина (200 мг/кг) BALB/c мышам. Преимуществом этой комбинации является минимизация эффекта химического агента и уменьшение постоперативных осложнений.

Существует также модель сахарного диабета на крысах, которая вызывается экспериментальной хирургической манипуляцией на вентромедиальном гипоталамусе у генетически нормальных животных. Эта модель характеризуется выраженным ожирением, гиперинсулинемией, гипертриглицеридемией, инсулинорезистентностью, толерантностью к глюкозе, умеренной гипергликемией на фоне голодания, дефектами в регуляции секреции инсулина, несмотря на чрезвычайно высокую способность к секреции инсулина.

2.6. Трансгенные и нокаутные модели сахарного диабета 2 типа

Разнородность генетического и экологического фона сахарного диабета 2 типа позиционирует необходимость идентификации точных молекулярных механизмов для препаратов, используемых в лечении сахарного диабета. Трансгенная техника обеспечивает превосходную возможность для исследования роли определенных генов и белков, вовлеченных в патогенез болезни.

Трансгенные животные полезны для понимания генной регуляции, патогенеза и обнаружения новых мишеней для лечения болезни. Трансгенные животные, особенно мыши, обычно создаются путем перемещения или изменения сайтов или изменением уровня экспрессии функционального гена, или удалением определенных эндогенных генов (нокаут), или размещением их в контрольные или альтернативные промотерные зоны.

Трансгенные и нокаутные модели разрабатываются для изучения роли генов и их эффектов на периферическое действие инсулина, например, на рецепторы инсулина (IRS-1, IRS-2), транспортеры глюкозы (GLUT-4), рецептор-активатор пероксисомной пролиферации (PPAR- γ), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), факторы секреции инсулина типа GLUT-2, глюкокиназу, островковый амилоидный полипептид (IAPP) и GLP-1, производство глюкозы в печени. Комбинированная или двойная нокаутная мышь включает дефект в активности инсулина и секреции инсулина (например, IRS 1+/-/ GK+/- двойной нокаут) и иллюстрирует механизмы, связанные с развитием инсулинорезистентности и дисфункцией β -клеток, ведущие к гипергликемии. При этом наблюдаются от умеренной до выраженной гипергликемия, инсулинорезистентность, гиперинсулинемия, толерантность к глюкозе и другие изменения. Недавно предложена модель нокаутных мышей со специфическими тканями, что в последующем позволит найти понимание действия инсулина на целевые ткани-мишени (мышцы, жировая ткань и печень), связанные с инсулинорезистентностью и сахарным диабетом 2 типа. Трансгенные/нокаутные животные в настоящее время используются главным образом для изучения течения сахарного диабета и обычно не рекомендованы для того, чтобы показывать эффективность тех или иных препаратов, поскольку они являются сложными и дорогостоящими.

Заключение

Многие из описанных моделей на животных имеют характерные особенности сахарного диабета и позволяют проводить исследования, невозможные у людей по этическим принципам. Ни одна из известных моделей не эквивалентна сахарному диабету у человека, но каждая отдельная модель является существенным инструментом для того, чтобы исследовать генетические, эндокринные, метаболические и морфологические изменения. Необходимо с осторожностью подходить к интерпретации и экстраполяции результатов, полученных на этих моделях. В программе скрининга гипогликемических препаратов особенно важно обратить внимание, какие модели на животных лучше удовлетворяют поиску специфического класса гипогликемических препаратов.

Выбор специфической модели зависит от целей исследователя. Использовать ли животных с врожденной патологией или аутбредных, какова пригодность специфической породы? В основе выбора модели сахарного диабета лежит тип изучаемого препарата, хотя есть некоторые ограничения, например, дороговизна, практические трудности, особенности ухода и этические соображения, связанные с использованием крупных животных (свиней, собак и приматов). Детальные исследования на этих видах животных целесообразны для лучшего понимания механизмов болезни и поиска новых мишеней для разрабатываемых ЛП.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Аметов А.С., Балаболкин М.И., Моисеев В.С. Сахарный диабет II типа: метаболический аспект и сосудистые осложнения // Клин. фармакол. и терапия. — 1994. — № 3. — С. 64–65.
2. Балаболкин М.И., Клебанова Е.М., Креминская В.М. Микроангиопатия — одно из сосудистых осложнений сахарного диабета // Consilium Medicum. — 2000. — Т. 2. — № 5. — С. 215–220.

3. Дедов И.И., Шестакова М.В., Миленккая Т.М. Сахарный диабет: ретинопатия, нефропатия. — М.: Медицина, 2001. — С. 176.
4. Bannister B. The synthesis and biological activities of some analogs of streptozotocin// J. Antibiot. (Tokyo). — 1972. — Vol. 25. — P. 377.
5. Battell M.L., Yuen V.G., Verma S., McNeil J.H. Other models of type 1 diabetes. In: McNeil JH, editor. Experimental models of diabetes. Florida, USA: CRC Press LLC; 1999, p. 219–229.
6. Bell R.H., Hye R.J. Animal models of diabetes mellitus: physiology and pathology// J Surg Res. — 1983. —Vol. 35. —P. 433–460.
7. Cooperstein S.J., Lazarow A. Distribution of alloxan-C⁴ in islet and other tissues of the toadfish (Opsanus tau) // Amer. J. Physiol. 1964. — Vol. 207. — P. 423.
8. Dufrane D., van Steenberghe M., Guiot Y., Goebbels R.M., Saliez A., Gianello P. Streptozotocin-induced diabetes in large animals (pigs/primates): Role of GLUT2 transporter and beta-cell plasticity // Transplantation. — 2006. — Vol. 81. — P. 36–45.
9. Grussner R., Nakhleh R., Grussner A., Tomadze G., Diem P., Sutherland D. Streptozotocin-induced diabetes mellitus in pigs// Horm Metab Res. — 1993. — Vol. 25. — P. 199–203.
10. Gunnarsson R., Beme C., Hellerstrom C. Cytotoxic effects of streptozotocin and N-nitrosomethylurea on the pancreatic B cells with special regard to the role of nicotinamide-adeninodine nucleotide // Biochem. J. — 1974. — Vol. 140. — P. 487.
11. Ho E., Chen G., Bray T.M. Alpha-phenyl-tert-butyl nitron (PBN) inhibits NFkappaB activation offering protection against chemically induced diabetes // Free Rad Biol Med. — 2000. — Vol. 28. — P. 604–614.
12. Howell S.L., Taylor K.W. The acute pancreatic effect of alloxan in the rabbit // J. Endocrinol, 1967. — Vol. 37. — P. 421.
13. Idahl L.A., Lemmark A., Sehlin J., Taljedal I.B. Studies on the function of pancreatic islet cell membranes // J. Physiol. (Paris). — 1976. — Vol. 72. — P. 729.
14. Jones R.B., Dickinson K., Anthony D.M., Marita M.R., Kaul C.L., Buckett W.R. Evaluation of BTS 67 582, a novel antidiabetic agent in normal and diabetic rats // Br J. Pharmacol. — 1997. — Vol. 120. —P. 1135–1143.
15. Junod A., Lambert A.E., Stauffacher W., Renold A.E. Diabetogenic action of streptozotocin // Proc Soc Exp Biol Med. — 1967. — Vol. 126. — P. 201–205.
16. Karunanayake E.H., Baker J.R.J., Christian R.A., Hearse D.J., Mellows G. Autoradiographic study of the distribution and cellular uptake of (¹⁴C)-streptozotocin in the rat// Diabetologia. — 1976. — Vol. 12. — P. 123.
17. Kasiviswanath R., Ramesh A., Kumar K.E. Hypoglycemic and antihyperglycemic effect of *Gmelina asiatica* LINN. in normal and in alloxan induced diabetic rats // Biol Pharm Bull. — 2005. — Vol. 28. — P. 729–732.
18. Kass E.H., Waisbren B.A. A method for consistent induction of chronic hyperglycemia with alloxan // Proc. Sot. Exp. Biol. Med. — 1945. — Vol. 60. — P. 303.
19. Landau B.R., Renold A.E. The distribution of alloxan in the rat // Diabetes. — 1954. — Vol. 3. — P. 47.
20. Matthews E.K., Dean P.M., Sakamoto Y. The bioelectrical activity of the islet cell membrane // Handb. Exp. Phurmacol. — 1975. — Vol. 32(2). — P. 157.
21. McIntosh C.H.S., Pederson R.A. Non insulin dependent animal models of diabetes mellitus. In: McNeil JH, editor. Experimental models of diabetes. Florida, USA: CRC Press LLC; 1999, p. 337–398.
22. Miller D.L. Experimental diabetes: Effect of streptozotocin on golden Syrian hamster// Lab Anim Sci. — 1990. — Vol. 40. — P. 539–540.
23. Ozturk Y., Atlan V.M., Yildizoglu-Ari N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions // Pharmacol Rev. — 1996. — Vol. 48. — P. 69–112.
24. Ravazzola M., Malaisse W.J., Perrelet A., Renold A.E. Islet cell membrane alterations by diabetogenic drugs // Lab. Invest. — 1976. — Vol. 34. — P. 451.
25. Rerup C.C. Dugs producing diabetes through damage of the insulin secreting cells. Pharmacol Rev. — 1970. — Vol. 22. — P. 485–518.
26. Robbins M.J., Sharp R.A., Slonim A.E., Burr I.M. Protection against streptozotocin-induced diabetes by superoxide dismutase // Diabetologia. — 1980. — Vol. 18. — P. 55.
27. Schein P.S., Cooney D.A., McMenamin M.G., Anderson T. Streptozotocin diabetes-Further studies of the mechanisms of depression of nicotinamide adenine dinucleotide concentration in mouse pancreatic islets and liver // Biochem. Pharmacol. — 1973. — Vol. 22. — P. 2625.

28. Shafrir E. Diabetes in animals: Contribution to the understanding of diabetes by study of its etiopathology in animal models. In: Porte D, Sherwin RS, Baron A, editors. Diabetes mellitus. New York: McGraw-Hill; 2003. — p. 231–55.
29. Sheng X.Q., Huang K.X., Xu H.B. Influence of alloxan-induced diabetes and selenite treatment on blood glucose and glutathione levels in mice // J Trace Elem Med Biol. — 2005. — Vol. 18. — P. 261–267.
30. Srinivasan K., Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: An overview // Indian J. Med. Res. — 2007. — Vol. 125. — P. 451–472.
31. Theriault B.R., Thistlethwaite J.R., Jr Levisetti M.G., Wardrip C.L., Szot G., Bruce D.S. et al. Induction, maintenance, and reversal of streptozotocin-induced insulin-dependent diabetes mellitus in the juvenile cynomolgus monkey (*Macaca fascicularis*) // Transplantation. — 1999. — Vol. 68. — P. 331–337.
32. Tomita T., Watanabe I. The effect of alloxan on the permeability of isolated pancreatic islets to horseradish peroxidase // Virchows Arch. — 1976. (B) 22. — P. 217.
33. Vogel H.G., Vogel W.H. Drug discovery and evaluation; Pharmacological assays. Heidelberg, Berlin: Springer-Verlag; 1997.
34. Weaver D.C., McDaniel M.L., Naber S.P., Barry D., Lacy P.E. Alloxan stimulation and inhibition of insulin release from isolated rat islets of Langerhans // Diabetes. — 1978. — Vol. 27. — P. 1205.
35. Zawalich W.S., Karl R.C., Matschinsky F.M. Effects of alloxan on glucose-stimulated insulin secretion, glucose metabolism, and cyclic adenosine 3'5'-monophosphate levels in rat isolated islets of Langerhans // Diabetologia. — 1979. — Vol. 16. — P. 115.

ГЛАВА 43

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ СТЕРОИДНЫХ ГОРМОНОВ И ИХ АНТАГОНИСТОВ

*Составители: д. м. н., член-корр. РАМН, проф. Н.Л. Шимановский;
д. м. н., проф. Е.Н. Карева; к. м. н., доц. А.В. Семейкин*

Введение

Стероидные гормоны, их синтетические аналоги и антагонисты широко используются в клинической практике. Они включают: прогестины (гестагены), андрогены, эстрогены, глюко- и минералокортикоиды и их антагонисты.

Прогестерон является индуктором дифференцировки тканей-мишеней (эндометрия, яичников и ткани молочной железы и др.). Прогестины применяются для контрацепции, сохранения беременности, регуляции менструального цикла, заместительной и гормонотерапии патологических состояний, обусловленных гиперпластическими процессами тканей-мишеней. Добавление прогестина к эстрогену при проведении заместительной гормональной терапии необходимо для сдерживания эстроген-индуцированной гиперплазии слизистой матки. При этом прогестин, блокируя пролиферативную активность эстрогена, не должен препятствовать проявлению положительных эффектов эстрогена в отношении костной ткани и климактерических симптомов. Эстрогены используются в составе комбинированных контрацептивов, а также для заместительной гормонотерапии. Андрогены применяют преимущественно для лечения гипогонадизма. Глюкокортикоиды проявляют высокую антиаллергическую, противовоспалительную и иммунодепрессивную активность.

Недостаточная эффективность существующих препаратов, наличие побочных эффектов при их применении объясняют актуальность поиска новых высокоэффективных соединений, обладающих гормональной активностью.

1. Общие положения

1.1. Понятия и термины

ЗГТ — заместительная гормональная терапия;

КПК — комбинированные пероральные контрацептивы;

Лиганд рецептора — вещество, обладающее способностью связываться с рецептором;

РВА% — относительная связывающая активность.

1.2. Новый перспективный лиганд

должен обладать следующими свойствами:

— Селективностью (преимущественное связывание со специфичными рецепторами по сравнению с другими родственными рецепторами суперсемейства ядерных рецепторов — глюкокортикоидными, андрогенными, минералокортикоидными, эстрогенными).

— Специфичностью (направленность фармакологического эффекта должна совпадать с таковой препарата сравнения, а активность превосходить аналоговую).

— Перспективный прогестин не должен снижать положительные дополнительные активности эстрогена (например, на костную систему) при их комбинации.

— При использовании в монорежиме не проявлять токсичности и иметь приемлемый спектр толерантности.

2. Этапы исследования.

а) Исследование рецепторной активности.
б) Изучение специфической фармакологической активности.
в) Относительную связывающую активность (relative binding affinities, RBA%) тестируемого соединения с различными стероидными рецепторами (для гестагенов это — рецепторы прогестерона, андрогенов, глюкокортикоидов, минералокортикоидов, эстрогенов) определяют, используя радиоактивные специфические лиганды в тесте конкурентного связывания с рекомбинантными стероидными рецепторами человека, либо цитозольными стероидными рецепторами биоптатов тканей-мишеней человека. Данные представляют в процентах относительно соответствующего стероида (прогестерона для гестагенных рецепторов, тестостерона для андрогеновых рецепторов, дексаметазона для глюкокортикоидных рецепторов, альдостерона для минералокортикоидных рецепторов и эстрадиола-17-бета для эстрогеновых рецепторов), специфическое связывание которого принимается за 100%. Исследования должны включать параллельный анализ связывающих свойств контрольных препаратов — гестагенов с известным спектром активности. В качестве препарата сравнения обязательно использование структурного или функционального аналога тестируемого вещества последнего поколения. Полученные в ходе исследования данные должны демонстрировать очевидное преимущество нового лиганда рецепторов прогестерона по меньшей мере по одному из указанных параметров. В основном результаты конкурентного связывания демонстрируют селективность нового препарата по отношению к рецептору прогестерона в сравнении с другими стероидными рецепторами (особенного внимания заслуживают андрогеновые рецепторы). Соединения с высокой селективностью к рецепторам прогестерона предположительно будут демонстрировать меньшее число неблагоприятных побочных эффектов (ПЭ) — головные боли, напряжение и боль молочных желез, увеличение веса, изменения настроения, акне, прорывные межменструальные кровотечения.

3. Рекомендуемые тесты и биологические модели исследования лекарственных средств, обладающих гормональной активностью

1. Определение относительной связывающей активности (RBA%) нового вещества с:
 - 1.1. Рецепторами прогестерона;
 - 1.2. Рецепторами тестостерона;
 - 1.3. Рецепторами глюкокортикоидов;
 - 1.4. Рецепторами минералокортикоидов;
 - 1.5. Рецепторами эстрадиола.
2. Исследование специфической фармакологической (гормональной) активности нового вещества:
 - 2.1. Прогестиновая/антигестагенная:
 - 2.1.1. Тест Клауберга-МакФейла (*Clauberg-McFail*);
 - 2.1.2. Тест на сохранение/несохранение беременности;
 - 2.2. Контрацептивная активность;
 - 2.3. Антиовуляторная активность;
 - 2.4. Андрогенная/антиандрогенная активность — прямой и обратный тест Хершберга;
 - 2.5. Эстрогенная/антиэстрогенная активность — эстроген-индуцированный рост матки и кератинизация эпителия влагалища;
 - 2.6. Глюкокортикоидная/антиглюкокортикоидная активность — тимолитический тест;
 - 2.7. Минералокортикоидная/антиминералокортикоидная активность — электролитный баланс и задержка жидкости.

4. Условия проведения исследования

Эксперимент проводится в условиях вивария, соответствующего нормативам GLP. Операции на животных и эвтаназия производятся под анестезией. Эксперименты *in vitro* проводятся согласно валидированным методикам. Овариэктомия белых крыс производится по методу Киршенблат Я.Д. (1969).

Характеристика фармакологического вещества; перечень сведений о веществе или лекарственной форме, которыми необходимо располагать к началу эксперимента.

Необходимо иметь сведения о растворимости вещества и предполагаемых путях введения. Допустимо использовать для перорального введения суспензию в оливковом масле, для внутрибрюшинного — суспензию, приготовленную на оливковом масле, либо из растворов субстанции на 96% этаноле/диметилсульфоксиде готовится 10% водная суспензия. При использовании жидких лекарственных форм они вводятся согласно инструкции по применению. Контрольные группы животных получают эквивалентное количество растворителя.

5. Оборудование, инструменты и реактивы

Хирургический инструментарий, оборудование для приготовления гистологических препаратов/срезов, световой микроскоп, радиометр, ультрацентрифуга, весы, рН-метр.

Средства для наркоза животных, шовный материал, реактивы для приготовления микропрепаратов на стеклах, включая красители — например, гематоксилин/эозин.

5.1. Реактивы для радиолигандного анализа:

- трис-НСI («Merck», Германия)
- ЭДТА («Sigma», США)
- дитиотрейтол («Calbiochem», Англия)
- азид натрия («Sigma», США)
- активированный уголь Norit A («Serva», Германия)
- декстран Т-70 («Serva», Германия)
- РОРОР(1,4-бис-2-метил-5-фенилоксизалилбензол)(«Serva», Германия)
- РРО (2,5-дифенилоксазол)(«Serva», Германия)

5.2. Растворители и разбавители

Вода дистиллированная, оливковое масло, 96% этанол, диметилсульфоксид фармакопейный (ДМСО).

6. Дозы, пути и режимы введения

Вещества вводят согласно имеющимся сведениям о предлагаемых путях и режимах введения лекарственной формы. Рекомендуется использовать не менее 3-х доз в диапазоне 0,01–100 мг/кг для крыс.

Продолжительность исследования:

3 дня — 1 месяц.

Экспериментальные животные:

белые крысы беспородные, либо линии Вистар.

В качестве препарата сравнения рекомендуется использовать:

- при изучении прогестиновой активности — левоноргестрел, медроксипрогестерона ацетат, либо аллилэстренол;
- при изучении эстрогенной активности — эстрадиол-17-бета, либо этинилэстрадиол;
- при исследовании андрогенной активности — тестостерон;
- при изучении глюкокортикоидной активности — гидрокортизон либо дексаметазон.

7. Описание эксперимента и особенностей его проведения

7.1. Определение относительной связывающей активности (РВА%) нового вещества с цитозольными рецепторами прогестерона

Возможности и ограничения метода, его прогностическое значение — метод является общепринятым для скрининга новых прогестинов *in vitro*; ограничение заключается в невозможности по силе связывания предсказать эффект *in vivo*.

Отбор и хранение биологических образцов.

В качестве тест-системы используют цитозольные рецепторы биопсийного материала тканей-мишеней.

Получение цитозольной фракции.

Биоптат ткани-мишени тщательно очищают от жировой и соединительной тканей, полученный биологический материал исследуют сразу или после хранения в низкотемпературном шкафу ($t = -25\text{ }^{\circ}\text{C}$) не более 3-х суток. Образцы тканей матки измельчают ножницами, а затем в микроразмельчителе тканей при 3000 об/мин в течение 5-ти мин с 3-секундным перерывом через каждые 5 сек, в 5–6 объемах ТЭД-буфера рН 7,4 (10 мМ трис-НСl, 1,5 мМ ЭДТА, 0,5 мМ дитиотрейтол), содержащего 10% глицерина. Гомогенат центрифугируют в течение 15 мин при 1500 g. Из супернатанта получают цитозольную фракцию, центрифугируя пробы при 105000 g в течение 60 мин, в которой определяют содержание цитозольных стероидных рецепторов. Все операции проводят в температурном режиме 0–4 °С.

Белок в цитозольной фракции определяют микробиуретовым методом.

Определение связывания прогестерона ($^3\text{H-P}_4$) в цитозольной фракции ткани матки.

Определение рецепторов прогестерона в цитозольной фракции проводят по методу [3]. Для определения общего связывания пробы содержат 20 мкМ [2,4,6,7] $^3\text{H-P}_4$ и 1мМ гидрокортизона в исследуемой фракции ткани. Для определения неспецифического связывания пробы дополнительно содержат 3 мМ спиртовой раствор прогестерона. Этанол, после раскпывания, испаряют в токе азота. Затем добавляют исследуемую фракцию ткани, тщательно встряхивают и инкубируют 2 ч, после чего добавляют 100 мкл ТЭД-буфера с 50% глицерином, встряхивают и инкубируют еще 2 ч. После чего добавляют по 200 мкл суспензии активированного угля (0,5% угля Norit A, 0,05% декстрана Т-70 в ТЭД-буфере рН 7,4 с 30% глицерином), тщательно встряхивают и инкубируют 30 мин. Затем пробы центрифугируют в течение 15 мин при 1500 g и 200 мкл надосадочной жидкости из каждой пробы помещают во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости для радиометрирования. Связывание прогестерона в цитозоле выражают в фемтомолях (10^{-15} М) гормона, связанного одним мг цитозольного белка. Эту величину рассчитывают по формуле:

$$N = \frac{(T - NSB) \times K}{2,22 \times A \times C},$$

где N — связывание (фМ/мг белка аликвоты ткани); T — средняя величина общего (в отсутствии конкурента) связывания меченого гормона в имп./мин, регистрируемых β -радиометром; NSB — средняя величина неспецифического (в присутствии конкурента) связывания в аналогичной аликвоте в имп./мин, регистрируемых β -радиометром; K — коэффициент, учитывающий разведение пробы суспензией угля и эффективность счета β -радиометра; 2,22 — коэффициент пересчета из имп./мин, регистрируемых β -радиометром, в Кюри/мМ; A — удельная радиоактивность ^3H -стероида в Кюри/мМ; C — концентрация белка в аликвоте в мг/мл.

7.2. Оценка относительной связывающей активности исследуемого вещества с цитозольными рецепторами прогестерона

Способность соединений конкурировать с ^3H -прогестероном за связывание (относительная конкурентная способность) в цитозольной фракции тканей матки крыс и человека оценивают по методу Schneider M. (1972) с модификациями. В пробирки, при-

готовленные для инкубации, помещают 50 нМ спиртовой раствор ^3H -P₄, спиртовой раствор исследуемого соединения, в концентрациях от 10^{-8} до 10^{-3} М и 100 мкл цитозоля с концентрацией цитозольных рецепторов не ниже 50 фмоль/мг белка. Инкубируют 2 ч, после чего добавляют 100 мкл ТЭД-буфера с 50% глицерином, встряхивают и инкубируют еще 2 ч. После чего добавляют по 200 мкл суспензии активированного угля (0,5% угля Norit A; 0,05% декстрана Т-70 в ТЭД-буфере рН 7,4 с 30% глицерином), тщательно встряхивают и инкубируют 30 мин. Затем пробы центрифугируют в течение 15 мин при 1500 g. Отбирают из каждой пробы по 100 мкл надосадочной жидкости во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости на основе диоксана и радиометрируют.

Относительную конкурентную способность соединений рассчитывают по формуле:

$$\text{RBA}\% = \frac{[\text{E}]}{[\text{I}]} \times 100\%$$

где [E] — концентрация прогестерона, вытесняющая ^3H -P₄ из комплексов с P₄-рецепторами на 50%, [I] — концентрация соединения, при которой наблюдается 50% вытеснение прогестерона из комплексов с P₄-рецепторами.

7.3. Определение относительной связывающей активности (RBA%) нового вещества с цитозольными рецепторами тестостерона

В пробирки помещают 3 нМ ЗН-дигидротестостерон и исследуемое вещество в концентрациях от 10^{-9} до 10^{-3} и 100 мкл цитозоля с концентрацией цитозольных рецепторов андрогенов не ниже 50 фемтомоль/мг белка. По окончании 18–20-часовой инкубации к каждой пробе добавляют по 100 мкл суспензии угля, покрытого декстраном (0,5% угля, 0,05% декстрана в ТЭД буфере с 10% глицерина), инкубируют 10 мин в ледяной бане. Центрифугируют в течение 15 мин при 1500 g (0–4 °С). Из каждой пробирки отбирают по 100 мкл надосадочной жидкости во флаконы со сцинтилляционной жидкостью по 5мл и проводят дальнейшее радиометрическое исследование [3].

7.4. Определение относительной связывающей активности (RBA%) нового вещества с цитозольными рецепторами глюкокортикоидов

Пробирки, содержащие 30 нМ спиртового раствора ^3H -дексаметазона и спиртовой раствор исследуемого соединения, в концентрации от 10^{-8} до 10^{-3} М и 100 мкл цитозоля с концентрацией цитозольных рецепторов не ниже 50 фмоль/мг белка, инкубируют 18–20 ч в ледяной бане. По окончании инкубации к пробам добавляют по 100 мкл суспензии угля, покрытого декстраном, в ТЭД-буфере с 10% глицерина (1,25% уголь, 0,625% декстран), встряхивают и инкубируют 10 мин при 0 °С, центрифугируют в стандартных условиях и радиометрируют 100 мкл надосадочной жидкости [3]. Дальнейшую обработку проводят, как при определении других видов рецепторов.

7.5. Определение относительной связывающей активности (RBA%) нового вещества с цитозольными рецепторами минералокортикоидов

Цитозоль получают из гомогената ткани почек адреналэктомированных крыс. Конечная концентрация ^3H -альдостерона в инкубационной системе составляет 1нМ, инкубация проводится при 37 °С 30 мин. Дальнейшие процедуры — на холоде. Для выявления неспецифического связывания параллельно инкубируют образцы цитозоля с 1000-кратным избытком немого альдостерона. Несвязанную метку отмывают с помощью угля, покрытого декстраном. RBA% проводят по методике [1].

7.6. Определение относительной связывающей активности (RBA%) нового вещества с цитозольными рецепторами эстрадиола

Определение рецепторов эстрадиола в цитозольных фракциях проводят по методу Бассалык. Для определения общего связывания пробы содержат 5 мкМ [2, 4, 6, 7] ^3H -E₂

в исследуемой фракции ткани. Для определения неспецифического связывания в пробы дополнительно добавляют 1 мМ спиртовой раствор эстрадиола. Этанол после раскапывания испаряют в токе азота. Затем добавляют исследуемую фракцию ткани, тщательно встряхивают и инкубируют 16–18 ч, после чего для осаждения несвязанного гормона добавляют 100 мкл суспензии активированного угля, покрытого декстраном (0,5% угля Norit A, 0,05% декстрана Т-70 в ТЭД-буфере рН 7,4 с 10% глицерином), тщательно встряхивают и инкубируют 15 мин. Затем пробы центрифугируют в течение 15 мин при 1500 g. Операции, исключая испарение этанола, проводят в температурном режиме 0–4 °С. Все исследования проводятся в дуплетах. По 100 мкл надосадочной жидкости из каждой пробы отбирают во флаконы с 5 мл сцинтилляционной жидкости и радиометрируют [3].

8. Исследование специфической фармакологической (гормональной) активности нового вещества

8.1. Прогестиновая/антигестагенная активность

Для оценки прогестагенной активности нового вещества достаточно использовать один из приведенных ниже тестов:

8.1.1. Оценка влияния новых соединений на дифференцировку эндометрия эстрогенизированных неполовозрелых самок крыс (тест Clauberg-McFail с модификацией)

Целью эксперимента является исследование способности вещества вызывать дифференцировку эндометрия у эстрогенизированных неполовозрелых крыс. Метод позволяет выявить гормональную активность, аналогичную природному гормону прогестерону, предсказать эффективность соединения для терапии гиперпластических процессов тканей-мишеней и заместительной гормонотерапии. Животных массой 60–90 г разделяют случайным образом на группы по 10 животных. Контрольная группа получает растворитель. В первые сутки внутрибрюшинно однократно всем животным вводится эстрадиол в дозе 0,1 мг/кг. Затем в течение 6 дней проводится введение соединений ежедневно однократно, на 7 сутки животных подвергают эвтаназии декапитацией под наркозом, выделяют матку и помещают в фиксирующий раствор для гистологического исследования. Готовят микропрепараты поперечных срезов тела матки. Проводят микроскопию образцов. Подсчитывается толщина эндометрия, количество митозов, наличие желез (децидуолизация) и сосудов. Признаками дифференцировки принимаются увеличение ширины эндометрия на 50% и более относительно контроля, эндометрий в фазе секреции — строма светлая, рыхлая, с признаками псевдодецидуоденальной трансформации клеток, особенно в функциональном слое, появление сосудов в виде мелких скоплений («клубков»), увеличение числа и размеров желез, извитую форму желез. Цитоплазма эпителия желез светлая, со значительным количеством довольно крупных вакуолей, ядра клеток были более бледные, округлые, крупные, упорядоченно расположены базально, на одном уровне. Подсчитывается число митозов — при наличии прогестиновой активности достоверно снижено относительно контроля. Данные о толщине эндометрия и числе митозов предоставляются в виде процентов от контроля. Наличие прогестиновой дифференцирующей активности считается установленным при достоверном увеличении толщины эндометрия и снижении числа митозов относительно контрольной группы. Строение эндометрия должно соответствовать фазе секреции. В заключении указывается соотношение с эффектом препарата сравнения.

8.1.2. Изучение влияния новых соединений на дифференцировку эндометрия самок кроликов в тесте Clauberg-McPhail [5]

Прогестиновую активность вещества изучают в сравнении с прогестероном методом Clauberg-McPhail на неполовозрелых кроликах-самках массой 700–1000 г. Вещество вводят

животным в течение 5 дней после предварительной эстрогенной подготовки. На следующий день после окончания введения гестагена под эфирным наркозом проводят эвтаназию животных и иссекают фрагмент матки для гистологического исследования. Оценивают степень прегравидных изменений эндометрия по 4-балльной шкале McPhail. Экспериментальные данные теста обрабатывают по уравнению регрессии: $y = a + b \lg x$, где y — индекс McPhail, x — доза соединения (мг/кг), a и b — коэффициенты регрессии. Для стандарта (прогестерона) и исследуемого вещества вычисляют эффективную дозу $ЭД_{50}$, вызывающую 50%-ный фармакологический эффект, соответствующий индексу McPhail, равному 2.

8.2. Определение способности исследуемых соединений сохранять беременность у овариэктомированных крыс

Метод позволяет предсказать эффективность соединения как средства для сохранения беременности. Методика исследования: через 10–12 сут после спаривания и наступления подтвержденной беременности самкам крыс под эфирным наркозом проводится операция по удалению яичников (овариэктомия) с целью моделирования недостаточности гестагенов. После операции животным ежедневно однократно в течение 10 сут вводится исследуемое соединение в рекомендованной для исследования форме. После последнего введения животных подвергают эвтаназии декапитацией под эфирным наркозом, вскрывают матку и подсчитывают количество плодов. В норме число плодов 9–12. Овариэктомия приводит к отсутствию плодов. Признаком наличия прогестиновой активности считается наличие плодов в матке. В заключении указывается количество плодов и процент сохранения беременности относительно контроля. Делается заключение об эффективности исследуемого соединения относительно препарата сравнения (аллилэстронола).

Тест на «несохранение беременности».

Оценивается наличие у исследуемых препаратов способности abortивного эффекта, сравнивая средние значения показателей антигестагенной активности в экспериментальных и контрольных группах. Антигестагенную активность соединений изучают на самках белых крыс с 4–5 дневным эстральным циклом, массой 160–190 г. Исследуемые вещества вводят с 7-го дня беременности животных. Внутривнутрибрюшинное введение препаратов в виде масляных растворов в дозе 10 мг/кг массы тела осуществляют в течении 3-х сут. На 10-е сутки оба рога матки иссекаются сразу после эвтаназии животного под эфирным наркозом. Подсчитывают количество мест имплантаций зародышей в матке, которые выглядят как характерные четкообразные утолщения. Для каждого животного определяют количество мест имплантации в матке. Показатель антигестагенной активности выражают в %. В контроле используется группа животных, получавших только подсолнечное масло. В каждую экспериментальную и контрольную группу вошло по 15 животных.

8.3. Оценка контрацептивной активности

Метод позволяет выявить пригодность соединений для целей контрацепции [4]. Оценивается эффективность как индивидуального соединения, так и его сочетания с этилэстрадиолом — стандартным эстрогенным компонентом контрацептивов. Исследование проводится на половозрелых самках белых крыс массой 180–200 г с 4–5-дневным эстральным циклом. Животных разделяют на группы не менее 10 особей. Исследуемые соединения вводят в рекомендованной форме в течение 14 дней. На третий день после начала введения соединений самок подсаживают к самцам на 5 дней. Антифертильный эффект (ингибирование беременности (ИБ)) соединений регистрируют на 18–20 день предполагаемой беременности и рассчитывают по формуле:

$$ИБ(\%) = \left[1 - \frac{X_0}{X_k} \right] \times 100\%,$$

где X_0 — число беременных крыс в группе, X_k — общее число крыс в группе.

8.3.1. Контрацептивная активность [5,6]

Изучение контрацептивной активности проводят на половозрелых крысах самках линии Вистар массой тела 160–180 г стандартным методом: введением препаратов (гестаген в сочетании с эстрогеном в соотношении 0,8 мг/кг и 0,04 мг/кг соответственно из расчета на килограмм массы животного) энтерально через зонд в растворе растительного масла ежедневно в течение 14 дней. На третий день введения препаратов самок подсаживают к самцам. Ежедневно проводят цитологический анализ влагалищных мазков. День обнаружения сперматозоидов в мазке считают первым днем беременности. Покрытых самок отсаживают в отдельные клетки и завершают 14-дневный курс введения испытуемых веществ. В течение 20 дней у покрытых самок продолжают брать мазки с целью определения сохранения или прерывания беременности. На 20–21 день после покрытия всех животных подвергают эвтаназии. После вскрытия проводят ревизию полости матки на наличие плодов и мест имплантаций. Контрацептивную активность (КА) рассчитывают по формуле:

$$КА(\%) = \frac{1 - Б_о \times П_к}{П_о \times Б_к} \times 100,$$

где $Б_о$ и $Б_к$ — число беременных крыс в группе животных, получавших исследуемое соединение, и в контрольной группе, соответственно; $П_о$ и $П_к$ — число покрытых крыс в группе животных, получавших исследуемое соединение, и в контрольной группе, соответственно.

Самцов используют для покрытия из расчета 2 самца на 3-х самок.

8.4. Антиовуляторная активность

Изучение влияния вещества на овуляцию, индуцированную внутривенным введением ацетата меди, проводят на 18 половозрелых кроликах-самках массой 2,5–3 кг породы «шиншилла». Часть животных (6 крольчих) получает препарат в разовой дозе 0,25 мг/кг перорально с одновременным внутривенным введением ацетата меди. Животные второй группы (6 крольчих) получают препарат в дозе 0,25 мг/кг внутрь в течение 5 дней. Одновременно с последним введением препарата проводят индукцию овуляции и подсчитывают число проовулировавших фолликулов. Полученные результаты сравнивают с показателями контрольной группы животных (6 крольчих), получавших в указанные сроки дистиллированную воду в том же объеме и раствор ацетата меди [5, 6].

8.5. Андрогенная/антиандрогенная активность

8.5.1. Прямой тест Хершберга (андрогенная активность с модификациями)

В тесте используют перипубертатных крыс самцов, кастрацию проводят на 35–42 день постнатальной жизни, посткастрационный период — 7–14 дней. Начало введения тестируемых препаратов после 50 дней жизни. Условия содержания животных — комнатная температура (22 ± 3 °С), относительная влажность 30–70%, световой режим 12×12 ч, свободный доступ к воде и пище. Ежедневное введение тест-субстанций в течение 10 последовательных дней. Животных подвергают эвтаназии примерно через 24 ч после последнего введения вещества. Группы, включая контрольную, состоят из 6 животных. В качестве растворителя используют кукурузное масло, ограничение максимального объема дозы до 0,5 мл/кг/день для п/к введения и 5мл/кг/день — внутрь. Группы рандомизируют так, чтобы средняя масса животных в группах была эквивалентна. Точность определения массы тела животного до 0,1 г. Взвешивание — ежедневно перед введением вещества. При некроскопии точность взвешивания тканей и органов до 0,1 мг — вентральной простаты, дорзо-латеральной простаты, семенных пузырьков, надпочечников, почек; до 0,1 г — печени и массы тела. В крови определяют уровень тестостерона и лютеинизирующего гормона на время эвтаназии (не обязательно). Препарат сравнения — тестостеро-

на пропионат 0,2 мг/кг/день; испытуемый препарат в дозах 0,2, 2,0 и 20,0 мг/кг/день. Дополнительный контроль — гестаген с известной андрогенной активностью (левоноргестрел). Полученные данные о массе тканей и органов выражают в относительных единицах (масса ткани/ масса тела конкретного животного) и сравнивают с эффектом контрольных препаратов. Обязательно — группа крыс, получавших только растворитель.

8.5.2. Обратный тест Хершберга (антиандрогенная активность, с модификациями)

Аналогично пункту 8.5.1, только тестируемый препарат вводят на фоне тестостерона пропионата (0,1 мг/кг/массы тела в дозах 0,2, 2,0 и 20,0 мг/кг/день). Препарат сравнения — антиандроген флутамид — в дозах 0,1, 1,0 и 10,0 мг/кг/день. Вычисления и сравнительный анализ — аналогично прямому тесту.

8.6. Эстрогенная/антиэстрогенная активность

Для оценки эстрогенной активности исследуемых веществ используют так называемый «3-дневный утеротропный тест», позволяющий определить степень активности препарата в зависимости от дозы. В исследованиях используют 21–23-дневных неполовозрелых крыс-самок смешанной популяции массой тела 30–40 г, получающих в течение 3-х дней подкожно или *per os* в различных дозах масляные растворы исследуемых веществ и стандарта (эстрон, либо эстрадиол-17-бета, либо этинилэстрадиол). Доза гестагена должна соответствовать дозе в других гормональных тестах (например, 20 мг/кг/день). Контрольным животным вводят растворитель. В каждой группе не менее 8–10 животных. На 4-й день животных подвергают эвтаназии декапитацией, матку извлекают и взвешивают с точностью до 0,5 мг. Полученные результаты обрабатывают статистически. Относительную активность препаратов определяют в % от стандарта и вычисляют по формуле:

$$ЭА = \frac{M_o}{M_{ст}} \times 100\%,$$

где ЭА — эстрогенная, утеротропная активность исследуемого соединения, M_o — средняя масса матки (мг) в группе животных, получавших исследуемое соединение, $M_{ст}$ — средняя масса матки (мг) в группе животных, получавших стандарт.

Антиэстрогенная активность высчитывается в аналогичных условиях, при этом введение прогестина осуществляется на фоне получения животным эстрогена. Результат оценивается по способности вещества предотвратить эстрогениндуцированный рост массы матки в процентах от контроля.

8.7. Глюкокортикоидная/антиглюкокортикоидная активность — тимолитический тест. Глюкокортикоидную активность оценивают по влиянию тестируемых веществ на массу тимуса по сравнению с контролем по окончании эксперимента. Антиглюкокортикоидную активность оценивают, используя комбинированное введение тестируемого вещества (в дозе 20 мг/кг/день) и глюкокортикоида (гидрокортизона ацетата в дозе 0,05 мг/животное) неполовозрелым крысам-самкам в течение 4 дней. Животные должны содержаться в стандартных условиях с размещением в клетках не плотнее 1 животное на 1 литр объема клетки (избегая перенаселенности) [1].

8.8. Минералокортикоидная/антиминералокортикоидная активность

Минералокортикоиды вызывают задержку натрия и воды.

Определение минералокортикоидной активности важно для прогнозирования побочных эффектов (отеков, повышения артериального давления, прибавки массы тела) новых соединений с гормональной активностью (глюкокортикоидов и половых стероидов). Умеренное антиминералокортикоидное действие может быть расценено как положительный эффект.

Минералокортикоидная активность определяется по достоверному снижению суточного диуреза и экскреции натрия с мочой у крыс [1], получавших исследуемое вещество в дозах и сроках согласно схеме эксперимента для выявления гормональной активности.

При помощи анализатора электролитов определяется уровень Na в моче и сыворотке крови.

Дополнительным высокочувствительным тестом является определение указанных показателей у адреналэктомированных крыс.

Животных массой 180–200 г адреналэктомируют (удаляют надпочечники) и содержат на стандартной диете. В качестве питья дают 0,9% раствор NaCl. Через 3–4 сут после операции вводят исследуемые вещества. По окончании курса введения животных помещают в устройства для сбора мочи и учитывают суточный диурез, определяют уровень электролитов с помощью анализаторов электролитов. Минералокортикоидную активность выявляют по снижению диуреза и экскреции Na с мочой, повышению концентрации Na в сыворотке крови.

Заключение

Применение данных методических рекомендаций при поиске и отборе стероидных гормонов, их синтетических аналогов и антагонистов, обладающих гормональной активностью, позволит при проведении доклинических исследований объективно оценить их специфическое фармакологическое действие с целью решения вопроса о целесообразности и возможности проведения КИ.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Baxter J.D. et al. *The J. Clin. Inv.*, 1976. — V.58, p. 579–589.
2. Shewell J. et al. *Brit. J. Pharmacol.*, 1957. — 12, 133.
3. Бассалык Л.С., М.: Медицина, 1987. — 220 с.
4. <http://www.ehponline.org/docs/2007/9666/suppl.pdf>
5. Корхов В.В., Никитина Г.В. *Фармакология и токсикология*. — 1978. — №1. — С. 55–59.
6. Зейналов О.А. // *Журнал «Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии»*. — №1. — 2005. — С. 32–36.

ГЛАВА 44

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ГЕПАТОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. А. И. Венгеровский; член-корр. РАМН, проф. В.В. Удут;
д. м. н. Д.В. Рейхарт; академик РАМН, проф. А.М. Дыгай*

Введение

Гепатопротективные средства (гепатопротекторы) предназначены для нормализации функций и метаболизма печени при ее поражениях, ускорения регенерации и восстановления функциональной активности гепатоцитов. Потребность современной медицины в гепатопротекторах достаточно велика. Они находят применение для патогенетической терапии острых, хронических гепатитов и жирового гепатоза токсической, лекарственной и алкогольной этиологии. Гепатопротекторы менее эффективны при вирусном гепатите.

По механизму лечебного действия их подразделяют на следующие группы:

1. Антиоксиданты: растительные полифенолы (силибинин, катерген, фламин, конвафлавин), витамины (α -токоферол), тиолы (цистеин, N-ацетилцистеин).
2. Средства, осуществляющие репарацию мембран гепатоцитов: препараты фосфолипидов — эссенциале, фосфоглив.
3. Стимуляторы регенерации паренхимы печени: метионин, адеметионин.

Таким образом, круг веществ с гепатопротективным действием достаточно велик, однако в современной классификации ЛС из их числа выделяют сравнительно небольшую группу препаратов, обладающих избирательным терапевтическим влиянием на печень. К ним относят силибинин, катерген, эссенциале, фосфоглив, адеметионин и некоторые другие гепатопротекторы.

1. Общие положения

Гепатопротективные средства являются средствами метаболической терапии заболеваний печени. Их фармакологическое действие обусловлено собственным антиоксидантным эффектом и потенцированием эндогенных антиоксидантных систем гепатоцитов, ингибированием фосфолиполиза с уменьшением продукции лизофосфатидов и восстановлением нормального спектра фосфолипидов мембран, депонированием ионов кальция, а также улучшением матриксной и барьерной функций цитолеммы, мембран митохондрий, эндоплазматического ретикулума (ЭПР) и лизосом. Гепатопротективные средства нормализуют обмен белков, липидов, углеводов, биоэнергетику, антитоксическую, экскреторную, холеретическую и другие функции печени, устраняют гиперферментемию, стимулируют процессы регенерации.

1.1. Цель и задачи исследования.

Целью настоящих рекомендаций является унификация методических подходов к изысканию соединений с гепатопротективным эффектом. Задачи исследования включают создание эффективных и безопасных гепатопротекторов, способных нормализовать многообразные функции и метаболизм печени при ее патологии.

Гепатопротективные средства не влияют на здоровую печень. Обязательным условием разработки гепатопротекторов является проведение экспериментов на моделях жирового гепатоза, острого и хронического гепатита. Перспективно изучение потенциальных гепатопротекторов в культуре гепатоцитов или их органоидов, поврежденных токсическими агентами. Гепатотоксины нарушают метаболизм, функции и структуру паренхимы печени.

1.2. Доклиническая оценка гепатопротекторов

Включает следующие 3 этапа:

1. Первичный отбор соединений.
2. Расширенное изучение специфической гепатопротективной активности и исследование механизма действия отобранных на первом этапе соединений.
3. Оценка общетоксического действия и специфических видов токсичности (мутагенные, канцерогенные, аллергогенные, иммунотоксические, гонадотоксические, эмбриотоксические, тератогенные, фетотоксические свойства) согласно приведенным в данном издании рекомендациям. При оценке мутагенных свойств гепатопротекторов-антиоксидантов следует иметь в виду возможность перехода антиоксидантного эффекта в прооксидантный, поэтому особое значение имеет широта дозового диапазона, в котором проявляется гепатопротективное и антиоксидантное действие.

2. Описание эксперимента и особенности его проведения

2.1. Первичный отбор потенциальных гепатопротекторов

На скрининговом этапе исследования критерием отбора потенциальных гепатопротекторов служит их более высокая терапевтическая эффективность, чем у эталонных средств. Необходимо определять острую токсичность: перспективны лишь вещества, относящиеся к III–IV классам.

Эталонные средства выбирают в зависимости от происхождения, химического строения и предполагаемого механизма действия нового соединения. Например, растительные гепатопротекторы изучают в сравнении с силибинином или катергеном, препараты фосфолипидов — в сравнении с эссенциале, стимуляторы метаболических процессов — в сравнении с адеметионином. Оптимальные терапевтические дозы в экспериментах на крысах и мышах при введении препаратов в желудок составляют для силибинина 100–200 мг/кг, катергена — 100–500 мг/кг, эссенциале — 60–80 мг/кг, адеметионина — 20–25 мг/кг.

Действие потенциальных гепатопротекторов по каждому тесту оценивают в 3–5 дозах (одна доза соответствует дозе эталонного препарата); при расширенном изучении гепатопротективной активности вещества вводят в ранее определенной оптимальной терапевтической дозе. В клинике гепатопротекторы чаще всего назначают внутрь, поэтому в эксперименте их вводят животным в желудок с помощью зонда.

Скрининг гепатопротекторов включает ряд тестов, проводимых на мелких лабораторных животных с острым токсическим гепатитом или изолированных гепатоцитах, поврежденных гепатотоксинами.

2.1.1. Острый токсический гепатит

У беспородных или линейных мышей и крыс вызывают острый гепатит введением тетрахлорметана или D-галактозамина. Тетрахлорметан в 50% растворе на оливковом масле вводят в желудок однократно в дозах 4–5 мл/кг или в течение 4–6 дней в дозах 1–1,25 мл/кг, внутривентриально однократно в дозах 0,2–0,4 мл/кг, под кожу на протяжении 2–4 дней в дозе 2 мл/кг. D-галактозамин в водном растворе вводят внутривентриально 1–3 дня в дозах 300–1000 мг/кг. Потенциальные гепатопротекторы вводят за 1 ч до введения гепатотоксинов. Контрольные животные получают гепатотоксины и экви-

объемное с потенциальными гепатопротекторами количество растворителей (вода, 1% крахмальная слизь).

Гепатит, вызванный тетрахлорметаном, характеризуется развитием колликвационного некроза, белковой и жировой дистрофии гепатоцитов, локализованных преимущественно в центральной зоне почечной долики, где максимальна активность зависимых от цитохрома Р-450 монооксигеназ и преобладает продукция повреждающих метаболитов гепатотоксина. D-галактозамин, нарушающий синтез РНК и белка, вызывает острый гепатит, идентичный по морфологическим и биохимическим изменениям в печени вирусному гепатиту человека.

Исследования проводят прижизненно в динамике и после декапитации животных под эфирным наркозом через сутки после последнего введения потенциальных гепатопротекторов. Наиболее информативными тестами, доказывающими эффективность соединений, испытываемых в качестве гепатопротекторов, являются следующие:

1. Гексобарбиталовая проба на мышах (80 мг/кг внутрибрюшинно) и крысах (60 мг/кг внутрибрюшинно) позволяет по продолжительности наркоза оценить скорость метаболизма гексобарбитала (гексенал) под влиянием цитохром Р-450-зависимой монооксигеназной системы гепатоцитов и характеризует состояние одной из приоритетных функций печени — антитоксической.

2. Проба с бромсульфалеином (БСФ) свидетельствует о состоянии экскреторной и антитоксической функций печени. Спектрофотометрически определяют содержание БСФ в крови крыс через 1, 5, 15 и 45 мин после введения красителя (1–5 мг/кг) в хвостовую вену. Вычисляют коэффициент ретенции БСФ, элиминируемого в виде конъюгатов с цистеином и глутатионом (отношение концентрации через 45 мин к концентрации через 1 мин после внутривенного вливания).

3. Относительная масса печени (отношение массы печени в мг к массе тела в г) характеризует выраженность воспалительного процесса.

4. Определение степени жировой дистрофии печени на модели гепатита, вызванного тетрахлорметаном у мышей и крыс, дает возможность оценить терапевтическую эффективность новых гепатопротекторов в отношении одного из наиболее типичных патологических процессов в поврежденном органе. Исследование проводят гистохимически с помощью окраски суданом III или IV срезов, приготовленных на замораживающем микротоме из фиксированных 10% нейтральным формалином кусочков печени. Для полуколичественной оценки содержания липидов используют пятибалльную шкалу:

— минимальная степень ожирения — гепатоциты с жировыми включениями находятся только на периферии долики в области триады;

— слабая степень — гепатоциты, содержащие липиды, занимают примерно 1/4–1/3 длины печеночных балок в перипортальной зоне;

— умеренная степень — подобные гепатоциты занимают 1/3–1/4 длины печеночных балок по периферии долики;

— высокая степень — гепатоциты с жировыми каплями занимают 1/2–2/3 длины печеночных балок;

— максимальная степень — стеатоз распространяется на всю печеночную долюку.

Гистохимический метод обнаружения липидов является более чувствительным, чем биохимический.

2.1.2. Эксперименты на изолированных гепатоцитах

В экспериментах на изолированных гепатоцитах, поврежденных добавлением в культуральную среду тетрахлорметана (2–4 ммоль) или D-галактозамина (1,85–3 ммоль), оценивают жизнеспособность клеток по тестам поглощения трипанового синего (интактные гепатоциты с неповрежденной цитоплазматической мембраной не окрашиваются при кратковременной инкубации), выхода аланинаминотрансферазы, аспаргатамино-трансферазы и лактатдегидрогеназы в среду инкубации.

3. Расширенное изучение специфической гепатопротективной активности и исследование механизма действия отобранных на первом этапе соединений

3.1. Модели острой патологии печени

Для моделирования острого гепатита на крысах применяют гепатотоксины с различными механизмами патогенного действия:

1. Гепатотоксины, преобразуемые зависимой от цитохрома Р-450 монооксигеназной системой в свободные радикалы и электрофильные интермедиаты, ковалентно связывающие биомакромолекулы центрoлобулярных гепатоцитов (тетрахлорметан, галоган, бромбензол, парацетамол, тетрациклин, изониазид).

2. Аллиловый спирт, окисляемый цитозольной и митохондриальной алкогольдегидрогеназой в электрофильный метаболит акролеин, повреждающий перипортальные гепатоциты вследствие дефицита в них восстановленного глутатиона.

3. 4-пентеновую кислоту, нарушающую β -окисление средне- и длинноцепочечных жирных кислот в митохондриях печени и орнитиновый цикл синтеза мочевины с развитием эндогенной интоксикации и печеночной энцефалопатии.

4. Гепатотоксины, первично нарушающие синтез РНК и белка в гепатоцитах (D-галактозамин)⁸.

Бромбензол вводят внутривентриально в дозах 0,25–0,4 мг/кг однократно; парацетамол (ацетаминофен) — в желудок в дозах 500–1000 мг/кг 1–2 дня; тетрациклин — в желудок в дозе 500 мг/кг на протяжении 5 дней; изониазид — в желудок в дозе 540 мг/кг 6 дней; аллиловый спирт — в желудок в дозах 0,05–0,1 мл/кг или внутривентриально в дозе 0,05 мл/кг 1–2 дня, 4-пентеновую кислоту — внутривентриально в дозе 20 мг/кг на протяжении 7 дней. Ингаляцию галогана проводят в концентрации 0,5–1 об% в течение 2–4 ч (концентрацию кислорода во вдыхаемой смеси снижают до 10–14 об%). Применение тетрачлорметана и D-галактозамина для моделирования гепатита описано выше.

Жировой гепатоз вызывают у крыс с помощью интоксикации гидразином (в желудок 180–200 мг/кг, 1–2 дня) или этанолом (в желудок 7–10 мл/кг 40% раствора, 7 дней).

Повреждение печени для оценки гепатопротективного эффекта получают также временным (20–30 мин) пережатием печеночной артерии и воротной вены. Ишемия моделирует ситуации, возникающие при трансплантации печени, сердечно-сосудистой недостаточности и инфаркте миокарда. Влияние гепатопротекторов на процессы регенерации паренхимы печени оценивают на модели резекции ее 1/3–1/2 части.

Потенциальные гепатопротекторы вводят профилактически за 1–2 ч до поступления в организм гепатотоксинов или ишемии, одновременно с гепатотоксинами или с лечебной целью на фоне сформированной патологии печени. Продолжительность профилактического применения гепатопротекторов соответствует сроку введения гепатотоксинов и дополнительно 7–10 дней, лечебного применения — 10–14 дней.

О влиянии потенциальных гепатопротекторов на состояние пораженной паренхимы печени судят по следующим тестам:

1. *Гистологическое строение печени.* На обзорных препаратах печени, окрашенных гематоксилином-эозином или пикрофуксином, изучают гистологическую картину, подсчитывают количество некротизированных гепатоцитов (имеющих ядра в состоянии пикноза, лизиса или безъядерных) на 2500 клеток в 40 полях зрения, морфометрически определяют размеры ядра и цитоплазмы и их соотношение.

2. *Гистохимические показатели состояния печени.* Нуклеиновые кислоты, белки, гликоген, липиды, активность ферментов в печени определяют согласно методикам, описанным в руководствах по гистохимии. Количественные изменения гистохимических показателей оценивают с помощью цитофотометрии в проходящем свете. Содержание

⁸ Возможно также использование хлорпромазина (аминазин), α -аманитина, фаллоидина, лиофилизированного экстракта бледной поганки, гелиотропина, эндотоксина *E. coli* и других гепатотоксинов.

гликогена и активность глюкозо-6-фосфатазы рационально определять также биохимическими методами.

3. *Ультроструктура паренхимы печени.* Исследование проводят с помощью электронной микроскопии.

4. *Биохимические показатели крови, отражающие метаболизм и функции печени* (рационально использовать стандартные наборы реактивов).

3.2. Активность ферментов печеночного происхождения в крови

Для дифференциальной диагностики патологических синдромов, установления эффективности и механизма действия потенциальных гепатопротективных средств достаточно исследовать активность индикаторных ферментов цитолитического синдрома (аминотрансферазы, γ -глутамилтрансферазы, лактат-, сорбит-, глутамат-, малатдегидрогеназы, альдолазы, уроканиназы, кислой фосфатазы, фосфолипазы A_2 и др.); секреторных ферментов (псевдохолинэстераза) и экскреционных ферментов — маркеров холестаза (щелочная фосфатаза, лейцинаминопептидаза, 5'-нуклеотидаза и др.). Из них печеночноспецифическими ферментами являются уроканиназа, термостабильная фракция лактатдегидрогеназы, глутаматдегидрогеназа.

3.3. Содержание в крови белков, липидов, углеводов

В сыворотке крови определяют содержание общего белка, альбуминов, глобулинов (α_1 , α_2 , β , γ), глюкозы, общих липидов, триглицеридов, холестерина, фосфолипидов, фракций липопротеинов различной плотности.

3.4. Участие печени в синтезе прокоагулянтов

В крови определяют содержание фибриногена, протромбина, тромбина и других факторов свертывания крови (VII, IX и X), вычисляют протромбиновый индекс.

3.5. Экскреторная функция печени

В крови измеряют ретенцию БСФ (см. раздел I), содержание общего и прямого билирубина. Вычисляют коэффициент глюкуронирования билирубина как отношение концентраций связанного с глюкуроновой кислотой (прямого) и общего билирубина. По результатам этих исследований можно судить о способности ферментов гепатоцитов катализировать реакции конъюгации, так как 80–100% билирубина связывается с глюкуроновой кислотой.

3.6. Антитоксическая функция печени

Исследования проводят на фоне интоксикации тетрахлорметаном, парацетамолом или D-галактозамином. Эти гепатотоксины наиболее глубоко повреждают антитоксическую функцию печени. Необходимо также исследовать влияние потенциальных гепатопротекторов на антитоксическую функцию печени интактных животных с целью выявления свойств индукторов или ингибиторов метаболизма ксенобиотиков.

3.6.1. Содержание РНК, белка и цитохромов

Измеряется в микросомальной фракции печени, содержащей 90–95% белка ЭПР. Анализы проводят в пределах суток после выделения микросом. Содержание цитохромов P-450 и P-420 определяют на двулучевом спектрофотометре по величине поглощения комплекса восстановленных гемопротеинов с окисью углерода соответственно при длинах волн 420 и 450 нм; количество цитохрома b_5 регистрируют по разнице в поглощении между окисленной и восстановленной формами.

3.6.2. Стабильность цитохрома P-450

Стабильность оценивают по интенсивности образования функционально инертного цитохрома P-420 в процессе инкубации микросом в течение 30 мин при 37 °С. Рассчитыв-

вают степень спонтанной тепловой инактивации цитохрома Р-450 как изменение в процентах разностей между конечным содержанием этого гемопротейна и цитохрома Р-420 по сравнению с исходной величиной, а также период полуинактивации цитохрома Р-450 (время, за которое половина его молекул превращается в цитохром Р-420).

3.6.3. Каталитическая активность микросом

Каталитическую активность микросом в реакциях метаболической трансформации оценивают с использованием различных субстратов изоферментов цитохрома Р-450 (N-деметилирование аминопирина, п-гидроксигирование анилина, ароматическое гидроксигирование фенобарбитала). Рационально также полярографическое изучение окисления гексобарбитала и аминопирина.

3.6.4. Дыхательная функция микросом

Дыхательную функцию микросом регистрируют полярографически по скорости окисления НАД•Н и НАДФ•Н.

3.6.5. Интенсивность реакций второй фазы биотрансформации

Интенсивность реакций второй фазы биотрансформации — реакций конъюгации характеризуют по активности УДФ-глюкуронилтрансферазы, а также по содержанию в крови глюкуронированного (прямого) билирубина и скорости экскреции БСФ.

3.6.6. Показатели эндогенной интоксикации

Показатели эндогенной интоксикации изучают на модели патологии печени, вызванной 4-пентеновой кислотой; в крови определяют содержание аммиака, мочевины, свободных фенолов.

3.7. Биоэнергетика печени

Функциональное состояние митохондрий печени исследуют полярографическим методом с помощью закрытого электрода Кларка по скорости потребления кислорода в различных метаболических состояниях по Б. Чансу. Рассчитывают скорости потребления кислорода до ($V_{4п}$), во время (V_3) и после ($V_{4о}$) цикла фосфорилирования добавленной АДФ (0,1 ммоль) при окислении эндогенных субстратов, флавинозависимого субстрата сукцината (1 и 5 ммоль) и НАД-зависимых субстратов малата и глутамата (по 3 ммоль), измеряют время фосфорилирования добавленной АДФ. Для оценки энергетического статуса митохондрий вычисляют коэффициенты сопряженности окислительного фосфорилирования (АДФ/О), стимуляции дыхания ($СД=V_3/V_{4п}$) и дыхательного контроля ($ДК=V_3/V_{4о}$). Вклад окисления эндогенного сукцината при окислении митохондриями НАД-зависимых субстратов вычлняют внесением в среду инкубации ингибитора сукцинатдегидрогеназы малоната (2 ммоль) и ингибитора аминотрансфераз аминоксидата (0,5 ммоль).

3.8. Желчеобразовательная функция печени

Исследование проводят на интактных животных и животных с гепатитом, вызванным тетрахлорметаном. О наличии у потенциальных гепатопротекторов холеретических свойств судят по скорости секреции желчи и концентрации в ней билирубина, холестерина и желчных кислот.

3.9. Перекисное окисление липидов (ПОЛ) и активность антиоксидантной системы печени

Исследование проводят вследствие важной роли, которая отводится антиоксидантному эффекту в механизме терапевтического действия гепатопротекторов. Моделями для изучения антиоксидантного влияния гепатопротекторов служит патология печени, вызванная гепатотоксинами с прооксидантными свойствами (тетрахлорметан, бромбен-

зол, парацетамол, галотан, аллиловый спирт и др.). В липидных экстрактах гомогенатов, микросом и митохондрий печени измеряют содержание первичных продуктов ПОЛ-диеновых конъюгатов и вторичных продуктов — оснований Шиффа. Исследуют также кинетику образования малонового диальдегида в реакции с тиобарбитуровой кислотой при стимуляции ПОЛ *in vitro* ионами двухвалентно железа и аскорбиновой кислотой или ферментативным путем с помощью НАДФ•Н.

Состояние антиоксидантной защиты печени оценивают по содержанию восстановленного и окисленного глутатиона, активности глутатионпероксидазы, глутатион-редуктазы и глутатион-S-трансферазы, супероксиддисмутазы, каталазы, глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы, антирадикальной активности мембранных липидов.

3.10. Содержание фракций липидов и фосфолипидов в печени

В липидных экстрактах гомогенатов, микросом и митохондрий печени интактных животных и животных с экспериментальной патологией, получавших потенциальные гепатопротекторы, определяют суммарное содержание липидов и количество их фракций — фосфолипидов, свободного холестерина, моно-, диацилглицеридов, свободных жирных кислот, триглицеридов, эфиров холестерина, а также суммарное содержание фосфолипидов и количество их фракций. Рациональна идентификация жирных кислот в составе фосфолипидов печени.

Часть перечисленных экспериментов возможно осуществлять на изолированной печени, перфузируемой средой с добавленными гепатотоксинами и гепатопротекторами.

3.11. Экспериментальный фиброз печени

Фиброз печени моделируют у крыс введением тетрахлорметана (самостоятельно или совместно с этанолом) или тиоацетамида. Тетрахлорметан вводят дважды в неделю внутрибрюшинно в дозах 0,5–1 мл/кг в течение 5–10 недель, либо под кожу в дозах 0,25–2 мл/кг в течение 6–8 мес. Ускорить формирование хронического патологического процесса в печени можно потенцированием гепатотоксического эффекта тетрахлорметана с помощью этанола. По этой методике тетрахлорметан вводят в желудок по 0,1 мл/кг дважды в неделю в течение 6 недель, этанол — в виде 5% раствора в качестве питья вместо воды на протяжении всего исследования. Тиоацетамид вводят ежедневно внутрибрюшинно в дозах 50–100 мг/кг 1–2 мес. Помимо рассмотренных выше показателей в гомогенатах печени определяют содержание оксипролина и пролина во фракциях солерастворимого, кислоторастворимого и кислотонерастворимого коллагена, активность пролингидроксилазы, количества гликозаминогликанов и гликопротеинов. Большое значение имеет морфогистохимическое исследование печени, включая выявление компонентов соединительной ткани. В сыворотке крови измеряют содержание гликозаминогликанов и гликопротеинов.

3.12. Исследование гепатопротективного эффекта в культуре гепатоцитов

Исследования проводят на изолированных гепатоцитах (в том числе на культивируемых отдельно центролобулярных и перипортальных клетках), в среду инкубации которых помещают растворимые в воде гепатопротекторы (примерная концентрация для индивидуальных веществ составляет 0,01–1 мг/мл) и гепатотоксины (тетрахлорметан — 2–4 ммоль, парацетамол 1,75–10,4 ммоль, D-галактозамин 1,85–3,5 ммоль, тиоацетамид 1,35–5,3 ммоль, аллиловый спирт — 100–175 мкмоль, акролеин — 1,5–5 ммоль, гидразин — 8–20 ммоль). Определяют показатели жизнеспособности гепатоцитов (см. раздел 1) а также исследуют морфологию клеток, биотрансформацию в них ксенобиотиков, процессы липопероксидации, транспорт ионов. Гепатопротективное действие *in vivo* и *in vitro* могут не коррелировать.

Для оценки мембраностабилизирующего эффекта потенциальных гепатопротекторов исследуют их способность повышать резистентность эритроцитов к осмотическому и механическому повреждению и предотвращать развитие гемолиза.

4. Оценка общетоксического действия и специфических видов токсичности

Исследуют влияние гепатопротекторов на основные органы и системы в условиях хронического эксперимента, а также возможные мутагенные, канцерогенные, аллергогенные, иммунотоксические, гонадотоксические, эмбриотоксические, тератогенные, фетотоксические эффекты.

Экспериментальные данные подвергают статистической обработке методами, соответствующими полученным результатам, и представляют в форме таблиц и графиков.

5. Интерпретация результатов

Объем конкретного исследования может не включать все приведенные в данных рекомендациях методы. Важно подобрать адекватные модели патологии печени, доказать более высокую, чем у эталонных средств, гепатопротективную эффективность соединений и установить основные механизмы их действия (антиоксидантный эффект, уменьшение синдромов цитолиза и холестаза, жировой дистрофии и некроза гепатоцитов).

Заключение

В настоящее время фармакологическая группа гепатопротективных средств представлена небольшим количеством препаратов. Вместе с тем потребность в защите метаболизма печени от токсических воздействий остается высокой в связи с неблагоприятной экологической обстановкой. Создание новых препаратов с гепатопротективным эффектом является актуальной задачей. Предлагаемая схема позволяет провести клинические исследования перспективных гепатопротекторов, исключив уже на ранних этапах исследования соединения, недостаточно активные или токсичные.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. — М.: Медицина, 1990. — 384 с.
2. Арчаков А.И., Лисица А.В., Петушкова Н.А., Карузина И.И. // Клиническая медицина. — 2008. — № 2. — С. 4–8.
3. Буеверов А.О. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 2002. — № 4. — С. 21–25.
4. Венгеровский А.И., Батурина Н.О., Саратиков А.С. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2000. — № 2. — С. 76–80.
5. Гришина М.А., Погребной А.А., Потемкин В.А., Зракова Т.Ю. // Химико-фармацевтический журнал. — 2005. — № 10. — С. 3–7.
6. Кондрашова М.Н. // Биохимия. — 1991. — № 3 — С. 388–405.
7. Новиков В.Е., Климкина Е.И. Гепатопротекторы. — Смоленск, 2006. — 120 с.
8. Самигулина Л.И., Лазарева Д.Н. // Экспериментальная и клиническая фармакология. — 2004. — № 4. — С. 77–80.
9. Силуянова С.Н., Андрианова Л.Е., Лесничук С.А. // Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. — 2002. — № 3. — С. 50–56.
10. Чернов Н.Н., Березов Т.Т., Буробина С.С. Биохимия: Руководство к практическим занятиям. — М.: ГЭОТАР Медиа, 2009. — 240 с.
11. Чиркин А.А., Данченко Е.О. Биохимия: Учебное руководство. — М.: Медицинская литература, 2010. — 624 с.
12. Albano E. // Mol Aspects Med. — 2008. — Vol. 29, № 12. — P. 9–16.
13. Campion S., Tatis-Rios C., Augustine L. et al. // Toxicol Appl Pharmacol. — 2009. — Vol. 236, № 1. — P. 49–58.
14. Coen M., Hong Y., Clayton T. et al. // J. Proteome Res. — 2007. — Vol. 6, № 7. — P. 2711–2719.

15. Donthamsetty S., Bhave V., Mitra M. et al. // *Hepatology*. – 2007. – Vol. 45, № 2. – P. 391–403.
16. Ito K., Ozasa H., Noda Y. et al. // *Hepatology Res.* – 2008. – Vol. 38, № 2. – P. 194–201.
17. Jaeschke H., Bajt M. // *Toxicol. Sci.* – 2006. – Vol. 89, № 1. – P. 31–41.
18. Johnston D., Kroening C. // *Pharmacol. Toxicol.* – 1998. – Vol. 83, № 6. – P. 231–239.
19. Kaplowitz № // *J. Hepatol.* – 2000. – Vol. 32, Suppl. 1. – P. 39–47.
20. Knight T., Fariss M., Farhood A., Jaeschke H. // *Toxicol. Sci.* – 2003. – Vol. 76, № 2. – P. 229–236.
21. Matal J., Jancova P., Siller M. et al. // *Neuroendocrinol Lett.* – 2008. – Vol. 29, № 5. – P. 738–743.
22. Muriel P., Moreno M., Hernández M. et al. // *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* – 2005. – Vol. 96, № 5. – P. 375–380.
23. Nguyen P., Leray V., Diez M. // *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.* – 2008. – Vol. 92, № 3. – P. 272–283.
24. Olofsson S., Boström P., Andersson L. et al. // *Biochim Biophys Acta.* – 2009. – Vol. 1791, № 6. – P. 448–458.
25. Szymonik-Lesiuk S., Czechowska G., Stryjecka-Zimmer M. et al. // *J. Hepatobiliary Pancreat. Surg.* – 2003. – Vol. 10, № 4. – P. 309–315.
26. Webb C., Twedt D. // *Vet. Clin. North. Am. Small. Anim. Pract.* – 2008. – Vol. 38, № 1. – P. 125–135.

ГЛАВА 45

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВОРВОТНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. м. н., проф. В.И. Легеца; д. м. н., проф. С.В. Ченур,
к. м. н. И.С. Драчев; д. м. н. Ю.С. Турлаков; к. м. н., доц. А.Б. Селезнев*

Введение

Рвота — неспецифическая защитная реакция, в основе которой лежит сложный рефлекторный акт, при котором происходит сокращение поперечнополосатых мышц брюшного пресса и диафрагмы, патологическая активация гладкомышечных образований пищевода, желудка и верхних отделов кишечника, приводящие к импульсному обратному движению химуса с его выбросом через рот (нос). Рвота возникает при целом ряде патологических состояний (отравление, инфекционные заболевания, закрытая черепно-мозговая травма и др.) и сама по себе может приводить к опасным для жизни и здоровья последствиям. Механизмы развития рвотной реакции к настоящему времени подробно изучены, в частности установлено, что реализация данного сложного защитного рефлекса происходит под контролем т.н. рвотного центра. По существующим представлениям координацию рвотной реакции и ряда других диспепсических проявлений (тошнота, гастростаз, ретчинг) осуществляют нервные образования продолговатого мозга, функционально взаимосвязанные с т.н. хеморецепторной триггерной зоной (ХТЗ), расположенной в нижней части дна IV желудочка. Рецепторные образования ХТЗ способны взаимодействовать с большим количеством биологически активных веществ (серотонин, гистамин, дофамин, простагландины и др.), повышение концентрации которых в крови способно вызывать развитие рвотной реакции. Рвотный центр имеет тесные структурные и функциональные взаимосвязи с дыхательным, сосудодвигательным, кашлевым и др. специализированными центрами продолговатого мозга, а также ретикулярной формации ствола головного мозга, вегетативными центрами, находящимися на различных иерархических уровнях организации вегетативной нервной системы.

По патогенетическому механизму инициирования эметической реакции можно выделить висцеральную, гематогенно-токсическую и центральную рвоту. Пусковым механизмом висцеральной рвоты являются афферентные сигналы из ЖКТ, желчных путей, брюшины, коронарных артерий, идущие по блуждающему нерву и симпатическому нервному стволу.

К центральной рвоте приводит непосредственное воздействие на рвотный центр. В качестве примера можно привести рвоту при увеличении внутричерепного давления, заболеваниях головного мозга (менингите, энцефалите, абсцессах и опухолях головного мозга), воздействии на вестибулярный аппарат, подкорковые структуры и корковые центры. В эту же группу можно включить и т.н. психогенную рвоту при истерическом неврозе (истерическая рвота), а также варианты привычной рвоты при других заболеваниях нервной системы. В значительной степени механизмы инициации рвоты сопряжены с изменением функционирования центральных и периферических дофаминергических и серотонинергических нейронов, нарушениями медиации в нейрокининовых сигнальных системах.

Гематогенно-токсическая рвота наблюдается при накоплении в крови токсических продуктов нарушенного метаболизма (при уремии, декомпенсированном сахарном

диабете, печеночной недостаточности, порфирии, тиреотоксикозе), циркуляции в крови экзогенных ядов (угарный газ, хлор, алкоголь и др.), лекарственных интоксикациях (препаратами наперстянки, рентгеноконтрастными средствами, цитостатиками, сульфаниламидами, препаратами железа, некоторыми наркотиками, апоморфином и др.). К этому же виду следует отнести рвоту при различных инфекционных болезнях, связанную с действием токсинов возбудителей. Механизм возникновения гематогенно-токсичной рвоты связан с активацией ХТЗ, импульсы из которой далее поступают в моторную зону рвотного центра.

Различие патогенетических механизмов возникновения рвоты обуславливает наличие множества эметических моделей на животных (апоморфиновая, радиационная, ци-сплатиновая и др.), применяемых для выявления у ЛС противорвотной активности и оценки эффективности противорвотных средств. Кроме того, моделирование рвоты на наиболее часто используемых в лабораторных исследованиях грызунах (мыши, крысы, кролики) невозможно в связи с отсутствием у них рвотного центра. Поэтому с учетом механизмов формирования эметического синдрома для первичной скрининговой оценки препаратов на грызунах применяются т.н. непрямые методы отбора противорвотных средств (метод Бецольд-Яриша, вкусовая аверзия и др.).

Купирование рвоты и рефлюксов пищевых масс осуществляется посредством применения прокинетики и противорвотных средств, исследованию эффективности которых посвящены настоящие методические рекомендации.

1. Изучение противорвотной активности фармакологических веществ

Оценка противорвотной активности фармакологических средств включает в себя следующие основные этапы:

- первичный отбор;
- углубленное изучение специфической противорвотной активности;
- изучение фармакологических свойств, особенностей действия и безвредности.

1.1. Первичный отбор

Поиск противорвотных средств проводят в исследованиях на собаках при моделировании рвотной реакции введением эметических агентов — апоморфина или сульфата меди.

Апоморфиновая рвота вызывается у собак подкожным введением апоморфина гидрохлорида в дозе 0,1 мг/кг.

Рефлекторная рвота вызывается введением в желудок 2% раствора сульфата меди в объеме 0,5 мл/кг.

Эметогенные средства вводят не менее чем через 12–20 ч после кормления.

Антиэметическое действие нового препарата изучается при подкожном или внутримышечном введении его в дозе, составляющей 1/10 от ЛД₅₀ для мышей, за 35–45 мин до инъекции апоморфина. Эти исследования можно проводить на одних и тех же животных многократно, но не чаще одного раза в неделю. Собаки со слабой рвотной реакцией (два–три рвотных акта в ответ на введение эметогенных средств) должны выводиться из исследования.

Первоначально каждое соединение целесообразно исследовать не менее чем на трех животных. В том случае, если рвота у получавших соединение собак не наступает, исследования повторяют, доводя объем выборки до установленного настоящим Руководством.

В процессе эксперимента регистрируют время появления каждого рвотного акта и количество рвотных актов с выбросом желудочного содержимого.

Противорвотное действие изучаемого вещества оценивают путем сравнения количества животных с наличием рвотного акта в получавшей изучаемое вещество и контрольной группах, сравнения количества рвотных актов у животных в получавших изучаемое вещество группах, сравнения латентных периодов проявления эметического синдрома.

В исключительных случаях первичный отбор противорвотных препаратов для купирования рвоты после лучевой терапии злокачественных онкологических заболеваний разрешается проводить на грызунах с использованием непрямых методов, например методом Бецольд-Яриша.

При выявлении эффективного противорвотного средства изучают его соответствие критериям отбора, изменяя время введения препарата. По результатам экспериментов рассчитывают индекс противорвотной эффективности (ИЭ) в процентах:

$$ИЭ = 100 \times \frac{(P_k - P_o)}{P_k}, \quad (1)$$

где P_k — количество случаев рвоты в контрольной группе, P_o — количество случаев рвоты в получавшей изучаемое вещество группе.

Влияние препарата на интенсивность проявления эметической реакции и динамику ее протекания оценивают по длительности скрытого периода (от момента введения эметогенного препарата до начала рвоты), среднему количеству рвотных актов за период наблюдения. На основании этих показателей определяют скорость наступления противорвотного эффекта, продолжительность действия препарата, а также оценивают его эффективность в период максимальной выраженности (акрофазы) эметической реакции.

Критериями отбора ЛС для дальнейшего исследования являются:

- индекс эффективности не менее 50%;
- скорость наступления противорвотного эффекта не более 10 мин;
- продолжительность антиэметического действия сохраняется в течение 2 ч после однократного введения противорвотного средства.

При соответствии препарата указанным требованиям его свойства продолжают изучать на последующих этапах доклинического исследования.

1.2. Углубленное изучение специфической активности

В случае обнаружения при первичном отборе соединений, обладающих выраженным противорвотным действием, приступают ко второму этапу исследований, который начинают с изучения противорвотной активности препаратов на модели радиационной или цитостатической рвоты.

Радиационную рвоту моделируют на собаках массой 8–16 кг при общем гамма-облучении животных в дозах от 8 до 100 Гр. При воздействии в дозах от 8 до 20 Гр мощность облучения должна составлять не менее 0,5 Гр/мин. Для исследования препаратов при более высоких дозах собак облучают при мощности дозы от 2,0 до 5,0 Гр/мин.

В день облучения собак не кормят, воду не ограничивают. Контрольных и получающих изучаемое соединение вещество животных распределяют на равноценные группы по массе тела и полу. Контрольным собакам назначают плацебо — тем же способом и в те же сроки, что и исследуемый противорвотный препарат.

Проводят три серии исследований со следующими условиями: I серия — контрольное облучение животных, II серия — профилактическое введение антиэметиков (облучение + изучаемое соединение, введенное до облучения), III серия — терапевтическое введение антиэметиков (облучение + изучаемое соединение, введенное после облучения). Для исследования препаратов в каждой дозе и в каждый временной диапазон формируют группы не менее чем по 4 собаки в каждой. В каждой серии исследований допустимо формировать по одной группе плацебо при условии введения одинакового объема препаратов в одинаковые сроки.

Для моделирования цитостатической рвоты используют противоопухолевые препараты, вызывающие выраженные диспепсические осложнения у пациентов — платидиам, циклофосфан, сарколизин и др. Исследования проводят на собаках массой 8–20 кг, препараты вводят парентерально в среднетерапевтических дозах, перерасчет которых применительно к лабораторным животным проводят в соответствии с требованиями на-

стоящего Руководства. Количество серий и групп, получающих изучаемые соединения животных, должно быть таким же, как описано выше для радиационной модели.

Наблюдения за животными проводят в течение не менее 5 ч. За несколько суток до эксперимента регистрируют «контрольные» значения поведения экспериментальных животных, которые фиксируют в карте регистрации первичной реакции на облучение (см. приложение). В эту же карту регистрируют и изменения, происходящие после приема антиэметиков.

В дополнение к ранее описанным характеристикам эффективности при лечебном применении препарата рассчитывают частоту случаев прекращения рвоты в ближайший период после введения препарата (15–20 мин), количество случаев рецидивов рвоты, при профилактическом применении — количество случаев позднего начала рвоты (через 2–3 ч).

По результатам экспериментов с использованием исследуемого препарата не менее чем в трех диапазонах доз рассчитывают его ЭД₅₀ для купирования радиационной и цитостатической рвоты.

2. Изучение общих фармакологических свойств и безвредности

Для изучения фармакодинамики, безвредности и механизма противорвотного действия антиэметиков используют те способы введения и лекарственные формы, в которых они будут рекомендованы человеку.

Острую токсичность определяют на трех видах животных, в том числе обязательно определение токсичности препарата на одном из видов, не относящихся к грызунам и зайцеобразным. В этих исследованиях устанавливают максимально переносимые (не вызывающие токсических проявлений) и смертельные дозы. Для грызунов обязательно определение следующих категорий доз препаратов — ЛД₁₆, ЛД₅₀, ЛД₈₄, для крупных животных обязательным является определение ЛД₅₀. Срок наблюдения за животными составляет — 14 сут. По итогам экспериментов рассчитывают широту терапевтического действия, в процентах:

$$\text{ШТД} = \text{ЛД}_{50} / \text{ЭД}_{50}, \quad (2)$$

где ЛД₅₀ — среднесмертельная доза препарата на собаках, ЭД₅₀ — среднеэффективная доза препарата по купированию радиационной или цитотоксической рвоты.

Препарат подвергают дальнейшему изучению в случае, если его ШТД составляет не менее 40 при терапевтическом применении противорвотного средства и не менее 100 при профилактическом применении противорвотного средства.

Для уточнения механизмов противорвотного действия и фармакологической характеристики антиэметика можно использовать широкий набор фармакологических методов провокации рвоты. У собак рвотная реакция вызывается внутривенным введением адреналина гидрохлорида (0,15 мг/кг), L-ДОФА (3 мг/кг), гистамина гидрохлорида (1 мг/кг), строфантина (0,1 мг/кг), салицилата натрия (300 мг/кг), внутримышечным введением морфина гидрохлорида (1 мг/кг). Указанные дозы эметиков составляют 1,5–2,0 ЭД₅₀ и вызывают обычно многократную рвоту у 100% животных.

Оценка безопасности препаратов при подостром и хроническом применении, характеристики их фармакокинетики, местнораздражающего действия и специфической токсичности проводится в соответствии с общепринятым алгоритмом.

Заключение

Фармакологические вещества могут быть отнесены к специфическим антиэметикам, если в условиях моделей радиационной или цитостатической рвоты обладают доказанной противорвотной активностью, а также соответствуют критериям безопасности препаратов при подостром и хроническом применении.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Fox R.A., Current status: animal models of nausea / R.A. Fox // Mechanisms and Control of Emesis. — Colloque Inserm / John Libbey Eurotext Ltd, 1992. — Vol. 223. — p. 341–350.
2. Лерега, В.И. Эметический синдром / В.И. Лерега, И.Ш. Галеев, А.Б. Селезнев. — СПб: Фолиант, 2005. — 144 с.
3. Bogle, R.G. Evidence that central 5-HT_{1A}-receptors play a role in the von Bezold-Jarisch reflex in the rat / R.G. Bogle, J.G.P. Pires, A.G. Ramage // Br. J. Pharmacol. — 1990. — Vol. 100. — P. 757–760.
4. Abraham, A. Cancer chemotherapy and radiation induced emesis (CRIE): current and future therapeutic approaches / A. Abraham, №. Sridhar, A. Veeranjanyulu // Indian J. of Pharmacol. — 2000. — Vol. 32. — P. 256–268.
5. Yamamoto, K. Establishment of an animal model for radiation-induced vomiting in rats using pica / K. Yamamoto, №. Takeda, A. Yamatodani // J. Radiat. Res. — 2002. — Vol. 43. — P. 135–141.

Приложение 1

Карта регистрации первичной реакции на облучение

Мать		Шифр НИОКР	
Пол		Собака №	
Масса		Доза облучения	
Дата и время облучения		Шифр группы	

Время наблюдения		Произвольная двигательная активность	Вызванная двигательная активность (реакция на экспериментатора)	Эметический синдром		
				Саливация и облизывание	Количество рвотных актов	Реакция на пищу
часы	минуты	Система бальной оценки				
		Лежит на боку — 0; лежит, голова на лапах — 1; лежит, держит голову — 2; сидит — 3; стоит — 4; ходит — 5; двигательное беспокойство — 6		Не меняет позы — 0; поднимает и поворачивает голову — 1; ложиться — 2; садится — 3; встает — 4; подходит — 5; прыгает — 6		
Исходный фон (регистрируется за сутки до эксперимента)						
0	00					
	15					
	30					
	45					
	60					
До облучения						
2	45					
	30					
	15					
	00					

Время наблюдения		Произвольная двигательная активность	Вызванная двигательная активность (реакция на экспериментатора)	Эметический синдром		
				Саливация и облизывание	Количество рвотных актов	Реакция на пищу
Система бальной оценки						
часы	минуты	Лежит на боку – 0; лежит, голова на лапах – 1; лежит, держит голову – 2; сидит – 3; стоит – 4; ходит – 5; двигательное беспокойство – 6	Не меняет позы – 0; поднимает и поворачивает голову – 1; ложиться – 2; садится – 3; встает – 4; подходит – 5; прыгает – 6			
1	45					
	30					
	15					
	00					
0	45					
	30					
	15					
	00					
После облечения						
0	00					
	15					
	30					
	45					
1	00					
	15					
	30					
	45					
2	00					
	15					
	30					
	45					
3	00					
	15					
	30					
	45					
4	00					
	15					
	30					
	45					
5	00					
	15					
	30					
	45					

Примечание. Временной период введения противорвотного средства обводится кружком

Подпись экспериментатора _____ (_____)

Подпись лаборанта _____ (_____)

ГЛАВА 46

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ПРОСТАТОТРОПНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: д. б. н., проф. Т.Г. Боровская; к. м. н. Т.И. Фомина;
д. б. н., проф., член-корр. РАМН А.Д. Дурнев; член-корр. РАМН, проф. В.В. Удут;
к. м. н. А.В. Пахомова; З.А. Юрмазов
Отв. ред. д. м. н., проф., академик РАМН А.М. Дыгай.*

Введение

К препаратам простатотропного типа действия относятся вещества, обладающие благоприятным тканеспецифическим действием на предстательную железу. Эти препараты могут быть эффективными при лечении наиболее распространенных заболеваний предстательной железы, к числу которых относятся прежде всего простатиты. На сегодняшний день принято классифицировать простатит согласно рекомендациям NIN [37]. В этой классификации выделяют 4 категории простатитов. Категория 1 — острый бактериальный простатит. Категория 2 — хронический бактериальный простатит. Категория 3 — хронический абактериальный простатит или синдром хронической тазовой боли. Категория 4 — бессимптомный воспалительный простатит. Синдром хронической тазовой боли может быть с воспалительным компонентом — хронический абактериальный простатит (ХАП) и без него — хронический невоспалительный простатит (ХНП). Частота встречаемости острых бактериальных простатитов (ОБП), хронических бактериальных простатитов (ХБП) в 8 раз ниже, чем их абактериальных форм. При терапии ОБП и ХБП логически обоснованным является применение прежде всего антибактериальных средств [17].

Возникновение ХАП и ХНП, как правило, не связано с наличием инфекции. Несмотря на предпринимаемые усилия по поиску средств их фармакотерапии, частота встречаемости этих заболеваний с течением времени не снижается и даже имеет тенденцию к увеличению. Основными клиническими симптомами ХАП и ХНП являются болевые, дизурические, эректильные, а также психо-эмоциональные нарушения. Эти заболевания существенно снижают качество жизни пациентов и могут быть причиной бесплодия. Стандартной схемы лечения ХАП и ХНП в настоящее время не существует. Это обусловлено прежде всего отсутствием единой концепции их этиологии и патогенеза. В терапии пациентов с хроническим простатитом, не связанным с наличием инфекционного процесса, используются ЛС, воздействующие на отдельные звенья патогенеза (нестероидные противовоспалительные средства, миорелаксанты, спазмолитики, альфа-1-адреноблокаторы, антихолинэргические средства, ингибиторы 5-альфа-редуктазы и др.). Основываясь на возможности наличия невыявленной инфекции, рекомендуется прием антибактериальных препаратов [29]. Однако используемые методы фармакотерапии недостаточно эффективны, и после лечения, как правило, наступает рецидив заболевания. Лечение ХАП и ХНП является одной из самых сложных проблем в урологии. Отсутствие достаточно обоснованных подходов к лечению хронических простатитов, не связанных с наличием инфекционного процесса, способствует коммерциализации медицинской помощи этой категории пациентов. Агрессивная ре-

клама приводит к использованию различных средств их фармакотерапии, многие из которых в лучшем случае бесполезны.

Простатотропные средства могут быть эффективны не только при терапии ХАП и ХНП, но и при доброкачественной гиперплазии предстательной железы (ДГПЖ), которая также принадлежит к числу наиболее распространенных урологических заболеваний [21]. У мужчин старше 60 лет она отмечается в 80% случаев. По данным ООН количество мужчин данной возрастной категории к концу 20 века возросло более чем в 3 раза. Следует отметить, что ДГПЖ может проявляться уже в возрасте 40–50 лет. Основным клиническим симптомом ДГПЖ является нарушение мочеиспускания, вызванное увеличением размеров простаты. Последнее является результатом нарушений гормонозависимого взаимодействия между эпителием и стромой простаты. Следует отметить, что различные варианты воспалительной реакции являются постоянными компонентами стромальных изменений при ДГПЖ [28]. В связи с этим это заболевание называют гормон-индуцированным воспалением простаты.

В последние годы отмечается устойчивая тенденция к снижению количества больных, требующих оперативных вмешательств по поводу ДГПЖ. Этому способствует внедрение медикаментозных и малоинвазивных методов лечения. Фармакотерапия ДГПЖ является одной из динамично развивающихся областей урологии [15]. Среди лекарственных методов лечения широкое распространение получили альфа-1 адреноблокаторы, ингибиторы 5-альфа-редуктазы [10, 30]. Клиническая эффективность этих препаратов высокая, однако ряд побочных эффектов (гипотензия, головокружение, эректильная дисфункция и др.) настоятельно диктуют необходимость поиска новых препаратов для лечения ДГПЖ.

Таким образом, объективна необходимость поиска средств терапии ХАП, ХНП, ДГПЖ, что позволяет считать актуальной разработку унифицированных методов доклинического исследования простатотропных препаратов для лечения пациентов с обозначенными нозологиями [7, 29]. Решению этой задачи и посвящены представленные методические рекомендации.

1. Общие положения

Создание экспериментальных моделей заболеваний предстательной железы необходимо не только для поиска новых средств терапии, но и для изучения этиологии и механизмов их возникновения [41]. Работая в этом направлении, ряд исследователей выявили случаи спонтанного возникновения простатитов у экспериментальных животных. К сожалению, большинство из разработанных моделей воспроизводят бактериальные формы простатитов. Удельный вес числа моделей, воспроизводящих абактериальные формы простатитов и ДГПЖ, относительно небольшой. Кроме того, способы моделирования хронических абактериальных простатитов и ДГПЖ должны опираться на существующие данные об этиологии и механизмах возникновения заболеваний.

Однако на сегодняшний день не существует единой концепции причин и механизмов возникновения ХАП. Основные его причины видятся в нарушении кровообращения тканей железы, изменении обменных процессов организменного плана, диетических опрехах, вредных привычках, малоподвижном образе жизни, стрессах, переохлаждении и т.д. [23, 29]. В патогенезе ХАП немаловажную роль отводят врожденным особенностям кровоснабжения предстательной железы (недостаточность артериального кровоснабжения, обилие анастомозов между венами предстательной железы и венозной системой таза) [27]. Ряд этиологических факторов, таких как нарушения функции симпатической нервной системы, обмена веществ, гиперактивность альфа-1-адренорецепторов, нейроэндокринный дисбаланс, включают в ряд звеньев патогенеза ХАП [29, 11]. Имеет право на жизнь и нейромышечная теория патогенеза этого заболевания. В последние годы большое внимание уделяется нарушениям антиоксидантной защиты (за счет изменений

микроэлементного баланса) и микроциркуляции в тканях железы. С учетом того, что развитие ХАП приводит к нарушениям структурно-функционального состояния органов репродуктивной системы, к числу его осложнений относят снижение либидо, эректильную дисфункцию, бесплодие [2, 22]. Отмеченные последствия не только снижают качество жизни молодого трудоспособного населения, но и оказывают негативное влияние на демографические показатели.

Неясность этиологии и патогенеза характерна и для ХНП. Данное заболевание сходно с хроническим абактериальным простатитом, но признаки воспаления отсутствуют. Существует несколько теорий механизмов его развития [32]. Считают, что ХНП является результатом интрапростатического мочевого рефлекса, продолжительного напряжения мышц тазового дна, аутоиммунного воспаления, стрессового воздействия, следствием активации симпатического звена вегетативной тазовой иннервации. В патогенезе невоспалительных простатитов, по данным Лорана О.Б., значимую роль играют конгестивные процессы в венах малого таза [18]. Лечение ХНП является сложной проблемой. Даже 50% снижение интенсивности симптомов считается хорошим результатом предпринятого лечения, а полное излечение, по мнению ряда авторов, нереально [12].

В патогенезе ДГПЖ ведущая роль отводится гормональному дисбалансу. Ее возникновение является следствием нарушения механизмов регуляции системы гипоталамус — гипофиз — гонады — предстательная железа. Под влиянием эндокринных сдвигов в предстательной железе у мужчин позднего репродуктивного возраста могут возникать изменения, при которых тормозится развитие возрастного атрофического процесса. При этом наблюдается развитие доброкачественной гиперплазии, проявляющейся в виде узловой или диффузной пролиферации эпителия протоков и эпителиальной ткани желез [24]. В патогенезе ДГПЖ важную роль играют эстрогены, повышение содержания дигидротестостерона, сопровождающееся возрастанием внутриклеточной активности 5-альфа-редуктазы. Известно, что одним из факторов, способствующих развитию ДГПЖ, является возрастание уровня пролактина, который обладает способностью усиливать чувствительность предстательной железы к действию андрогенов [25, 33]. Сравнительно недавно в экспериментальных исследованиях было показано, что одной из причин развития этой нозологии может быть нарушение прооксидантно-антиоксидантного баланса в предстательной железе [3].

Методические рекомендации по поиску простатотропных средств должны принимать во внимание существующие данные по этиологии и патогенезу перечисленных патологических процессов. В литературе описан ряд моделей экспериментальных абактериальных простатитов, опирающихся на некоторые теории его патогенеза (нейрогенный простатит, аутоиммунный простатит и др.) [31, 39, 41]. Тем не менее, принимая во внимание отсутствие единой концепции патогенеза ХАП, для изучения эффектов простатотропных средств и даже изучения патогенеза рекомендуется использовать модели, воспроизводящие в ткани предстательной железы экспериментальных животных признаки абактериального воспаления.

1.1. Понятия и термины

Простатотропное средство — вещество, обладающее благоприятным тканеспецифическим действием на предстательную железу.

Хронический абактериальный простатит — воспалительное заболевание неинфекционного генеза, характеризующееся поражением как паренхиматозной, так и интерстициальной ткани предстательной железы.

Хронический невоспалительный простатит — невоспалительное заболевание с клиническими признаками хронического простатита, возникающее в результате сосудистых расстройств в области малого таза, оперативных вмешательств на органах малого таза, травм, неврологических патологий и др.

Доброкачественная гиперплазия предстательной железы — доброкачественная опухоль, возникающая в результате разрастания клеток железистой ткани вследствие гор-

мональной дисфункции. Финальной стадией гистогенеза ДГПЖ является развитие клинических симптомов (синдрома нижних мочевых путей) как результат увеличения предстательной железы.

1.2. Цели и задачи исследования. Основные этапы исследования

Целью данного исследования является оценка способности веществ предотвращать или снижать выраженность развития ХАП, ХНП, ДГПЖ.

Задачи исследования:

1. Оценить фармакологические эффекты препарата на экспериментальных моделях острого и хронического асептического воспаления предстательной железы крыс.

2. Оценить фармакологические эффекты препарата при экспериментальном хроническом невоспалительном простатите.

3. Оценить фармакологические эффекты препарата при экспериментальной доброкачественной гиперплазии предстательной железы.

Основные этапы исследования.

1 этап. Первичный отбор простатотропных средств рекомендуется проводить на моделях острого абактериального простатита, вызванного различными вариантами повреждений ткани железы. При этом в тканях должны выявляться основные признаки асептического воспаления: отек, гиперемия, лимфо-макрофагальная инфильтрация, дистрофические изменения и гибель клеток. Важная информация о влиянии нового лекарственного вещества на андрогенный эффект тестостерона пропионата может быть получена на этапе скрининга на модели гонадэктомированных инфантильных крыс-самцов [13].

2 этап. В дальнейшем рекомендуется проведение экспериментальных исследований, доказывающих эффективность использования препарата на моделях хронического асептического простатита, хронического невоспалительного простатита, доброкачественной гиперплазии предстательной железы. Экспериментальный хронический абактериальный простатит может быть получен путем использования различного рода повреждения ткани. Эти модели должны воспроизводить морфологические признаки ХАП: гемодинамические нарушения, атрофию, склероз, лимфо-макрофагальный инфильтрат. При моделировании экспериментального хронического невоспалительного простатита должны воспроизводиться в железе морфологические признаки этого заболевания — атрофия, склероз, гемодинамические нарушения. Учитывая то, что в патогенезе ХНП значимую роль играют конгестивные процессы в венах малого таза, данные морфологические изменения могут быть воспроизведены путем создания хронической венозной недостаточности в этом регионе. При экспериментальном моделировании ДГПЖ должны быть воспроизведены ее морфологические признаки — разрастание железистой ткани предстательной железы.

3 этап. Для более углубленного исследования эффективности применения потенциального простатотропного средства возможно использование различных моделей патологических состояний, позволяющих оценить не только его действие на предстательную железу, но и на диурез, его анальгезирующие, противомикробные свойства и т.п. Описание этих методик можно найти в соответствующих разделах «Руководства по проведению доклинических исследований ЛС». В дальнейших исследованиях специфичность простатотропного действия препаратов можно изучить на других моделях, соответствующих различным теориям возникновения ХАП, ХНП и ДГПЖ, в частности, моделях аутоиммунного простатита [41]. Учитывая то, что к числу патогенетических механизмов простатитов относят нарушение функции симпатической нервной системы, возможно изучение простатотропных свойств на моделях удаления симпатических нервных стволов от уровня почечных сосудов до крестцового отдела [31]. В дальнейшем возможно проведение исследований по изучению путей реализации выявленных эффектов: определение цитокинов, характеризующих противовоспалительное действие препаратов, указывающих на возможность аутоиммунного воспаления, показателей свободно радикальной активности [3, 35, 41] и т.п.

Учитывая то, что осложнениями простатитов является эректильная дисфункция, бесплодие, в дальнейших исследованиях для получения дополнительных доказательств эффективности нового ЛС возможно экспериментальное изучение состояния копулятивной функции у животных с хроническим простатитом и показателей спермограммы. Целесообразность проведения данных дополнительных исследований обусловлена тем, что успешное лечение простатита — единственный путь к восстановлению утраченной эректильной функции и фертильности [2].

1.3. Рекомендуемые тесты и биологические модели исследования простатотропной активности лекарственных средств

Острое асептическое воспаление может быть воспроизведено следующими способами:

- ректальным введением смеси скипидара и димексида [7];
- трансуретальной инстилляцией раствора динитробензолсульфоновой кислоты в 50% растворе этанола [38];
- прошиванием железы экспериментальных животных (крыс, кроликов) шелковой нитью [1, 4, 5]. Этот способ нетоксичен для других органов, морфологические признаки острого асептического воспаления простаты воспроизводятся в 100% случаев. Кроме того, на этой модели описано угнетение функциональной активности железы. Ниже приводится ее подробное описание.

Влияние нового лекарственного вещества на андрогенный эффект тестостерона пропionato может быть изучено на модели гонадэктомированных инфантильных крыс-самцов.

Признаки хронического абактериального простатита у крыс в предстательной железе могут быть получены путем использования различного рода повреждения ткани:

- ректальным введением 1 мл смеси, содержащей 90% раствор скипидара и 10% раствор диметилсульфоксида (в качестве пенетранта, под внутримышечным наркозом) [19];
- путем аппликации метаксидола на заднюю поверхность предстательной железы половозрелых животных (крыс, кроликов). Модель соответствует представлениям о ведущей роли гемодинамических нарушений в патогенезе простатита. Воспроизводится тромбоз вен и лимфоидная инфильтрация [9];
- прошиванием железы экспериментальных животных (крыс, кроликов) шелковой нитью [1, 4, 5, 8]. Данный способ нетоксичен для других органов, морфологические признаки хронического асептического воспаления простаты воспроизводятся в 100% случаев. Достоинством модели является то, что выявляются не только морфологические признаки ХАП, но и угнетение функциональной активности железы. Ниже приводится ее подробное описание.

Для поиска средств лечения ХНП должна быть использована экспериментальная модель, воспроизводящая в железе морфологические признаки этого заболевания — атрофию, склероз, гемодинамические нарушения. Учитывая то, что в патогенезе ХНП значимую роль играют конгестивные процессы в венах малого таза, данные морфологические изменения воспроизводятся путем создания хронической венозной недостаточности в этом регионе. Венозная недостаточность в венах малого таза и признаки ХНП может быть воспроизведена путем лигирования нижней полой вены (ниже представлено описание этой модели). Возможно также лигирование внутренних подвздошных вен [14], но данный способ является технически более сложным.

Морфологические признаки гормонзависимого воспаления простаты (ДГПЖ) могут быть вызваны у экспериментальных животных следующими способами:

- путем введения кастрированным крысам экстрадиола-17 и тестостерона в течение 1–3 недель после кастрации [40];
- путем введения сульпирида, вызывающего гиперпролактинемия [28, 33].

Последняя модель менее трудоемка, легко воспроизводится в 100% случаев. По мнению Fabien Van Coppenolle et al. (2001) эта модель является наиболее адекватной для чело-

веческого организма. Она основана на том, что возрастание уровня пролактина усиливает чувствительность предстательной железы к действию андрогенов, что является одной из причин возникновения ДГПЖ. В течение 2-х месяцев после начала введения сульпирида в ацинусах предстательной железы крыс наблюдаются папиллярные разрастания эпителия. Количественно определяется увеличение площади железистого эпителия, уменьшение просвета концевых отделов, воспалительная инфильтрация стромы. Ниже приводится описание модели. В рекомендуемой модели экспериментальной ДГПЖ воспроизводятся морфологические признаки аденоматозной формы гиперплазии.

1.4. Условия проведения исследования

Исследования рекомендуется проводить на крысах [31]. Морфологические изменения в железе оцениваются количественно. Полученные данные обрабатываются с помощью современных статистических методов исследования. Материал представляется в виде таблиц и рисунков.

Исследование простатотропного действия должно быть обязательно проведено в сравнении с наиболее известным эталонным препаратом, выбранным в зависимости от происхождения, химического строения и предполагаемого механизма действия. Новое средство по сравнению с имеющимися должно обладать большей избирательностью действия на ткань простаты, иметь меньше побочных эффектов.

Результаты экспериментального изучения нового препарата с простатотропными свойствами должны содержать материалы, доказывающие наличие у него положительного влияния не только на морфологическое, но и функциональное состояние предстательной железы экспериментальных животных при отмеченных выше нозологических формах.

К исследованию принимаются субстанции и/или лекарственные формы и/или смесь веществ со следующими характеристиками:

- физико-химические свойства;
- методы получения;
- условия растворимости (водорастворимые, жирорастворимые);
- подлинность;
- рекомендуемый способ введения.

Если по условиям эксперимента фармакологическое вещество исследуют в виде раствора, необходимо иметь данные о стабильности используемого раствора и условиях его хранения.

1.5. Оборудование, инструменты и реактивы

Помещение для оперирования животных с бактерицидной лампой, термостат, весы лабораторные, микротом, предметные стекла, микроскоп прямого света, шелк хирургический, иглы хирургические, иглы инъекционные, ножницы, пинцеты, средство для наркоза, хлороформ, уксусная кислота, спирт, ксилол, гомогенизированная парафиновая среда для гистологической заливки, гематоксилин, эозин натрия, также другие приборы и реактивы, определяемые задачами конкретного исследования.

1.6. Растворители и разбавители

Определяются известными к началу эксперимента характеристиками вещества. Данные средства служат контрольными веществами при проведении экспериментов.

1.7. Дозы, пути и режимы введения и продолжительность исследования

Определяются индивидуально в зависимости от известных к началу эксперимента свойств вещества и метода исследования. Путь введения должен соответствовать предполагаемому клиническому способу применения.

1.8. Экспериментальные животные

Исследования проводят на неполовозрелых, половозрелых крысах-самцах популяции Wistar. Животные должны пройти карантин не менее 10–14 дней. Число животных в каждой группе должно быть достаточным (не менее 10), чтобы оценить морфологические и функциональные показатели состояния предстательной железы крыс. Содержание крыс осуществляется в соответствии с правилами, принятыми Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей (Страсбург, 1986).

1.9. Рекомендации по выбору препарата сравнения

Выбор препарата сравнения определяется известными к началу эксперимента характеристиками вещества. Желательно, чтобы эталонный препарат был выбран в зависимости от происхождения, химического строения и предполагаемого механизма действия нового лекарственного вещества. Наиболее часто используют препараты Serenoa repens (пермиксон, простамол Уно), для препаратов пептидной природы — биорегуляторные пептиды (Витапрост).

2. Описание эксперимента и особенностей его проведения (отдельно для каждой модели / метода в соответствии с этапами исследования)

2.1. Модель острого асептического воспаления предстательной железы крыс

Цель: изучение эффективности простатотропного средства при экспериментальном остром асептическом воспалении предстательной железы.

Задачи исследования: относительно быстро и наиболее достоверно провести первичный отбор веществ с выявлением потенциальных простатотропных средств.

Прогностическое значение полученных экспериментальных данных: при выявлении противовоспалительного действия препарата на данной модели можно предположить его эффективность на моделях ХАП и ХНП.

Продолжительность эксперимента от начала введения препарата до забора материала на гистологию — 10 дней.

Эксперименты проводятся на крысах линии Wistar (возможно использование беспородных крыс) репродуктивного возраста (2–4 мес). Крысы всех исследуемых групп после прохождения карантина (в течение 14 дней) разбиваются на равнозначные по массе тела группы. Количество животных в группе — не менее 10. Острое асептическое воспаление предстательной железы у крыс вызывается путем прошивания ее правой передней доли шелковой нитью. Операция производится под наркозом. Исследуемый препарат вводится животным в 2–3-х дозах в течение 3-х дней до операции и 7 дней после операции (возможна другая схема введения). Контрольные крысы получают растворитель в эквивалентном основному препарату объеме и в те же сроки. В исследование должна быть включена группа животных, получающих известный эталонный простатотропный препарат. Признаки острого воспаления проявляются в течение 7 дней после операции в виде отека, гиперемии, появления инфильтрата, гибели и слущивания эпителиальных клеток в просвете ацинусов. На 7-й день после операции всех исследуемых животных взвешивают, проводят эвтаназию, препарируют прошитую шелковой нитью правую часть передней доли предстательной железы. Определяют массу прошитой доли предстательной железы, вычисляют ее весовой коэффициент. Часть экспериментального материала (не менее чем от 5-ти животных из каждой группы) берется для гистологического исследования патологических изменений, развивающихся в предстательной железе при прошивании ее нитью и при введении ЛП и растворителя. У этих животных производится также определение объема железы. Животные должны быть распределены по следующим группам: 1) фон (интактные крысы); 2) операция + растворитель (контроль); 3) операция + препарат сравнения; 4. 5. 6) операция + исследуемые препараты в разных дозах.

Для проведения гистологических исследований прошитую часть железы фиксируют в жидкости Карнуа и заливают в парафин. Депарафинированные срезы толщиной 5 мкм окрашивают гематоксилином и эозином [20]. В оставшейся части экспериментального материала производится определение секреторной активности предстательной железы. Рекомендуется определение содержания цинка. Одним из возможных способов оценки является метод эмиссионного спектрального анализа [16]. Оценить функциональную активность предстательной железы возможно путем определения в ней содержания лимонной кислоты [36].

Противовоспалительное действие препарата должно быть оценено с помощью количественных показателей, характеризующих степень выраженности воспаления. При проведении морфологических исследований подсчитывается количество клеточных элементов в строме железы, измеряется площадь кровеносных сосудов на стандартной площади гистологического среза. На этих же срезах подсчитывается количество ацинусов со слущенным эпителием на 100 последовательно расположенных концевых отделов.

2.2. Модель гонадэктомии инфантильных крыс-самцов

Цель: изучение андрогенного действия препарата.

Задачи исследования: Определение андрогенной активности по увеличению предстательной железы и семенных пузырьков у кастрированных неполовозрелых крыс, получавших тестостерон-пропионат.

Прогностическое значение: Увеличение весовых коэффициентов предстательной железы, семенных пузырьков у неполовозрелых животных в условиях андрогенной недостаточности, стимулированной тестостероном пропионатом, может свидетельствовать о том, что препарат может быть стимулятором андрогенного действия.

Продолжительность эксперимента 8 дней. Андрогенная активность определяется в 3-х сериях повторностей (по 20 животных в каждой серии).

Эксперименты проводятся на крысах линии Wistar (возможно использование беспородных крыс) возраста 23–25 дней. Предварительно крысы проходят 14-дневный карантин. Затем они разбиваются на равнозначные по массе тела группы.

Препарат вводят в 2–3-х дозах в течение 7 дней, начиная со следующего дня после гонадэктомии на фоне введения тестостерона пропионата. Тестостерон пропионат вводят подкожно в дозе 0,5 мг/кг. Через 24 ч после последнего введения препарата проводят эвтаназию животных, препарируют вентральную долю предстательной железы, семенные пузырьки, определяют их массу, вычисляют весовые коэффициенты органов, как отношение их массы к массе тела крысы. При проведении эксперимента исследуются следующие группы животных: 1) интактные животные (контроль 1); 2) гонадэктомированные животные, получающие растворитель (контроль 2); 3) гонадэктомированные животные, получающие тестостерона пропионат и растворитель (контроль 3); 4, 5, 6) гонадэктомированные животные, которые получают на фоне введения тестостерона пропионата тестируемый препарат в разных дозах.

2.3. Модель хронического асептического простатита

Цель: изучение эффективности простатотропного средства при экспериментальном ХАП.

Задачи исследования: оценить влияние препарата на показатели, характеризующие клиническую морфологическую картину ХАП. Оценить эффективность препарата на функциональное состояние предстательной железы при экспериментальном ХАП.

Прогностическое значение полученных экспериментальных данных: при выявлении противовоспалительного действия препарата на данной модели можно предположить эффективность его использования у пациентов с ХАП.

Продолжительность эксперимента (до забора материала на гистологию) — 1 мес. и более (в зависимости от продолжительности введения препарата).

Эксперименты проводятся на крысах линии Wistar (возможно использование беспородных крыс) репродуктивного возраста (2–4 мес). Крысы всех исследуемых групп после прохождения карантина (в течение 14 дней) разбиваются на равнозначные по массе тела группы. Количество животных в группе – не менее 10. Всем из них, за исключением крыс фоновой группы, производится прошивание шелковой нитью передней доли предстательной железы. Операция проводится под наркозом. Через 1 месяц после операции крысам вводят растворитель, тестируемые препараты (в 2–3-х дозах) и препараты сравнения. Препараты вводятся ежедневно в течение 8–45 дней (возможна и другая схема введения). Исследуются следующие группы животных: 1) фон (интактные крысы); 2) операция + растворитель (контроль); 3) операция + препарат сравнения; 4, 5, 6) операция + исследуемый препарат в разных дозах. После окончания введения препаратов животных взвешивают, затем проводят эвтаназию и препарируют предстательную железу. Определяют ее массу, вычисляют весовой коэффициент.

Часть экспериментального материала берется для гистологического исследования (по 5–6 крыс из каждой группы). У этих животных определяют (до фиксации) объем прошитой доли железы. Прошитую долю железы фиксируют в жидкости Карнуа, заливают в парафин, готовят срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы окрашивают на соединительную ткань по Ван-Гизону [20]. На стандартной площади гистологического среза измеряют площадь эпителиальных структур, площадь просвета концевых отделов железы, площадь коллагеновых волокон в соединительнотканых прослойках. Затем вычисляют долю этих показателей от стандартной площади среза в %. Производится также подсчет количества клеток в строме.

В оставшейся части экспериментального материала производят определение секреторной активности предстательной железы. Рекомендуется определение содержания цинка. Одним из возможных способов оценки является метод эмиссионного спектрального анализа [16]. Оценка функциональной активности предстательной железы возможна путем определения в ней содержания лимонной кислоты [36].

2.4. Модель хронического невоспалительного простатита

Цель: изучение эффективности простатотропного средства на течение экспериментального ХНП.

Задачи исследования: оценить влияние препарата на морфологические показатели, характеризующие клиническую морфологическую картину ХНП.

Прогностическое значение полученных экспериментальных данных: при выявлении противовоспалительного действия препарата на данной модели можно предположить эффективность его использования у пациентов с ХНП.

Продолжительность эксперимента (до забора материала на гистологию) – 20 дней и более (в зависимости от продолжительности введения препарата).

Эксперименты проводятся на крысах линии Wistar репродуктивного возраста (2–4 мес.). Возможно использование и беспородных животных. Крысы всех исследуемых групп после прохождения карантина (в течение 14 дней) разбиваются на равнозначные по массе тела группы. Количество животных в группе – не менее 10. Всем из них, за исключением крыс фоновой группы, производят оперативное вмешательство, при котором проводят лигирование нижней полой вены ниже места впадения почечной вены. Операция проводится под наркозом. Через 1,5 мес. после прекращения кровотока в нижней полой вене в предстательной железе отмечается атрофия эпителия и склероз стромы, гемодинамические нарушения. Тестируемый препарат вводят через 20 дней после операции в течение 7–45 дней (возможна и другая схема введения). Исследуются следующие группы животных: 1) фон (интактные крысы); 2) операция + растворитель (контроль); 3) операция + исследуемый препарат (в дозе, наиболее эффективной на модели абактериального простатита); 4) операция + препарат сравнения. После окончания введения препаратов животных взвешивают, проводят эвтаназию и препариру-

ют переднюю долю предстательной железы, определяют ее массу, вычисляют весовой коэффициент.

Затем экспериментальный материал берется для гистологического исследования (не менее чем у 5-ти крыс). У этих животных определяют (до фиксации) объем передней доли железы. Переднюю долю железы фиксируют в жидкости Карнуа, заливают в парафин, готовят срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы окрашивают гематоксилином и эозином и на соединительную ткань по Ван-Гизону [20]. На стандартной площади гистологического среза измеряют площадь кровеносных сосудов, площадь коллагеновых волокон в соединительнотканых прослойках, площадь эпителиальных структур.

2.5. Модель доброкачественной гиперплазии предстательной железы

Цель: изучение эффективности простатотропного средства при экспериментальной ДГПЖ.

Задачи исследования: оценить влияние препарата на размеры простаты с ДГПЖ, определяющие ее клинические симптомы; на морфологическое состояние предстательной железы крыс с этой патологией.

Прогностическое значение полученных экспериментальных данных: судя по снижению размеров железы и по снижению площади эпителия ацинусов можно предположить эффективность препарата у пациентов с ДГПЖ.

Продолжительность эксперимента (до забора материала на гистологию) — 2 мес.

Доброкачественная гиперплазия простаты вызывается сульпиридом, на фоне хронического введения которого развивается гиперпролактинемия, приводящая к развитию аденоматозной формы гиперплазии. В течение 2-х месяцев после начала введения сульпирида в ацинусах предстательной железы крыс наблюдаются папиллярные разрастания эпителия. Количественно определяется увеличение площади железистого эпителия, уменьшение просвета концевых отделов ацинусов, воспалительная инфильтрация стромы.

Экспериментальное изучение эффективности тестируемого препарата при доброкачественной гиперплазии предстательной железы проводится на крысах-самцах зрелого репродуктивного возраста (10 мес.), что, очевидно, является наиболее адекватной моделью с точки зрения возможного ее клинического применения. Возможно использование крыс и молодого репродуктивного возраста. После прохождения карантина животные разбиваются на равнозначные по массе тела группы (не менее 10 крыс-самцов в каждой).

Доброкачественную гиперплазию в предстательной железе вызывают гиперпролактинемией, для получения которой крысам-самцам вводится ежедневно подкожно сульпирид.

Все исследуемые животные делятся на следующие группы:

- 1) фон (интактные животные);
- 2) контроль — сульпирид (ежедневно, внутривбрюшинно, в дозе 40 мг/кг) + растворитель в течение 60 дней (для крыс молодого возраста возможно менее длительное введение сульпирида);
- 3) сульпирид (ежедневно, внутривбрюшинно, в дозе 40 мг/кг) + испытуемый препарат в дозе, эффективной при хроническом абактериальном простатите в течение 60 дней;
- 4) сульпирид (ежедневно, внутривбрюшинно, в дозе 40 мг/кг) + эталонный препарат в течение 60 дней.

Через 2 мес. после начала эксперимента животных взвешивают, проводят эвтаназию. Затем препарируют боковую долю предстательной железы. Определяют ее массу, вычисляют весовой коэффициент. Фиксируют ее объем. Затем экспериментальный материал (не менее чем от 5-ти животных из каждой группы) берется для гистологического исследования. Боковую долю железы фиксируют в жидкости Карнуа, заливают в парафин, готовят срезы толщиной 5 мкм. Депарафинированные срезы окрашивают гематоксилином и эозином. На стандартной площади гистологического среза измеряют площадь эпителиальных структур и просвета концевых отделов железы. Затем вычисляют долю этих показателей от стандартной площади среза.

3. Рекомендации по объему и форме экспериментальных исследований и обработке экспериментальных данных

Обязательным является проведение в полном объеме первого и второго этапа исследования. Третий этап проводится на усмотрение разработчика. Статистическая обработка экспериментальных данных проводится стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрических и непараметрических критериев. В таблицах результаты представляются в виде среднего и ошибки среднего с указанием достоверности различий между сравниваемыми группами по изучаемым показателям.

По окончании экспериментов должен представляться отчет по исследованию.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

4. Интерпретация результатов

Уменьшение на фоне введения тестируемого препарата площади сосудов; количества клеток, инфильтрирующих строму; уменьшение количества ацинусов со слущенным эпителием; снижение весового коэффициента предстательной железы; увеличение содержания в ней цинка при экспериментальном остром асептическом воспалении предстательной железы будут свидетельствовать о противовоспалительном действии препарата по отношению к ткани предстательной железы.

Увеличение весовых коэффициентов предстательной железы, семенных пузырьков у неполовозрелых животных в условиях андрогенной недостаточности, стимулированной тестостероном пропионатом, свидетельствует о том, что тестируемое простатотропное средство усиливает его андрогенное действие. Поскольку клинический успех лечения ДГПЖ ассоциируется с угнетением андрогенезации [23], то в случае выраженной стимуляции андрогенного действия препаратом последний может быть неэффективен при данной патологии.

Уменьшение на фоне введения препарата площади коллагеновых волокон, увеличение площади эпителия ацинусов, увеличение просвета ацинусов, снижение количества клеток инфильтрирующих строму; увеличение количества цинка при экспериментальном хроническом асептическом воспалении предстательной железы может свидетельствовать о противоспалительных свойствах препарата и его способности задерживать развитие склеротических и атрофических процессов в ткани предстательной железы.

Уменьшение на фоне введения препарата площади кровеносных сосудов, площади коллагеновых волокон, увеличение площади эпителия ацинусов, при экспериментальном хроническом невоспалительном простатите предстательной железы может свидетельствовать о способности препарата задерживать развитие последствий хронической венозной недостаточности в ткани предстательной железы.

Уменьшение весового коэффициента железы, ее объема, снижение площади эпителия ацинусов свидетельствует об эффективности использования препарата при экспериментальной ДГПЖ.

Заключение

В заключении резюмируются полученные данные при исследовании простатотропного действия нового препарата, представляются сведения о преимуществах нового препарата перед известными средствами сходной направленности действия.

Средствами, обладающими простатотропными свойствами, следует считать вещества, обладающие способностью нормализовать морфологическое и функциональное состояние предстательной железы крыс на моделях синдрома хронической тазовой боли и/или модели ДГПЖ.

Литература

1. Алешин Б.В., Бондаренко Л.А., Бреславский А.С., Вартапетов Б.А., Гладкова А.И. Функциональные и структурные изменения коры надпочечников у кроликов в условиях хронического воспаления предстательной железы // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 1977. — №3. — С. 276–277.
2. Аляев Ю.Г., Винаров А.З., Ахвледиани Н.Д. Хронический простатит и копулятивные нарушения // Врачебное сословие. — 2004. — № 5–6. — С. 6–9.
3. Белостоцкая Л.И., Гомон О.Н., Никитченко Ю.В. и др. Проксидантно-антиоксидантный баланс в предстательной железе и крови крыс при индуцированной сульпиридом гиперплазии простаты и коррекция простатиленом // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2005. — Т. 139. — №3. — С. 313–315.
4. Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Лоскутова О.П. и др. Антитела к простатическому специфическому антигену в сверхмалых дозах: влияние на морфологическое и функциональное состояние предстательной железы крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2002. — Прил. 4. — С. 104–106.
5. Боровская Т.Г., Фомина Т.И., Лоскутова О.П. и др. Влияние сверхмалых доз антител к простатоспецифическому антигену на предстательную железу крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2001. — Прил. 3. — С. 49–51.
6. Буренин И.С., Матвеев Б.П., Киселев В.И. и др. Экспериментальное изучение противоопухолевой активности препаратов на модели рака предстательной железы // Урология и нефрология. — 1995. — №5. — С. 33–35.
7. Бурякина А.В., Фролова Н.Ю., Авенирова Е.Л. и др. К вопросу о доклинической оценке простатотропных средств // Материалы III съезда фармакологов. Психофармакол. биол. наркол. — 2007. — Спец. вып. (сентябрь). — Ч. 2. — С. 1626.
8. Вартапетов Б.А., Николайчук С.П., Шаратник Р.М. Гонадотропные гормоны, предстательная железа и экспериментальная модель ее недостаточной деятельности // Проблемы эндокринологии. — 1970. — № 6. — С. 81–75.
9. Горбачев А.Г., Агулянский Л.И. Хронический простатит. — Л.: Медицина, 1986. — С. 40–41.
10. Гудков А.В. Опыт длительного применения афалы при доброкачественной гиперплазии предстательной железы // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2009. — №8. — С. 57–60.
11. Гуськов А.Р. Центр «Санос»: Наша концепция хронического простатита // Врачебное сословие. — 2004. — № 5–6. — С. 46–51.
12. Извозчиков С.Б., Болотов А.В., Шарвадзе Г.Г. и др. Невоспалительный синдром хронической тазовой боли у мужчин (история вопроса) // Урология. — 2007. — №3. — С. 111–114.
13. Кабак Я.М. Практикум по эндокринологии. 2-е изд., доп. — М., 1968. — 276 с.
14. Казаков О.В., Тихонов И.В., Асташев В.В. Изменение перфузии ткани при экспериментальном венозном застое в малом тазу // Материалы VI Международной конференции «Гемореология и микроциркуляция». — Ярославль, 2007. — С. 89.
15. Камалов А.А., Ефремов Е.А., Дорофеев С.Д. и др. Витапрост Форте в лечении больных с аденомой предстательной железы // Урология. — 2007. — №3. — С. 39–47.
16. Кашкан Г.В. Атомно-эмиссионное определение микроэлементов в биологических жидкостях и тканях // Тезисы докладов 1-й областной научной конференции «Основные разработки медицинской техники учреждениями и предприятиями г. Томска». — Томск, 1988. — С. 8–9.
17. Лопаткин Н.А., Камалов А.А., Мазо Е.Б. и др. Витапрост плюс в лечении хронического бактериального простатита // Урология. — 2009. — №3. — С. 54–61.
18. Лоран О.Б., Лукьянов И.В., Марков И.В. Актуальные проблемы лечения простатита // Качество жизни. — Медицина, 2005. — №2. — С. 18–22.
19. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Тесакова С.В. и др. Применение препарата природного происхождения при лечении экспериментального хронического простатита // Материалы III съезда фармакологов. Психофармакол. биол. наркол. — 2007. спец. вып. (сентябрь). — Ч. 2. — С. 1844.
20. Меркулов Г.А. Курс патогистологической техники. — Медицина, Ленинградское отд., 1969. — 405 с.
21. Неймарк А.И., Алиев Р.Т., Ноздрачев Н.А. и др. Нарушения сперматогенеза и их коррекция у больных хроническим абактериальным простатитом // Урология. — 2008. — №1. — С. 44–50.
22. Неймарк А.И., Исаенко В.И., Яковец Я.В. и др. Применение препарата афалы в урологической практике // Урология. — 2009. — №3. — С. 67–70.
23. Павлов В.Н., Сафиуллин Р.И., Козихинуров А.А. и др. Механизмы патогенеза и резорбции коллагена при хроническом простатите с исходом в склероз органа // Врачебное сословие. — 2004. — № 5–6. — С. 22–26.

24. Патологоанатомическая диагностика опухолей человека. Руководство для врачей. — М.: Медицина, 1993 / Под ред. Краевского Н.А., Смольянинова А.В., Саркисова Д.С. — С. 381–386.
25. Портной А.С., Гродзовская Ф.Л. Рак и аденома предстательной железы. — Л.: Медицина, 1984. — С. 12–20.
26. Пушкарь Д.Ю., Сегал А. Хронический абактериальный простатит: современное понимание проблемы // Врачебное сословие. — 2004. — № 5–6. — С. 9–12.
27. Пушкарь Д.Ю., Сегал А.С. Неблагоприятные тенденции современного подхода к проблеме хронического простатита // Врачебное сословие. — 2004. — № 5–6. — С. 31–32.
28. Савельева К.В., Боровская Т.Г., Хейфец И.А. и др. Сравнительная оценка фармакологической активности афалы на модели гормониндуцированного воспаления простаты у крыс // Бюлл. эксперим. биол. и мед. — 2007. — Т. 144. — № 11. — С. 542–544.
29. Смирнов В.А. Лекарственная терапия хронического простатита // Фарминдекс практик. — 2006. — № 10. — С. 46–55.
30. Трапезникова М.Ф., Поздняков К.В., Голубев Г.В. и др. Современные тенденции в медикаментозном лечении аденомы предстательной железы: роль нового α -адреноблокатора камирена ХЛ в решении проблемы // Урология. — 2009. — № 1. — С. 35–40.
31. Хейфец В.Х., Забежинский М.А., Хролович А.Б., Хавинсон В.Х. Экспериментальные модели хронического простатита // Урология. — 1999. — № 5. — С. 48–52.
32. Эрлих Н., Мюллерад М., Хазанов В. Воспаление предстательной железы и хронические тазовые боли: диагностика и лечение // Урология. — 2009. — № 1. — С. 81–84.
33. Fabien Van Coppenolle, Christian Slomianny, Françoise Carpentier et al. Effects of hyperprolactinemia on rat prostate growth: evidence of androgen dependence // *Physiol Endocrinol Metab.* — 2001. — P. 120–129.
34. Lang M.D., Nickel J.C., Olson M.E., Howard S.R., Ceri H. Rat model of experimentally induced abacterial prostatitis // *The Prostate.* — 2000. — Vol. 45. № 3. — P. 201–206.
35. Jang T.L., Schaeffer A.J. The role of cytokines in prostatitis // *World Journal of Urology.* — 2003. — Vol. 21. — P. 95–99.
36. Kraus P. A simple modified micromethod for the determination of citrate // *Clinica chimica acta.* — 1965. — Vol. 12. — № 4. — P. 462–465.
37. Krieger J.N., Nyberg L.Jr., Nickel J.C. NIH consensus definition and classification of prostatitis. // *J.A.M.A.* — 1999. — Vol. 282, № 3. — P. 236–237.
38. Lang M.D., Nickel J.C., Olson M.E., Howard S.R., Ceri H. Rat model of experimentally induced abacterial prostatitis // *The Prostate.* — 2000. — Vol. 45. — № 3. — P. 201–206.
39. Pacheco-Rupil B., Depiante-Depaoli M., Yantorno C. Experimental autoimmune damage of prostate at male rat // *Immunol.* — 1981. — Vol. 1. — P. 255–261.
40. Paubert-Braquet M., Richardson FO, Servent — Saez № et al. Effect of *Serenoa repens* extract (Permixon) on estradiol/testosterone — induced experimental prostate enlargement in the rat // *Pharmacol. Res.* — 1996. — Vol. 34. — № 3–4. — P. 171–179.
41. Vykhovanets E.V., Resnick M.I., MacLennan G.T., Gupta S. Experimental rodent models of prostatitis: limitations and potential // *Prostate Cancer Prostatic Dis.* — 2007. — Vol. 10. — P. 15–29.

ГЛАВА 47

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ДЕРМАТОТРОПНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: к. б. н. А.В. Бурякина; к. б. н. Н.Ю. Фролова; к. б. н. Т.И. Мельникова;
к. м. н. Е.К. Вишневская; к. б. н. Е.Л. Авенирова; к. б. н. К.В. Сивак, к. б. н. А.В. Караваева;
к. м. н. А.И. Зебрев; М.Н. Моисеева*

Введение

Группа дерматотропных препаратов очень разнородна. Сюда относят средства для местного применения в различных лекарственных формах: 1) защищающие кожу от микробных и паразитарных поражений (антисептики, антибиотики, противовирусные, противопедикулезные, противоклещевые препараты); 2) стимулирующие процессы очищения ран, регенерации и эпителизации кожи, размягчения и рассасывания рубцовой ткани при лечении ран, ожогов, обморожений, пролежней, трофических язв (ферментные препараты, регуляторы метаболических процессов, противовоспалительные средства); 3) нейтрализующие кожный зуд при аллергии, экземе, нейродермите (антигистаминные, местноанестезирующие, обволакивающие, вяжущие); 4) используемые для избавления от мозолей и бородавок (кератолитические, прижигающие); 5) антиперсперанты (уплотняющие эпидермис); 6) противопсориазные; 7) местнораздражающие. Несмотря на такое разнообразие фармакологических эффектов, все эти средства объединяет то, что их использование характеризуется двумя взаимосвязанными процессами: с одной стороны, они воздействуют непосредственно на пораженную кожу; с другой — через кожу на другие органы, ткани, системы организма.

Ряд средств для системного применения также оказывают существенное влияние на состояние кожного покрова и с этой точки зрения могут быть отнесены к дерматотропным препаратам.

Для проведения скрининга потенциальных дерматотропных средств и оценки их специфической активности на этапе доклинических исследований необходимо использовать адекватные экспериментальные модели. Соответствующих общепринятых рекомендаций в нормативной документации нет. Методические подходы к экспериментальному изучению потенциальных дерматотропных средств рассмотрены нами в статье, опубликованной в журнале «Экспериментальная и клиническая фармакология» [22].

1. Экспериментальное изучение. Общие подходы

1.1. Дизайн исследования планируется в зависимости от предполагаемой активности (ранозаживляющая, противоожоговая, противовоспалительная и т. д.) потенциального ЛС и этапа разработки (скрининг, углубленное исследование). Независимо от этапа разработки выраженность специфического действия нового вещества сравнивают с соответствующими показателями в группах позитивного и негативного контроля, а также в группе животных, получавших референтный препарат в эффективной дозе. Выбранные для оценки состояния животных показатели определяют исходно (до начала исследования), несколько раз на протяжении исследования и через определенное время после его

окончания. Все исследования должны проводиться в соответствии с утвержденными в лаборатории стандартными процедурами.

1.2. Лабораторные животные, формирование групп

Для моделирования заболеваний кожи используют белых беспородных крыс-самцов, мышей-самцов, морских свинок, кроликов, кошек, в ряде случаев — линейных животных. Перед началом эксперимента животных выдерживают на карантине в течение 10–14 дней, по истечении этого срока их осматривают, взвешивают и выбраковывают некондиционных. В каждую группу целесообразно включать не менее 10–15 особей, что позволяет выполнить адекватную статистическую обработку полученных результатов. Уменьшить общее количество включенных в эксперимент особей можно за счет использования крупных животных (кролики, кошки), на каждом из которых можно испытывать разные препараты на разных участках кожи [7]. Рандомизацию животных по группам проводят одним из общепринятых в биологической статистике методов. Животных индивидуально метят по принятой в лаборатории системе. Все болезненные процедуры и операции проводятся под наркозом (как правило, эфирным).

1.3. Пути введения фармакологических веществ

Общепринятым и наиболее целесообразным является накожное нанесение дерматотропных препаратов. В зависимости от характера патологии используются разные лекарственные формы для местного применения: растворы, мази, кремы, гели, пластыри, пленки, губки, присыпки, бальзамы и др., которые и апробируются в экспериментальных условиях. Иногда изучаются дерматотропные эффекты системных средств — в таких случаях их вводят перорально, внутривенно, внутримышечно, подкожно и т.п.

1.4. Выбор доз

Выбор эффективной дозы осуществляется на этапе скрининга. При выполнении углубленных фармакологических исследований вещество необходимо исследовать в 2–3 дозах, входящих в терапевтический диапазон. В зависимости от лекарственной формы препараты для местного применения дозируют, используя различные устройства и приспособления: жидкие формы — при помощи мерных пипеток, мягкие — дозировочных ложечек, пластыри и пленки — по площади. LD_{50} следует рассчитывать на самых первых этапах разработки, чтобы оценить токсический потенциал нового средства и соотношение эффективных и токсических доз.

1.5. Референтные препараты

Препарат сравнения выбирают, исходя из предполагаемого спектра фармакологической активности и природы исследуемого вещества, лекарственной формы потенциального препарата, а также возможного механизма его действия на поврежденную кожу с учетом адекватности используемой модели патологического состояния. Это могут быть дерматологические средства с преимущественно ранозаживляющим (например, Солкосерил, Актовегин), противовоспалительным (например, препараты диклофенака, индометацина), капилляропротекторным (например, препараты эсцина, рутозида, троксерутина), противоаллергическим действием (например, препараты диметиндена) и др. Возможно использование нескольких референс-препаратов, если исследуется широкий спектр фармакологических свойств нового ЛС. Обязательным условием должна быть регистрация референс-препарата в РФ.

1.6. Экспериментальные модели исследования дерматотропных лекарственных средств

Для оценки влияния препаратов на процесс заживления ран можно использовать легко воспроизводимые модели раневого повреждения кожи и подкожной жировой

клетчатки у мышей и крыс — модели полнослойных линейных и плоскостных кожных ран [21].

1.6.1. Модели линейных ран

Линейные раны у крыс представляют собой продольный разрез кожи и подкожной жировой клетчатки по средней линии спины длиной 5 см. После выполнения разреза края раны сближают, накладывая 3 шва на равном расстоянии друг от друга. Начиная со дня операции животным из групп, получающих лекарственные средства, на поверхность раны наносят исследуемые вещества и эталонные препараты, а в контроле 3/4 плацебо (или используют другие пути введения). На 8-е сутки животных подвергают эвтаназии, вырезают кусок раневой поверхности кожи высотой 2 см и шириной 3 см (по 1,5 см в обе стороны от рубца) и с помощью модифицированных аптечных весов определяют прочность рубца на разрыв, подвешивая груз увеличивающейся массы к лоскуту кожи. Данные тензиометрических измерений для животных из разных групп усредняют, получившиеся средние величины сравнивают между собой. Средство можно считать перспективным для использования в качестве ранозаживляющего, если масса груза, необходимого для разрыва рубца, увеличивается по сравнению с контролем в 1,5–2 раза. Целесообразно также выполнять гистологический контроль, позволяющий оценить полноценность процесса заживления раны. Применение ранозаживляющих средств должно предотвращать грубую грануляцию дефекта, способствовать полной эпителизации раны. Глубина раны у леченых животных обычно на 1/3–1/2 меньше, чем в контроле.

1.6.2. Модели плоскостных ран

Для воспроизведения модели плоскостных кожных ран спины у крыс под эфирным наркозом выстригают шерсть и подшерсток в области середины спины и вырезают кожный лоскут площадью 400 мм² (удаляя также подкожную жировую клетчатку) по специальному трафарету. Дефекты кожи оставляют открытыми на протяжении всего периода наблюдений. О темпах заживления раневых повреждений у крыс из разных групп судят, периодически снимая выкройки ран на кальку, взвешивая их или оценивая периметр (измеряют курвиметром) либо площадь раны. На 2-е сутки после операции у нелеченых крыс поверхность дефектов кожи покрывается тонким струпом, образованным раневым отделяемым. При взятии животных в руки корочка легко повреждается, просачивается экссудат. Ярко выражены признаки воспаления: края раны отличаются сильной отечностью, наблюдаются гнойное воспаление на границе с омертвевшей тканью, расплавление некротических масс. В леченых группах признаки воспаления должны быть сглажены, особенно если испытуемое вещество обладает выраженным антиэкссудативным действием. У всех животных регистрируют время полного затягивания ран, которое без лечения обычно составляет 35–40 дней. Испытуемое средство можно считать перспективным для использования в качестве ранозаживляющего, если наблюдается более благоприятная динамика заживления и раны затягиваются в среднем на 5–7 дней раньше, чем в контроле. Важным условием успеха является правильный выбор схемы лечения, так как нет и не будет препарата, пригодного для лечения ран вне зависимости от фазы раневого процесса [5, 6]. Целесообразно также выполнять: гистологический/цитологический контроль; бактериологическое исследование раневого отделяемого; термометрию внутри и вокруг раны [7]. Можно использовать и другие модификации модели плоскостной полнослойной кожной раны, например, у мышей [8] кошек [7] или собак [3]. В ряде лабораторий разработаны специальные устройства для экспериментального моделирования кожных ран [7]. В зависимости от целей эксперимента можно использовать разные способы утяжеления течения раневого процесса, например регулярное (через сутки) снятие струпа с раны [8] или ее микробное обсеменение. Раны можно контаминировать, в частности, суточной культурой золотистого стафилококка (что особенно актуально, учитывая устойчивое преобладание стафилококков в составе микрофлоры разных ран

в клинических условиях — [6]) или 16–18-часовыми культурами анаэробов. Для экспериментального изучения возможностей лечения гнойных ран предложены также модели гнойно-воспалительных процессов у кроликов, вызванных *Staphylococcus aureus* 209P, *Clostridium perfringens* 27, *Bacteroides fragilis* и *Bacteroides melaninogenicus* [4].

1.6.3. Оценка противоожогового действия

Для оценки противоожогового действия потенциального ЛС можно использовать одну из моделей термического ожога кожи у крыс [11, 15].

1.6.3.1. Модели термического ожога кожи

Применяя контактный высокотемпературный способ (устройство на основе электропаяльника), можно варьировать степень повреждения кожи (при подборе условий нанесения ожога необходим гистологический контроль). Так, ожоги спины IIIA степени у крыс вызывает прикладывание на 10 с к предварительно депилированной коже разогретой до 200 °С медной пластины с силой 1,5 Н, а для получения ожогов IIIB степени температура пластины должна составлять 240 °С, экспозиция — 14 с, а сила, с которой пластину прижимают к коже — 1,6 Н [10]. Размер пластины может варьировать, оптимальный — (2,5×2,5) см². Об общем состоянии животных судят на основании поведенческих реакций, аппетита, массы тела, выживаемости. Наблюдение за процессом заживления ожоговых ран проводят ежедневно, а величину ожоговых дефектов измеряют несколько раз на протяжении исследования. Оценка результатов эксперимента проводится так же, как и в случае модели плоскостных кожных ран.

1.6.3.2. Модели химических ожогов

При разработке специализированных средств можно использовать модели химических ожогов. Повреждения, причиненные химическими агентами, отличаются от термических ожогов тем, что агрессивные химические вещества продолжают разрушать ткани до тех пор, пока не инактивируются, не нейтрализуются или не разбавятся. Таким образом, повреждающее действие химического ожога длится значительно дольше, чем термического. Для воспроизведения химических ожогов в экспериментальных условиях можно использовать разные вещества: сильные окислители (хромовая кислота, гипохлорид натрия, перманганат калия), коррозивы (фенол, белый фосфор, дихроматы, гидроксид натрия), обезвоживатели (щавелевая кислота), нарывные агенты (кантариды, диметилсульфоксид, горчичный газ, бензин, метилбромид), протоплазматические яды (аммиак, муравьиная, уксусная, крезоловая, трихлоруксусная кислоты). Глубокие ожоги вызывает, например, подкожная инъекция 9% водного раствора уксусной кислоты. Можно использовать также смеси химических соединений, в частности накожные аппликации фенола и крезола [14].

1.6.3.4. Модели обморожения

Для создания модели обморожения можно использовать жидкий азот: к задней конечности крысы с предварительно удаленным шерстным покровом площадью 1–2 см² на 3 мин прикладывают вату, смоченную в жидком азоте (по всей площади поражения сразу появляются множественные петехии). Криотравма может быть также создана распылением хлорэтила на предварительно депилированную заднюю лапу наркотизированной крысы под контролем температуры при помощи электротермометра с игольчатым датчиком [12].

Особое значение имеет разработка препаратов для лечения длительно не заживающих ран 3/4 трофических язв, пролежней. Такие средства должны обеспечивать очищение раны, стимуляцию образования грануляций, защиту их от высыхания и вторичного инфицирования, ускорение дифференцирования молодой соединительной ткани и продукцию эпителиальной ткани [2, 13].

1.6.4. Моделирование трофических язв

Простым способом моделирования трофических язвы у крыс является перерезка правого седалищного нерва, производимая под эфирным наркозом [18]. О ранозаживляющих свойствах исследуемого вещества судят по динамике размеров образующихся в результате перерезки нерва язв правой нижней конечности, а также по таким показателям, как температура тела, поведенческие реакции, двигательная активность животных. Так как нарушение трофики — один из факторов, способствующих и образованию пролежней, для изучения эффективности потенциальных противопролежневых средств мы предлагаем использовать модель пареза задних конечностей у крыс с последующим нанесением механической раны, ожога или обморожения. Для моделирования пареза животным под эфирным наркозом при помощи острых ножниц перерезают спинной мозг на уровне поясничного отдела (преходящий паралич задних конечностей) или середины грудного отдела позвоночника (необратимый паралич задних конечностей). Рану ушивают, обрабатывают йодом, а затем на одной из задних конечностей (внешняя сторона бедра) создают кожный дефект: плоскостную кожную рану, ожог либо обморожение, как было описано выше. Испытуемые средства и референтные препараты первый раз наносят через 2 ч после операции, а далее — ежедневно 1 раз в день. Курс лечения составляет не менее 7 дней. Об эффективности лечения судят по результатам гистологического контроля: сравнивают состояние тканей на правой и левой конечностях для каждого животного, а также проводят сравнительную оценку данных по группам. У большинства животных, оставленных без лечения, через неделю наблюдается типичная картина вторично инфицированной раны: повреждения эпителизованы лишь частично; новообразованный эпителий вторично инфильтрован лейкоцитами и разрушен, под ним видна грануляционная ткань, богатая клетками фибробластического ряда и воспалительного инфильтрата; особенно много лейкоцитов содержится под эпидермисом; образовавшиеся в процессе регенерации волокна частично расплавлены. Под действием противопролежневых средств наблюдается типичная картина эпителизованного рубца: полная эпителизация раневой поверхности, эпителий утолщен в 1,5–2 раза, имеет ровную базальную мембрану без сосочков, волосяные фолликулы и сальные железы отсутствуют, дерма замещена плотной соединительной тканью.

1.6.5. Оценка капилляропротекторного действия

Для оценки капилляропротекторного действия дерматотропных средств подходят модели повышенной сосудистой проницаемости кожи у мышей и крыс. Одной из них является модель ксилоловых петехий [1]. Для ее воспроизведения в предварительно выстриженную кожу спины у белых беспородных мышей (крыс) на участке размером (1,2×1,2) см² втирают ксилол в течение 30 с. В результате этого воздействия уже через 1,5 мин начинают появляться петехии, количество которых быстро увеличивается. Для оценки капилляропротекторных свойств потенциальных дерматопротекторов мы предлагаем измерять время появления трех первых петехий и количество петехий на площади 1 см² через 2 ч после втирания ксилола при помощи наложения прозрачной стандартной сетки-шаблона. Испытуемое вещество можно считать перспективным для дальнейшего изучения, если его применение на 40–50% задерживает время появления петехий и снижает их количество не менее чем на 25%. Об изменении сосудистой проницаемости под действием воспалительных агентов можно судить также по выходу трипановой сини в очаг воспаления. Обычно для этого создают асептическое воспаление нанесением на заднюю лапку мыши ксилола (0,02 мл). За 10 мин до этого животным внутривентрально вводят 0,3 мл 0,3% водного раствора красителя трипанового синего. Испытуемые вещества наносят местно за 2–2,5 ч до введения краски. Интенсивность окраски воспаленного участка отражает степень проницаемости капилляров.

1.6.6. Оценка противоаллергических свойств

В качестве модели, позволяющей оценить потенциальные противоаллергические свойства дерматологических препаратов, целесообразно использовать легко воспроизводимую модель экспериментального аллергического контактного дерматита [9, 16] у морских свинок. Для ее воспроизведения животных сенсибилизируют по стандартной схеме. В качестве аллергена применяют 2,4-динитрохлорбензол (ДНХБ), который используют в виде 5% спиртово-ацетонового раствора. Реактивность кожи после разрешающей инъекции выражается в баллах от 0 до 5 по шкале кожных проб [19]. В контроле применение 2,4-ДНХБ вызывает уже после первой кожной аппликации у всех животных умеренную гиперемию (1–1,3 балла), а у части из них — отек тканей, что подтверждает развитие контактного дерматита. После каждого последующего нанесения 2,4-ДНХБ тяжесть местных проявлений усугубляется и к 5-му дню заболевания отмечается резкое повреждение кожных покровов с образованием геморрагической корки (4–5 баллов). Толщина кожной складки увеличивается в среднем в 1,5–2 раза. После нанесения разрешающей дозы 2,4-ДНХБ у всех животных в контроле в течение 48 ч развивается выраженная воспалительная реакция (3,2–3,8 балла). Исследуемое средство можно считать перспективным, если существенно снижается острота дерматита (на 5-е сутки в среднем не превышает 1 балла; толщина кожной складки значительно ниже, чем в контроле), а после разрешающей аппликации не обнаруживаются признаков раздражения кожи. Для создания модели атопического дерматита острого течения можно использовать бесшерстных крыс с гипомагнемией.

1.6.7. Оценка антимикотических свойств

Антимикотические средства для лечения себорейного дерматита целесообразно изучать на соответствующей модели у морских свинок [20]. После снижения иммунитета у животных при помощи введения кортикостероидов им в течение недели втирают в кожу культуру *P. ovale*. Уже через 3 дня на месте втирания культуры развиваются эритема и шелушение, а к концу недели — фолликулит. Использование антимикотических средств путем втирания в себорейный очаг приводит к уменьшению воспалительной и гиперкератотической реакций, а к 5–7-му дню — к полному разрешению экспериментального дерматита.

Так как в патогенезе раневого процесса, в том числе ожогового, существенное место занимает развитие воспалительных реакций, то целесообразно изучать эффективность потенциальных ранозаживляющих и противоожоговых средств на стандартных моделях воспаления [17]: для оценки антиэкссудативного действия — формалиновый (карагениновый, гистаминовый, термический) отек задней конечности у мышей (крыс), перитонит у крыс, для оценки антипролиферативного действия — ватная (фетровая) гранулема у крыс, для оценки антиальтеративной активности — подкожная инъекция 9% водного раствора уксусной кислоты в бок крысы. Наиболее адекватной моделью для оценки противовоспалительного действия наружных средств считается ультрафиолетовая эритема у морских свинок.

Выбор модели для скрининга зависит от предполагаемой активности нового дерматотропного средства. Ранозаживляющие средства можно тестировать на модели линейных ран кожи, противоожоговые — на модели термических ожогов, противоаллергические — на модели контактного дерматита, противовоспалительные — на модели формалинового отека лапы и т. п. На этом этапе используются мелкие животные и отбирается наиболее перспективное для дальнейшего изучения соединение.

2. Дополнительные исследования

Углубленное изучение специфической активности проводят, используя несколько экспериментальных моделей для оценки влияния потенциального препарата на разные стороны течения патологического процесса в коже — экссудацию, пролиферацию, боль,

состояние капилляров, присоединение инфекции. Изучают особенности профилактического и лечебного применения нового ЛС — разные режимы введения. На этом этапе оценивают также острую токсичность препарата, его алергизирующие и местнораздражающие свойства. Острую токсичность местных дерматотропных средств определяют, нанося их на кожу экспериментальным животным — мышам, крысам, морским свинкам. В связи с ограничением количества наносимого на кожу вещества процедуру нанесения можно выполнять несколько раз на протяжении суток с часовыми перерывами. Целесообразно ограничиться восьмикратным нанесением вещества. Если все животные выжили в течение суток после последнего нанесения средства, то его можно считать практически нетоксичным. Для нанесения большого количества вещества мышам можно выстригать до 70% площади поверхности тела. Однако из-за потери большей части шерстного покрова животных в этом случае необходимо содержать в отдельном помещении вивария с повышенной температурой воздуха $3/4 + 27$ °С. Расчет ЛД₅₀ проводится по обычной схеме. В тех случаях, когда ЛД₅₀ препарата при местном введении нельзя рассчитать из-за невозможности многократно увеличивать дозу, рассчитывают соответствующий показатель для системного введения действующего вещества. На этом этапе определяется наиболее оптимальный режим использования потенциального ЛП, оценивается также его терапевтический индекс.

Дополнительные фармакологические исследования зависят от токсико-фармакологического профиля препарата. Помимо уже перечисленных методик, они могут включать изучение анальгетических свойств нового дерматотропного вещества (модели горячей пластинки, электрического раздражения хвоста, давления на лапу у крыс, уксуснокислых корчей у мышей), а также исследование противомикробных свойств. Методики можно найти в соответствующих разделах методических рекомендаций по доклиническим исследованиям [17].

3. Исследование безопасности

Исследование безопасности дерматотропных средств проводится по общепринятой схеме и включает изучение хронической токсичности, а также других видов (помимо алергизирующего и местнораздражающего действия) специфической токсичности.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Барнаулова С.О., Барнаулов, О.Д. Юбилейная X Конференция «Нейроиммунология». — СПб., 2001, С. 12.
2. Басков А.В. Журнал «Вопросы нейрохирургии», 2000. — № 1, 7–10.
3. Белогуров В. В. Автореф. дис. ... канд. вет. наук. — Москва, 2005.
4. Блатун Л.А., Ляпунов Н.А., Калининченко Н.Ф. и др. Антибиотики и химиотерапия, 1998. — № 12. — С. 20–24.
5. Блатун Л.А. Фармацевтический вестник, 2002. — № 3. — С. 18–19.
6. Блатун Л.А. Приложение Хирургия к журналу Consilium medicum, 2007. — 9(1). — С. 8–13.
7. Воробьев А.А., Утенков Д.Г., Поройский С.В. Патент РФ, 2004. — 41908.
8. Горбачева А.В., Аксиненко С.Г., Зеленская К.Л., Нестерова Ю.В. Бюллетень СО РАМН, 2003. — № 1(107). — С. 12–15.
9. Залкан П.М., Иевлева Е.А. Актуальные вопросы профессиональной дерматологии. — Москва, 1965. — С. 106–112.

10. Клебановас Ю., Лашас Л., Лашене Д., Пангоните Д. Проблемы эндокринологии, 2005. — 51(1). — С. 42–46.
11. Легеза В.И., Хребтович В.Н., Зиновьев Е.В. Патологическая физиология и экспериментальная терапия, 2004. — № 3. — С. 25–28.
12. Морозов В.Н., Дармограй В.Н., Хадарцев А.А. и др. Запорожский медицинский журнал, 2004. — 2(1). — С. 64–66.
13. Мусалатов Х.А., Елизаров М.Н., Насридинов М.А. Медицинская помощь: научно-практический журнал, 2002. — № 3. — С. 11–14.
14. Ноздрин В.И., Кинзирский А.С., Архапчев Ю.П. и др. Альманах Ретиноиды, 2003. — № 15. — С. 12–23.
15. Парамонов Б.А., Чеботарев В.Ю. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины, 2002. — 134(11). — С. 593.
16. Рабен А.С., Алексеева О.Г., Дуева Л.А. Экспериментальный аллергический контактный дерматит. — М.: Медицина, 1970.
17. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2-е изд., перераб. и доп. Р. У. Хабриев (ред.). — М.: Медицина, 2005.
18. Саватеева Т.Н., Коваленко А.Л., Шевчук М.К., Лычаков А.В. Здоровье нации — основа процветания России. — М.: 2005. — С. 19.
19. Суколин Г.И. Русский медицинский журнал, 1998. — 6(6). — С. 382–386.
20. Убашеев И.О., Назаров-Рыгдылон В.Э., Баторова С.М., Лоншакова К.С. Раны и их лечение в тибетской медицине. — Наука, 1990.
21. Фролова Н.Ю., Мельникова Т.И., Бурякина А.В. и др. Экспериментальная и клиническая фармакология, 72(5). — С. 56–60.

ГЛАВА 48

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ НЕСТЕРОИДНЫХ ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

СОСТАВИТЕЛИ: д. м. н., проф. Г.Я. Шварц; к. м. н. Р.Д. Сябаев

Введение

Нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП) являются группой ЛС, которые применяют для симптоматического лечения воспалительных процессов, сопровождающих многие, прежде всего ревматические, заболевания [2]. НПВП являются одной из наиболее широко применяемых групп ЛС. В частности, в США в структуре всех рецептурных препаратов их доля составляет более 25%; НПВП назначают примерно 20% стационарных больных с различными заболеваниями внутренних органов [8].

В группу НПВП объединены более 50 веществ различного химического строения, которые выпускаются в виде нескольких тысяч разнообразных моноконпонентных и комбинированных лекарственных форм (таблетки, свечи, ампульные растворы, мази, гели и др.).

По химическому строению НПВП являются гетерогенной группой, которые подразделяют на вещества кислотного и некислотного строения. Наиболее широко представлены НПВП кислотного строения, среди которых выделяют производные карбоновых (арилкарбоновых, арилалкановых) и эноловых (пиразолидиндионы и оксикамы) кислот [2, 7, 1]. Существенно меньше количество некислотных НПВП, в группу которых включены около 10 препаратов различного химического строения.

Группу НПВП, прежде всего кислотного строения, объединяют не только отдельные элементы химической структуры, но и, вероятно, обусловленное ими сходство фармакологических свойств и механизмов действия. Все они оказывают собственно противовоспалительное (антиэкссудативное), анальгезирующее и жаропонижающее действие, способны тормозить миграцию нейтрофилов в очаг воспаления и агрегацию тромбоцитов, а также активно связываться с белками сыворотки крови, особенно с альбуминами. Им присущи и сходные побочные эффекты — повреждающее действие на слизистую оболочку ЖКТ (ульцерогенное действие или гастротоксичность), нарушения функций почек и некоторые другие. Различия в действии НПВП носят в основном количественный характер. Но именно эти различия, обуславливающие, наряду с терапевтической эффективностью, переносимость отдельных препаратов у разных контингентов больных, а также особенности их фармакокинетики, являются основой не только для индивидуализированного применения различных НПВП, но и поиска новых препаратов этой фармакотерапевтической группы, имеющих преимущества перед существующими.

По современным представлениям [18] механизм действия кислотных НПВП состоит в подавлении (торможении, ингибировании) активности полиферментного комплекса (называемого простагландинсинтетазой или циклооксигеназой — ЦОГ или СОХ в англоязычной литературе), включающего диоксигеназу, изомеразу, редуктазу и др., катализирующего метаболизм полиненасыщенной арахидоновой кислоты, образующейся под влиянием фермента фосфолипазы А₂ из фосфолипидов клеточных мембран. ЦОГ, называемая также рН-эндопероксидсинтетазой, является бифункциональным связанным с клеточной мембраной гемопротееином, локализованным в эндоплазматическом ре-

тикулуме вблизи мест высвобождения арахидоновой кислоты из мембранных фосфолипидов. ЦОГ, функционирующая в присутствии молекулярного кислорода и различных кофакторов, катализирует две ключевые реакции в метаболизме арахидоновой кислоты, ведущие к образованию циклических эндоперекисей: а) окисление с присоединением кислорода в положениях 9, 11 и 15 ее молекулы с образованием промежуточного соединения, называемого простагландином (ПГ) G2 и б) конверсию ПГG2 в ПГH2, являющегося предшественником всех типов ПГ (ПГЕ, ПГF и др.), а также простаглицина и тромбоксанов A2 и B2, обладающих широким спектром биологических свойств и высокой активностью. Некоторые из образующихся при дальнейшем метаболизме циклических эндоперекисей ПГ (ПГ серии E) рассматривают как важнейшие «медиаторы» и модуляторы воспалительных реакций, участвующие в развитии их основных проявлений: нарушений микроциркуляции и формировании отека, развитии гиперальгезии, лихорадки и т.д. Действие ПГ в тканях усиливают свободные радикалы «гидрокси»-типа, также образующиеся при ферментативном окислении арахидоновой кислоты и вызывающие повреждения клеточных мембран, в том числе лизосомальных, что сопровождается высвобождением лизосомальных ферментов.

Принципиальное значение с точки зрения понимания патогенеза воспаления и механизма действия НПВП имеют данные о том, что ЦОГ существует в виде 2-х изоформ, обозначаемых как ЦОГ-1 и ЦОГ-2 и играющих разную роль в метаболизме арахидоновой кислоты в физиологических и патологических условиях [18,19]. Характеристика изоформ ЦОГ представлена в таблице 1.

ЦОГ-1 представляет собой конститутивный, т.е. постоянно синтезируемый под влиянием физиологических стимулов и присутствующий в клетках фермент, участвующий в образовании ПГ, простаглицина и тромбоксанов, являющихся регуляторами микроциркуляции и других функций в различных тканях, в том числе в слизистой оболочке ЖКТ, почек, образование тромбоксанов из тромбоцитов, ряда функций эндотелия и т.п.

В отличие от ЦОГ-1, ЦОГ-2 является изоформой ЦОГ и в физиологических условиях присутствует в тканях в крайне низкой концентрации. Ее образование стимулируется рядом активируемых в условиях воспаления факторов, таких как цитокины (интерлейкины – ИЛ-1, фактор некроза опухолей – ФНО-альфа и др.), свободные радикалы кислорода, липополисахариды, митогенные факторы, активатор тканевого плазминогена и др.

Таблица 1

Характеристика ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [5,9]

Характеристика	ЦОГ-1	ЦОГ-2
Изоформа	Конститутивная	Индукцируемая
Регуляция	Общая	Местная
Тканевая экспрессия	Тромбоциты, эндотелий, желудок, почки и др.	Активированные моноциты, фибробласты, сино-виоциты, предстательная железа, мозг и др.
Предполагаемая роль	Синтез ПГ, регулирующих физиологические функции желудка, почек, сосудов	Синтез ПГ, участвующих в развитии воспаления, контроле митогенеза, клеточного деления
Факторы, стимулирующие образование (экспрессию)	Физиологические	Воспалительные
Повышение образования под влиянием стимулирующих факторов	В 2–4 раза	В 10–80 раз
Кодирующие гены	22 kb +11 аминокислотных остатков (экзонов)	8,3 kb +10 аминокислотных остатков(экзонов)

Характеристика	ЦОГ-1	ЦОГ-2
Молекулярная масса	70 kD	70 kD (60% гомологии с ЦОГ-1)
Локализация в клетке	Цитоплазма	Околоядерная область

ЦОГ-2 синтезируется в воспаленных тканях «клетками воспаления» — макрофагами, моноцитами, а также синовиоцитами и фибробластами. Именно этот фермент играет ключевую роль в образовании провоспалительных ПГ, участвующих в развитии и поддержании воспалительного процесса. НПВП оказывают ингибирующее влияние на обе изоформы ЦОГ. Однако имеются существенные количественные различия в тормозящем влиянии препаратов этой группы в отношении каждой из изоформ ЦОГ (табл.2).

Таблица 2
Соотношение ингибирующей активности НПВП в отношении ЦОГ-1 и ЦОГ-2 [18]

Препарат	Соотношение ингибирования ЦОГ-2/ЦОГ-1
Ацетилсалициловая к-та	166
Диклофенак Na	0,7
Ибупрофен	15
Флурбипрофен	1,3
Индометацин	60
Напроксен	0,6
Ацетоминофен	7,4
Пироксикам	150
Мелоксикам	0,8

Естественно, механизм действия НПВП не исчерпывается действием на метаболизм ПГ. Он значительно сложнее и включает в себя влияние и на иные элементы воспалительного процесса. В частности, имеются аргументированные указания, касающиеся влияния НПВП на метаболизм и эффекты других медиаторов воспаления — кининов [7], биогенных аминов и адренергические структуры, высвобождение и активность лизосомальных ферментов, иммунные механизмы, свободно-радикальные процессы и др. [2].

Необходимо отметить и то, что ЛП многих фармакотерапевтических групп, в частности, агонисты альфа- и бета-адренорецепторов, некоторые психотропные, нейротропные, антигистаминные, иммуностропные, антибактериальные, цитостатические и др. препараты обладают элементами действия НПВП и могут вызывать торможение острой экссудативной реакции, уменьшать боль либо оказывать жаропонижающий эффект. В этой связи лишь углубленное изучение потенциальных ЛС, включающее набор приведенных в данных Методических рекомендациях методов, дает ответ на вопрос, можно ли их рассматривать в качестве потенциальных НПВП.

Фармакологическое изучение потенциального НПВП включает оценку его основных терапевтических свойств — *противовоспалительного, анальгетического и жаропонижающего действия*, а также наличия специфического побочного эффекта НПВП кислотного строения — *ульцерогенного действия*.

Настоящая редакция Методических рекомендаций содержит стандартный набор «классических» методик и традиционных моделей для исследования потенциальных НПВП. В ряде случаев на этапе скрининга может быть целесообразным использование альтернативных моделей и методов *in vitro*. Вместе с тем, на этапе углубленного изучения специфической активности обычно применяются наиболее адекватные, тра-

диционные методы, которые в настоящее время повсеместно используются ведущими разработчиками ЛС в нашей стране и за рубежом при доклиническом изучении НПВП. Примерная схема поэтапного изучения потенциальных НПВП представлена в *приложении 1*.

На этапе скрининга при оценке специфической активности исследуемые вещества, как правило, вводят зондом в желудок в виде водных растворов или суспензий на 0,5% Твине 80 (в качестве растворителя может быть также использован 1% крахмальный клейстер) за 1 ч до индукции воспаления. При углубленном изучении отобранного при скрининге вещества и его лекарственных форм обычно применяют способы введения, рекомендуемые для использования в клинике. Каждую дозу вводят группам из 6–10 животных. Во всех экспериментах используют стандартных половозрелых (желательно линейных) лабораторных животных обоего пола — мышей (массой тела 20–26 г), крыс (массой тела 130–180 г).

Определение значений средних и стандартной ошибки проводят традиционными методами вариационной статистики. Следует отметить, что показатель ЭД₅₀ адаптирован к оценке результатов, полученных в градированной форме, и соответствует дозе, вызывающей 50%-эффект (снижение воспалительной, болевой, лихорадочной реакции или выраженность ulcerогенного действия). Показатель ЭД₅₀ для альтернативных реакций типа «да-нет» (как в случае определения ЛД₅₀) используется редко, т.к. он требует дополнительного обоснования выбранного критерия и затрудняет сопоставление с показателями, обычно определяемыми для градированных реакций. Применение альтернативных показателей можно рекомендовать для использования дополнительных методов.

На этапе углубленного изучения действие фармакологически активного вещества сравнивают с эталонным препаратом, в качестве которого рекомендуется использовать наиболее эффективные и безопасные современные НПВП: диклофенак натрия, ибупрофен, пироксикам и др. (*приложение 2, табл.3*).

При углубленном изучении потенциального НПВП могут быть использованы дополнительные методы оценки влияния на активность ЦОГ-1 и ЦОГ-2, агрегацию тромбоцитов, клеточные и гуморальные звенья иммунных процессов и др.

1. Методы фармакологического доклинического исследования НПВП

Фармакологическое изучение потенциального НПВП включает оценку его основных терапевтических свойств — *противовоспалительного, анальгетического и жаропонижающего действия*, а также наличия специфического побочного эффекта НПВП кислотного строения — *ulcerогенного действия*.

1.1. Противовоспалительное действие

Нарушение микроциркуляции и формирование отека относятся к основным «классическим» признакам воспаления как возникшей в ходе эволюции реакции живой ткани на местное повреждение. В формировании острой воспалительной реакции принимают участие многочисленные медиаторы и модуляторы воспаления (гистамин, серотонин, лизосомальные ферменты, ПГ, кинины, цитокины и др.), образование и стадийное выделение которых отражает не только характер и интенсивность повреждающего (про-воспалительного) фактора, но и длительность его воздействия. Изменение соотношения образования указанных биогенных веществ способствует переходу острого воспаления в хроническую фазу с преобладанием пролиферативного компонента тканевой реакции. НПВП оказывают тормозящее влияние на развитие любого вида воспалительных реакций вне зависимости от характера повреждающего фактора, фазы и стадии процесса. В этой связи при оценке потенциального НПВП целесообразным является исследование его действия как на моделях острого экссудативного, так и хронического пролиферативного воспаления.

Оценка влияния на острое экссудативное воспаление

1.1.1. Каррагениновый отек лапы у крыс [18]

Острую воспалительную реакцию (отек) воспроизводят субплантарным (под подошвенный или плантарный апоневроз) введением 0,1 мл 1% раствора каррагенина (сульфатированный полисахарид из ирландского морского мха). Выраженность воспалительной реакции оценивают через 3 ч после индукции воспаления по изменению объема лапы (онкометрически). Исследуемые вещества вводят зондом в желудок за 1 ч до каррагенина. Противовоспалительный эффект, оцениваемый по уменьшению отека, выражают в процентах к контролю; по результатам действия не менее трех доз исследуемого вещества проводят расчет ЭД₅₀.

Дополнительный метод/модификация: формалиновый отек (субплантарное введение 0,1 мл 2% раствора формалина); каолиновый отек (субплантарное введение 0,1 мл 10% водной суспензии каолина). При использовании метода «отек лапы» для изучения лекформ для наружного применения препараты наносят на лапу (слегка втирая, и накладывают пластырь с марлей) — за 2 ч и 1 ч до индукции воспаления. Дозы исследуемого вещества при кожной аппликации или ректальном введении не должны существенно отличаться от эффективных доз, определенных при внутрижелудочном введении.

1.1.2. Перитонит у крыс⁹

Острая экссудативная реакция — перитонит — вызывается внутрибрюшинным введением 1% раствора уксусной кислоты (1 мл на 100 г массы тела). Через 3 ч животных подвергают эвтаназии, вскрывают брюшную полость и собирают экссудат. Исследуемые вещества вводят зондом в желудок за 1 ч до уксусной кислоты. Антиэкссудативный эффект оценивают по уменьшению объема экссудата в процентах к контролю, при необходимости определяют ЭД₅₀. Критерий эффективности при скрининге — снижение экссудативной реакции более чем на 50%.

1.1.3. Ультрафиолетовая эритема у морских свинок¹⁰ [15]

Острую воспалительную эритему у морских свинок-альбиносов обоего пола массой 250–500 г вызывают облучением ультрафиолетовыми (УФ) лучами участка кожи живота (3×4 см, лишенного шерсти за 1 сут до проведения исследования). В качестве источника УФ облучения используют кварцевую лампу (длина волны 280 нм); облучение осуществляют с расстояния 10 см в течение 60 с. Выраженность эритемы и отека кожи оценивают через 4 ч по 4-балльной шкале (при необходимости интегральной оценки реакции на облучение показатели суммируются; максимальное значение — 8 баллов).

Хроническое пролиферативное и иммунное воспаление

1.1.4 Фетровая гранулема у крыс [12]

Хроническое *пролиферативное* воспаление вызывают имплантацией под кожу живота 4-х простерилизованных фетровых дисков массой около 10 мг. Операцию выполняют под легким эфирным наркозом в асептических условиях. На 8-е сутки после операции фетровые диски с образовавшейся вокруг них грануляционной тканью извлекают, взвешивают на торсионных весах и высушивают до постоянной массы при 60 °С. Пролиферативную реакцию оценивают по разнице между массой высушенной гранулемы и исходной массой фетрового диска. Экссудативную реакцию оценивают по разнице между массой сырой и высушенной гранулемы. Исследуемые вещества вводят ежедневно, в течение 7 дней. Противовоспалительное действие (влияние на пролиферативный и экссу-

⁹ Рекомендуется использовать как вспомогательный метод и для предварительной оценки антиэкссудативного действия при скрининге — на мышах после регистрации болевой реакции в тесте «корчей».

¹⁰ Наиболее адекватный метод оценки противовоспалительного действия лекарственных форм для наружного применения.

дательный компонент хронического воспаления) выражают в процентах по отношению к контролю; ЭД₅₀ исследуемого вещества обычно определяют для антипролиферативного действия.

1.1.5 Адьювантный артрит у крыс [13]

Хроническое *иммунное* воспаление моделируют у крыс субплантарным введением в правую заднюю лапу 0,1 мл адьюванта Фрейнда (взвесь БЦЖ 2.5 мг/мл в вазелиновом масле). Воспалительная реакция, как правило, оценивается в динамике каждые 2 дня. Могут учитываться также и другие симптомы генерализованной реакции организма на введение адьюванта (отек ушей, хвоста, полиартрит, ухудшение общего состояния, снижение массы тела, гибель). Первичная реакция (отек на правой лапе) оценивается онкометрически на 3-й день после инъекции адьюванта. Вторичная иммунологическая реакция (отек на левой лапе) оценивается на 14-й день после введения адьюванта (при профилактической схеме введения) или на 25-й день (при лечебной схеме введения). ЭД₅₀ исследуемого вещества определяют, как правило, в отношении вторичной реакции:

а) При изучении профилактического действия исследуемые вещества вводят ежедневно, в течение 14 дней, начиная введение за 1 день до инъекции адьюванта.

б) При оценке лечебного действия исследуемые вещества вводят ежедневно, в течение 12 дней, начиная с 14-го дня после инъекции адьюванта.

1.2. Анальгетическое действие

Наряду с тормозящим влиянием на острое экссудативное и хроническое пролиферативное воспаление, характерным для НПВП является наличие анальгетических свойств. Эти препараты, ряд из которых относят к группе так называемых ненаркотических анальгетиков (в отличие от наркотических морфиноподобных), применяют для устранения слабых или умеренно выраженных болей, сопровождающих радикулиты, миозиты, а также другие мышечно-суставные заболевания, при головной и зубной боли. Их особенностями является отсутствие угнетающего влияния на дыхательный и кашлевой центры головного мозга и способности вызывать эйфорию, явления психической и физической зависимости. Механизм анальгетического действия НПВП складывается в основном из 2-х компонентов, каждый из которых может иметь самостоятельное значение: во-первых, за счет антиэкссудативных свойств, способствующих уменьшению воспалительного действия воспаленных тканей на болевые рецепторы и, во-вторых, из-за уменьшения аллогенного действия образующихся в нефизиологических количествах в очаге воспаления химических медиаторов боли — простагландинов, кининов и др., участвующих в формировании гипералгезии. Именно феномен гипералгезии, заключающийся в снижении порога болевой чувствительности воспаленных тканей к действию болевых стимулов различной модальности, является основным объектом влияния НПВП, в связи с чем данный эффект препаратов нередко называют гипоальгетическим. Определенное значение во влиянии отдельных НПВП (например, салицилатов) на воспалительные реакции воспалительного генеза может иметь их воздействие на таламические центры болевой чувствительности (центральный эффект).

Воспалительная гипералгезия

Механическое раздражение воспаленной лапы у крыс [14]

Воспалительная гипералгезия (повышенная болевая чувствительность воспаленных тканей) вызывается каррагенином (аналогично технике, описанной в п.1.1: 0,1 мл 1% раствора, субплантарно) и оценивается по снижению порога болевой чувствительности — ПБЧ (по разности ПБЧ) на механическое раздражение тканей лапы животного до введения каррагенина и через 3 ч после него. Измерение обычно проводят на воспаленной лапе. Наряду с этим, оценка ПБЧ на интактной лапе может служить дополнительным контролем и по-

звояет выявить анальгезию центрального происхождения. Используемый анальгезиметр должен обеспечивать плавное увеличение нагрузки на воспаленную лапу до появления болевой реакции (оцениваемой по писку животного). Исследуемые вещества вводят через 2 ч после введения каррагенина. Анальгетический эффект с определением ЭД₅₀ оценивают по снижению гиперальгезии через 1 ч после внутривенного введения препарата. Критерий эффективности — снижение гиперальгезии не меньше чем на 50%. При изучении продолжительности действия исследуемого вещества ПБЧ регистрируют каждый час.

Дополнительный метод/модификация: для моделирования гиперальгезии может быть использовано субплантарное введение 0,1 мл 10% суспензии пивных дрожжей, 2% формалина или адьюванта Фрейнда (адьювант, 5 мг/мл БЦЖ в вазелиновом масле, вводится за 24 ч до исследуемого вещества).

Химическое болевое раздражение

Корчи, вызванные уксусной кислотой у мышей [10]

В исследованиях на мышах специфическую болевую реакцию «корчи» (характерные движения животных, включающие сокращения брюшных мышц, чередующиеся с их расслаблением, вытягиванием задних конечностей и прогибанием спины) вызывают внутрибрюшинным введением 0,75% уксусной кислоты (0,1 мл/10 г массы тела). В течение последующих 15 мин после инъекции подсчитывают количество корчей для каждого животного (по 10 животных в группе). Анальгетический эффект оценивают по уменьшению количества корчей в процентах к контролю. Критерий эффективности при скрининге — снижение болевой реакции не меньше, чем на 50%.

Дополнительные методы/модификации. Корчи, вызываемые внутрибрюшинным введением уксусной кислоты у крыс (1% раствор, 0,5 мл/100 г); фенилбензохинона у мышей (0,02% раствор, 0,15 мл/10 г); ацетилхолина у мышей (3,2 мг/кг, 0,05% раствор, регистрация альтернативная в течение 2 мин).

1.3. Жаропонижающее действие

Характерным свойством НПВП является жаропонижающая активность, выраженность которой широко варьирует. Уменьшение лихорадочной реакции этими препаратами по современным представлениям связано в определенной степени с ингибированием биосинтеза ПГ в головном мозге, либо с их взаимодействием с рецепторными образованиями, в частности, в тканях ЦНС (термочувствительные нейроны в гипоталамусе). При этом, как полагают, антипиретические свойства НПВП отражают способность препаратов проникать в мозг, т.е. зависят от фармакокинетических характеристик. Изучение жаропонижающих свойств потенциальных НПВП, таким образом, позволяет не только охарактеризовать данный вид фармакологической активности, но и косвенно судить о способности проникать в ЦНС.

Дрожжевая лихорадка у крыс [11]

Лихорадочную реакцию вызывают подкожным введением 20% суспензии пекарских дрожжей. Ректальную температуру измеряют электротермометром до введения пирогена и через 18 ч после него (разница этих измерений представляет собой оцениваемую гипертермическую реакцию). Жаропонижающее действие оценивают по уменьшению гипертермии через 2 ч после введения исследуемого вещества. Возможна регистрация динамики эффекта через часовые промежутки в течение 7 ч.

Дополнительный метод/модификация: лихорадка у крыс, вызванная внутривенным введением пирогенала (500 МПД/кг).

1.4. Ульцерогенное действие

Повреждающее влияние НПВП на слизистую оболочку ЖКТ, называемое также ульцерогенным действием, является характерным для этой группы препаратов побочным эффектом, связанным по современным представлениям преимущественно с основным механизмом их действия — тормозящим влиянием на активность фермента циклоокси-

геназы (ЦОГ). При этом важно отметить, что данный эффект, в целом коррелирующий с силой противовоспалительного действия [4], отражает неизбирательность действия большинства существующих НПВП в отношении изоформ этого фермента — конститутивной (ЦОГ-1) и индуцируемой (ЦОГ-2). Именно подавление НПВП активности ЦОГ-1 и связанное с этим уменьшение катализируемого данным ферментом синтеза ПГ, простагландинов и тромбоксанов, являющихся физиологическими регуляторами микроциркуляции в слизистой оболочке ЖКТ, рассматривают как основной механизм, лежащий в основе ulcerогенного эффекта данной группы ЛС. В этой связи изучение ulcerогенного эффекта у потенциального НПВП дает возможность, с одной стороны, выявить наличие и выраженность этого потенциально неблагоприятного эффекта, а с другой — косвенно судить о влиянии изучаемого вещества на биосинтез ПГ.

а) *Однократное введение.* Исследуемые вещества (в виде водных растворов или суспензий на твине 80¹¹ вводят однократно внутрижелудочно крысам, лишенным пищи за 16 ч до исследования (животных помещают в клетки с сетчатым полом без подстилки, чтобы исключить поедание мусора и экскрементов). Через 3 ч животных подвергают эвтаназии, извлекают желудки, рассекают их по малой кривизне и промывают в физиологическом растворе для удаления содержимого. Оценку ulcerогенного эффекта проводят по 4-балльной шкале: 0 — отсутствие повреждений; 0,5 — гиперемия; 1 — единичные незначительные повреждения (1 или 2 точечных кровоизлияния); 2 — множественные повреждения (эрозии, точечные кровоизлияния); 3 — значительные и множественные повреждения слизистой (эрозии, кровоизлияния); 4 — грубые повреждения, охватывающие всю поверхность слизистой (массивные кровоизлияния, эрозии, перфорации). По результатам оценки определяют УД₅₀ — дозу исследуемого вещества, вызывающую ulcerогенный эффект, соответствующий 2 баллам.

б) *Повторное (субхроническое) введение.* Используется как дополнительный метод, рекомендуется для изучения лекарственных форм. Исследуемые вещества вводят внутрижелудочно в течение 4-х дней до оценки ulcerогенного действия. Возможно определение УД₅₀.

Доклиническая оценка ulcerогенных свойств исследуемого вещества проводится с учетом результатов токсикологического изучения лекарственных форм в хроническом эксперименте.

1.1.5. Влияние на эффекты медиаторов воспаления *in vitro* и *in vivo*

В качестве дополнительных могут быть использованы следующие методы, позволяющие судить о влиянии исследуемых веществ на образование, высвобождение и эффекты медиаторов воспаления:

а) влияние исследуемых веществ (10^{-10} – 10^{-5} г/мл) на сокращение изолированных отрезков подвздошной кишки морской свинки, вызванное *арахидоновой кислотой (натриевая соль)* (10^{-5} г/мл); *гистамином* (5×10^{-8} г/мл), *серотонином* (2×10^{-6} г/мл), *ПГЕ₂* (5×10^{-8} г/мл); *брадикинином* (5×10^{-8} г/мл);

б) влияние исследуемых веществ на экссудативную реакцию (отек лапы у крыс), вызванную субплантарным введением 0,1 мл раствора *арахидоновой кислоты* (0,1%); *вещества 48/80* (0,005%); *гистамина* (0,1%); *серотонина* (0,01%); *ПГЕ₂* (0,005%).

2. Этапы фармакологического исследования НПВП

2.1. Скрининг

Данный этап представляет собой *предварительную оценку наличия противовоспалительных свойств* у исследуемых веществ для определения целесообразности их дальнейшего изучения в качестве потенциальных НПВП.

Включение теста оценки специфического ulcerогенного действия на данном этапе обусловлено его высоким прогностическим значением, поскольку ulcerогенность яв-

¹¹ Применение крахмального клейстера нежелательно из-за возможного защитного обволакивающего эффекта.

ляется практически неотъемлемым свойством и основным «нежелательным побочным эффектом» аспириноподобных НПВП, ингибиторов ЦОГ. Анализ спектра действия современных НПВП выявляет высокую корреляцию ($r=0,89$) между противовоспалительной активностью и ulcerогенными свойствами [4].

Следует иметь в виду, что интерпретация результатов скрининговых исследований по одной серии экспериментов в значительной степени имеет вероятностный характер. Вероятность правильного прогноза при отборе веществ для углубленного изучения значительно возрастает при наличии достоверного и дозозависимого эффекта, а также при сочетании всех 3-х видов активности, характерных для НПВП.

Начальная ориентировочная оценка острой токсичности исследуемых веществ служит лишь для определения диапазона адекватных доз, которые используются в последующих фармакологических экспериментах данного этапа. При незначительном количестве исследуемых веществ целесообразно провести полноценное изучение острой токсичности с определением статистически достоверного показателя LD_{50} .

Рекомендуемый набор скрининговых тестов включает:

а) *Ориентировочное определение LD_{50}* для мышей при внутрижелудочном введении. Регистрация гибели животных проводится не раньше чем на 3-и сутки (при проведении стандартного токсикологического эксперимента наблюдение за состоянием животных проводится в течение 14 дней). Макроскопическое обследование состояния слизистой желудка у павших и выживших животных может дать предварительную информацию о возможном ulcerогенном действии исследуемого вещества, которое в дальнейшем оценивается в исследованиях на крысах.

б) *Противовоспалительное действие.* Антиэкссудативный эффект исследуемого вещества при внутрижелудочном введении в дозах, составляющих 0,05 LD_{50} и 0,1 LD_{50} , оценивают на модели каррагенинового отека лапы у крыс. Оценка противовоспалительного эффекта проводится через 3 ч после индукции воспаления. Критерием эффективности (при альтернативной оценке реакции) по данному тесту следует считать достоверное уменьшение отека лапы не меньше чем на 30% по сравнению с контролем.

В качестве альтернативного метода можно использовать модель формалинового отека лапы у крыс.

в) *Анальгетическое действие.* Анальгетический эффект исследуемого вещества (в тех же дозах) оценивают по способности уменьшать число болевых реакций, «корчей», у мышей при внутрибрюшинном введении 0,75% раствора уксусной кислоты. Критерием эффективности (при альтернативной оценке) считают достоверное угнетение болевой реакции на 50% и более. Следует отметить, что данный эксперимент позволяет получить предварительную дополнительную информацию о возможном антиэкссудативном действии исследуемого вещества по измерению объема экссудата в брюшной полости через 2 ч после введения уксусной кислоты.

Более достоверные результаты могут быть получены при использовании аналогичной модели экссудативной реакции брюшной полости на крысах.

г) *Ульцерогенное действие.* В исследованиях на крысах, лишенных пищи за 16 ч до опыта, оценивают ulcerогенное действие исследуемых веществ при однократном внутрижелудочном введении в дозе 0,2 LD_{50} . Оценку ulcerогенного действия проводят через 3 ч после введения веществ.

2.2. Углубленное изучение специфической активности

Целью данного этапа исследований является оценка специфической противовоспалительной активности и широты терапевтического действия отобранного соединения. Исследования включают определение показателей специфической активности субстанции ($ЭД_{50}$) и проведение серий сравнительных экспериментов с позитивным контролем, в качестве которого используют стандартные НПВП, применяемые в адекватной (эквитоксической дозе). Широту терапевтического действия исследуемого вещества оценивают по *индексу безопасности* — $УД_{50}/ЭД_{50}$, а также по *терапевтическому*

индексу — LD_{50}/ED_{50} , которые сравнивают с соответствующими показателями стандартных НПВП (препарата сравнения).

2.3. Дополнительные исследования

Целью данного этапа является изучение лекарственных форм перспективных веществ, отобранных для КИ, а также расширение характеристики их фармакологического спектра за счет использования дополнительных методов оценки специфической активности (противовоспалительного, анальгетического и жаропонижающего действия) и изучения общих фармакологических свойств.

Использование различных экспериментальных моделей иногда позволяет выявить особенности механизма действия исследуемого вещества и прогнозировать возможные побочные эффекты.

Дополнительные исследования следует проводить с использованием препарата сравнения — стандартного НПВП (см. приложение 2).

Наряду с использованием дополнительных «альтернативных» методов оценки специфической противовоспалительной активности, на данном этапе проводят: а) изучение эффективности исследуемого вещества при лечебной схеме применения; б) изучение общих фармакологических свойств (влияние на центральную и периферическую нервную систему, ССС, тонус бронхов, свертывание крови, кроветворение, функцию печени и почек и др.); в) изучение специфического фармакологического действия лекарственных форм (проводятся наиболее показательные сравнительные эксперименты с применением рекомендуемых способов введения).

2.4. Изучение механизмов действия

Данный вид исследований предполагает использование принципов фармакологического анализа, а также биохимических и других специальных методов, позволяющих оценить выраженность типичного для большинства современных НПВП механизма действия — ингибирование ЦОГ, избирательность влияния на ее изоформы (ЦОГ-1, ЦОГ-2), или выявить иные механизмы действия.

Приложение 1

Примерная схема изучения специфической фармакологической активности потенциальных нестероидных противовоспалительных средств

1. Скрининг

- *Острая токсичность* (LD_{50} для мышей при внутрижелудочном введении).
- *Противовоспалительное действие* (карагениновый отек лапы у крыс; внутрижелудочное введение в дозах $0,05LD_{50}$ и $0,1LD_{50}$).
- *Анальгетическое действие* («корчи» у мышей, вызванные уксусной кислотой; внутрижелудочное введение в дозе $0,1LD_{50}$).
- *Ульцерогенное действие* (однократное внутрижелудочное введение крысам в дозе $0,2LD_{50}$).

2. Углубленное изучение специфической противовоспалительной активности

2.1. Острая токсичность (LD_{50} для мышей при рекомендуемых способах введения)

2.2. Противовоспалительное действие (ED_{50})

- а) Острое экссудативное воспаление (карагениновый отек лапы у крыс, «перитонит» у мышей и крыс, «ультрафиолетовая эритема» у морских свинок-альбиносов).
- б) Хроническое пролиферативное воспаление («фетровая гранулема» у крыс).
- в) Хроническое иммунное воспаление («адьювантный артрит» у крыс).

Анальгетическое действие ($ЭД_{50}$: механическое болевое раздражение воспаленных тканей — каррагениновый отек).

Жаропонижающее действие ($ЭД_{50}$: «дрожжевая лихорадка» у крыс).

Ульцерогенное действие ($УД_{50}$ при однократном внутрижелудочном введении на крысах). Вычисление показателей широты терапевтического действия (терапевтический индекс — $ЛД_{50}/ЭД_{50}$; индекс безопасности — $УД_{50}/ЭД_{50}$). Сравнительная оценка широты терапевтического действия исследуемого вещества и стандартных НПВП.

3. Дополнительные исследования

Противовоспалительное действие:

- а) отек лапы у крыс, вызванный формалином, декстраном, каолином;
- б) эксперименты с использованием адреналэктомированных крыс на моделях острого и хронического воспаления (каррагениновый отек, фетровая гранулема).

Анальгетическое действие:

- а) «корчи» у мышей, вызванные фенилбензохиноном, ацетилхолином;
- б) механическое болевое раздражение воспаленной и интактной лапы у крыс (гиперальгезия, вызванная введением формалина, суспензии пивных дрожжей, адьюванта Фрейнда).

Жаропонижающее действие:

гипертермическая реакция у крыс, вызванная пирогеналом.

Изучение продолжительности действия (противовоспалительного, анальгетического, жаропонижающего).

Лечебная схема введения (сравнительная оценка противовоспалительного действия при профилактической и лечебной схеме введения на моделях острого и хронического воспаления).

Ульцерогенное действие (оценка ульцерогенного действия у крыс при повторном субхроническом введении препарата).

Изучение лекарственной формы:

- а) Экспериментальное обоснование дозировки и выбор состава лекарственной формы.
- б) Изучение специфической фармакологической активности и ульцерогенного действия предлагаемых лекарственных форм в сравнении с субстанцией и препаратом сравнения (оценивается эффект одинаковых или эквитоксических доз исследуемого вещества и препарата сравнения).

Изучение общих фармакологических свойств.

4. Изучение механизмов действия

4.1. Влияние на гипофиз-адреналовую систему

Оценка противовоспалительной активности на адреналэктомированных животных — каррагениновый отек.

4.2. Влияние на эффекты медиаторов воспаления *in vivo* и *in vitro*:

- а) влияние на воспаление лапы у крыс, вызванное веществом 48/80, гистамином, серотонином, арахидоновой кислотой, ПГЕ₂;
- б) влияние на спазмогенную реакцию изолированной подвздошной кишки морской свинки, вызванную гистамином, серотонином, брадикинином, ПГЕ₂, арахидоновой кислотой.

4.3. Возможное участие центральных механизмов анальгетического эффекта:

- а) механическое болевое раздражение интактных (невоспаленных) тканей;
- б) термическое болевое раздражение (метод «отдергивания хвоста», метод «горячей пластинки»).

**4.4. Другие экспериментальные методы,
позволяющие выявить особенности механизма действия**

Приложение 2

Таблица 3

Соотношение противовоспалительной и ulcerогенной активности НПВП у крыс [4,7]

Препарат	ЭД ₅₀ (мг/кг) каррагениновый отек	УД ₅₀ (мг/кг)	УД ₅₀ /ЭД ₅₀
Ибупрофен	48	310	6,45
Диклофенак натрий	8	48	6,0
Напроксен	15	49	3,2
Пироксикам	20	36	1,8
Фенилбутазон	56	120	2,1
Ацетилсалициловая кислота	98	240	2,45
Индометацин	10	10	1,0

Таблица 4

Соотношение противовоспалительной активности и острой токсичности НПВП в эксперименте

Препарат	ЭД ₅₀ (мг/кг) каррагениновый отек	ЛД ₅₀ (мг/кг)	ЛД ₅₀ /ЭД ₅₀
Ибупрофен	48	750	16
Диклофенак натрий	8	370	46
Напроксен	15	620	42
Пироксикам	20	290	15
Фенилбутазон	56	430	7,7
Ацетилсалициловая кислота	98	1600	16
Индометацин	10	47	4,7

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Насонов Е.Л., Цветкова Е.С., Балабанова Р.М. и соавт. — Клиническая медицина. — 1996, № 4. — С. 1–4.
2. Сигидин Я.А., Шварц Г.Я., Арзамасцев А.П., Либерман С.С. — Лекарственная терапия воспалительного процесса (экспериментальная и клиническая фармакология противовоспалительных препаратов). — М.: Медицина, — 1988, — 240 с.
3. Сюбаев Р.Д., Шварц Г.Я. Бюл.эксперим. биол. и мед., 1986. — № 12. — С. 733–735.
4. Сюбаев Р.Д., Машковский М.Д., Шварц Г.Я. и соавт. Хим.-фарм.журнал, 1986. — № 1. — С. 33–39.
5. Филипович-Сосновска А. Новости фармации и медицины. — 1997. — № 5–6. — С. 89–94.
6. Шварц Г.Я. Хим.-фарм. журн. — 1988, № 11. — С. 1317–1326.

7. Шварц Г.Я., Пасхина Т.С., Якубовская Р.И. Фармакол. и токсикол. — 1984. — № 4. — С. 74–81.
8. Brooks P.M., Day R.O. *New Engl. J. Med.*, 1991. — Vol. 324. — P. 1716–1725.
9. DeWitt D.L., Meade E.A., Smith W.L. — *Amer. J. Med.*, 1993, — Vol. 95. — Suppl.2A. — P. 40S–44S.
10. Koster R., Anderson M., de Beer E. «*Fed. Proc.*», 1959. — Vol. 18. — P. 412.
11. Loux J., de Palma P., Yanksell S. «*Toxicol. Appl. Pharmacol.*», 1972. — Vol. 22. — P. 672.
12. Meier R., Schuler W., Dessaulles P. «*Experientia*», 1950. — Vol. 6. — P. 469.
13. Newbould B. «*Br. J. Pharmacol.*», 1963. — Vol. 21. — 127.
14. Randall L., Selitto J. «*Arch. Int. Pharmacodyn.*», 1957. — Vol. 111. — P 209.
15. Swingle K., Hamilton R., Harrington J., Kvam D. «*Arch. Int. Pharmacodyn.*», 1971. — Vol. 189. — P. 129.
16. Vane J.R. *Br. J. Rheumatol.*, 1996. — Vol. 35. — P. 1–3.
17. Vane J.R., Botting R.M., — *Inflamm. Res.*, 1995. — Vol. 44. — P. 1–10.
18. Winter C., Risley E., Nuss G. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 1962. — Vol. 111. — P. 544.
19. Xie W., Robertson D.L., Simmons D.L. — *Drug Dev. Res.*, 1992. — Vol. 25. — P. 249–265.

ГЛАВА 49

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ ГЕМОСТИМУЛИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: д. м. н., проф., академик РАМН А.М. Дыгай; д. м. н., проф. В.В. Жданов; д. м. н., проф. В.Е. Гольдберг; д. м. н. Г.Н. Зюзьков; д. м. н. Е.В. Удут; д. м. н. Т.Ю. Хричкова; к. м. н. Е.В. Симанина; к. м. н. Л.А. Мирошниченко; к. м. н. Л.А. Ставрова

Введение

Одной из актуальных проблем экспериментальной гематологии и фармакологии является поиск новых эффективных ЛС, способных стимулировать костномозговое кроветворение при гипопластических состояниях различного генеза. Широко применяемые в лечебной практике цитостатические и гормональные препараты, а также лучевая терапия зачастую приводят к развитию нарушений со стороны активно пролиферирующих тканей, и в первую очередь — к угнетению костномозгового гемопоэза [2, 3, 7, 8, 15, 16]. Лучевые поражения (аварии, профпатология и др.) также сопровождаются, как правило, депрессиями кроветворения. В этой связи чрезвычайно важное значение приобретает проблема создания эффективных гемостимуляторов. Используемые в настоящее время с этой целью в эксперименте и клинике фармакологические средства, такие как зимозан, витамины группы В, пентоксил, метилурацил, экстракт золотого корня, сок подорожника, мурамилдипептид, муростазин и др., являются малоэффективными стимуляторами кроветворения или сами обладают рядом нежелательных побочных эффектов [1, 5, 9, 10, 11, 13, 16, 22]. Препараты же, способные целенаправленно стимулировать процессы пролиферации и дифференцировки гемопоэтических клеток, представляющие собой преимущественно рекомбинантные формы цитокинов, обладают очень высокой стоимостью [4, 19, 21, 25, 26]. Кроме того, их применение также ограничено в связи с возможностью развития целого ряда отрицательных побочных эффектов [23, 24]. Таким образом, весьма перспективным можно считать создание и изучение потенциальных стимуляторов кроветворения, обладающих низкой токсичностью, высокой специфичностью действия, минимальной выраженностью побочных эффектов, возможностью длительного применения без развития толерантности. В связи с этим становится актуальной и проблема единого подхода к качественной и достоверной оценке эффективности разрабатываемых ЛС, планируемых к применению в качестве гемостимуляторов.

1. Общие положения. Понятия и термины

Максимально переносимая доза — наибольшая доза, введение которой в организм не вызывает его гибели, хотя и сопровождается развитием симптомов отравления.

Общее количество лейкоцитов — общее число гранулоцитов, моноцитов и лимфоцитов в единице объема цельной крови.

Общее количество миелокариоцитов — общее число ядросодержащих клеточных элементов в единице объема костномозгового пунктата.

Колониеобразующие единицы — клетки-предшественники, способные в определенных условиях формировать колонии, в которых все элементы являются потомками одной клетки.

Колонiestимулирующая и эритропоэтическая активность — совокупность гуморальных факторов, обладающих способностью стимулировать колониобразование из предшественников грануломоноцито- и эритропоэза соответственно.

2. Цели и задачи исследования. Основные этапы исследования

Целью исследования является оценка способности фармакологических веществ стимулировать подавленное кроветворение и изучение механизмов их действия.

Задачи исследования:

1. Определить, способно ли фармакологическое вещество оказывать влияние на гемопоэз при миелодепрессии.

2. Выявить диапазон доз, в которых изучаемое вещество проявляет стимулирующее влияние на кроветворение.

3. Вскрыть механизмы влияния исследуемого препарата на процессы восстановления костномозгового кроветворения, подавленного цитостатиком.

4. Выяснить, на какой росток гемопоэза и на каком уровне действует исследуемое вещество.

Основными этапами исследования являются:

1. Целенаправленный скрининг веществ для выявления у них гемостимулирующей активности.

2. Углубленное изучение специфической активности гемостимулирующих веществ.

3. Рекомендуемые тесты и биологические модели

Наличие гемостимулирующей активности у фармакологических веществ выявляют на интактных животных и модели цитостатической миелосупрессии, вызванной введением в максимально переносимой дозе различных по своей природе и механизмам действия цитостатиков с использованием общепринятых гематологических методов, либо с помощью автоматического гематологического анализатора.

Для оценки механизмов действия гемостимулирующих веществ обязательным является использование культуральных методов исследования, которые применяются для определения колониобразующей способности миелокариоцитов в системе *in vitro*, уровней колониобразующей и эритропоэтической активностей в супернатантах клеток костного мозга и в сыворотке периферической крови. Для фенотипирования клеток-предшественников можно использовать также проточную цитометрию, а для определения концентраций гемопоэтических ростовых факторов — иммуноферментный анализ.

4. Условия проведения исследования

Исследования проводятся в соответствии с правилами лабораторной практики для экспериментов *in vitro* и *in vivo*.

К исследованию принимаются идентифицируемые и/или стандартизованные вещества со следующими известными характеристиками:

- методы получения;
- условия растворимости (водорастворимые, жирорастворимые);
- однородность;
- желательно знать химическую структуру, молекулярную массу.

4.1. Оборудование, инструменты и реактивы

Приборы и реактивы для выполнения исследований стандартными гематологическими методами исследования и/или для работы с автоматическим гематологическим анализатором [6, 12].

Стерильное боксированное помещение, ламинарный шкаф, микроскоп прямого света, инвертированный микроскоп с системой визуализации; термостат, CO₂-инкубатор, холодильная установка ультранизких температур, система тонкой очистки воды, центри-

фуга, весы, стандартизованные и сертифицированные для лабораторных исследований культуральные среды и дополнительные компоненты к ним, культуральная посуда, а также другие приборы и реактивы, определяемые задачами конкретного исследования и используемого метода.

4.2. Растворители и разбавители

Определяются известными к началу эксперимента характеристиками исследуемого вещества. Выбранные растворители должны служить контролем при проведении экспериментов.

4.3. Дозы, пути, режимы введения и продолжительность исследования

Определяются индивидуально в зависимости от известных к началу эксперимента свойств вещества, этапа и метода исследования.

Исследование показателей системы крови проводят у контрольных и получающих исследуемое вещество животных в период подавления и восстановления костномозгового кроветворения, как правило, с 1 по 14 сутки после введения цитостатика в максимально переносимой дозе (МПД, определяется методом пробит-анализа) однократно, внутривенно.

4.4. Экспериментальные животные

Линейные конвенциональные либо свободные от патогенной флоры мыши, а также беспородные крысы и мыши.

4.5. Рекомендации по выбору препарата сравнения

При исследовании гемостимулирующего действия вещества в качестве препарата сравнения применяют уже известные препараты, избирательно стимулирующие гранулоцитопоез (например, филграстим) или эритроцитопоез (например, эпоэтин- α , или эпоэтин- β). Для «одновременной» стимуляции нескольких ростков гемоцитопоеза используют вместе различные факторы роста.

5. Описание эксперимента и особенностей его проведения

5.1. Первый этап

Целью первого этапа исследования является обнаружение гемостимулирующей активности у изучаемых веществ.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние веществ на состояние периферической крови и костного мозга.

2. Выявить диапазон доз, в которых изучаемое вещество проявляет стимулирующее влияние на гемоцитопоез.

Первый этап включает обязательное исследование показателей системы крови на следующих экспериментальных моделях: беспородные интактные мыши и крысы; мыши, подвергнутые воздействию циклофосфана в максимально переносимой дозе.

1. Определение общего количества лейкоцитов и их отдельных морфологических форм в периферической крови.

Общее количество лейкоцитов и их морфологический состав определяются общепринятыми гематологическими методами [6, 12] либо с помощью автоматического гематологического анализатора.

2. Определение общего количества эритроцитов, ретикулоцитов, содержания гемоглобина в периферической крови.

Общее количество эритроцитов, ретикулоцитов и содержание гемоглобина определяется общепринятыми гематологическими методами [6, 12], либо с помощью автоматического гематологического анализатора.

3. Подсчет общей клеточности костного мозга и миелограммы.

Для изучения клеточности костного мозга выделяется бедренная кость мыши, очищается от мягких тканей, костномозговой канал промывается 1 мл 3% уксусной кислоты. Полученный костный мозг суспендируется в растворе уксусной кислоты шприцем через иглы уменьшающегося диаметра. Общее количество миелокариоцитов подсчитывается в камере Горяева и выражается числом клеток на бедро. Для приготовления мазков костного мозга содержимое бедренной кости либо 1–2 сегментов грудины выдавливается на обезжиренное стекло, разводится изологичной сывороткой, затем делается мазок с помощью шлифованного стекла. Высохшие мазки фиксируются в метаноле 3–5 мин и окрашиваются по Нохту-Максимову [6]. Миелограмма подсчитывается на 400 клеток, после чего определяется абсолютное содержание клеточных элементов отдельных ростков гемопоэза.

Вещества, не оказывающие выраженного гемостимулирующего действия, исключаются из дальнейшего исследования.

5.2. Второй этап

Целью второго этапа исследования является углубленное изучение специфической активности гемостимулирующих веществ.

Выявленные на первом этапе эффекты тестируемых веществ не позволяют судить о механизмах их гемостимулирующего влияния. В ходе дальнейшего исследования предполагается изучение возможного избирательного действия веществ на отдельные ростки кроветворения на определенных этапах созревания клеток, определение влияния на регуляторный аппарат системы крови в целях дифференцированного подхода к их клиническому применению.

Изучение специфической активности препарата проводится на определенной модели цитостатической миелосупрессии, характеризующейся преимущественным поражением конкретного ростка кроветворения, в соответствии с предполагаемыми показаниями к применению гемостимулятора в клинической практике:

1. Мыши, подвергнутые воздействию циклофосфана, либо 5-фторурацила в МПД (однократно, внутрибрюшинно). Модель воспроизводит панцитопеническое состояние, характеризующееся подавлением большинства ростков кроветворной и лимфоидной тканей. Сроки исследования: 1–14 сутки после введения цитостатика.

2. Мыши, подвергнутые воздействию антибиотиков антрациклинового ряда либо карбоплатина в МПД. Гипоплазия кроветворения характеризуется преимущественным подавлением эритропоэза (модель анемии). Сроки исследования: 1–10 сутки после введения цитостатика.

3. Мыши, подвергнутые воздействию цитостатиков из группы алкилирующих агентов, либо эпозоида, угнетающих в МПД преимущественно гранулоцитарный росток гемопоэза (модель лейкопении). Сроки исследования: 1–12 сутки после введения цитостатика.

Оценка специфической активности препаратов, избирательно стимулирующих процессы костномозгового эритропоэза, проводится с использованием следующих показателей:

1. Определение в периферической крови общего количества эритроцитов и ретикулоцитов.

2. Подсчет общей клеточности костного мозга и миелограмм.

5.2.1. Изучение способности миелокариоцитов образовывать эритроидные колонии в системе *in vitro* (определение содержания в костном мозге эритроидных колониеобразующих единиц типа КОЕ-Э) [6, 18]

Бедренная кость мыши стерильно выделяется (в условиях ламинар-бокса), очищается от мягких тканей, после чего костный мозг из кости асептически эксплантируется и суспендируется в среде RPMI-1640. Для фракционирования костного мозга суспензия

костномозговых клеток инкубируется в течение 45 мин в среде RPMI-1640, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), в 35 мм пластиковых чашках Петри в течение 40–50 мин при 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности. Затем среда из чашек осторожно отсасывается, и не прилипшие при инкубации к пластику клетки дважды отмываются. В случае высокого содержания эритроцитов в неадгезирующей фракции последнюю разделяют на градиенте плотности с использованием препарата Ficoll-Paque, Histo-Paque, либо специально приготовленного раствора фиколл-гипака (плотность 1,066–1,077 г/см³). Образующийся при центрифугировании (3000 об/мин, 20 мин) интерфазный слой (содержит 85–90% моноцитов и лимфоидных элементов) собирают, отмывают и используют в дальнейшей работе.

Концентрация неадгезирующих жизнеспособных костномозговых нуклеаров доводится до 2×10⁵ на 1 мл полувязкой среды следующего состава: 89% среды RPMI-1640, 1% метилцеллюлозы, 10% ЭТС, 280 мг/мл L-глутамина, 50 мг/л гентамицина, 1 МЕ/мл рекомбинантного мышинового, либо человеческого эритропоэтина (все компоненты культуральной среды предварительно тестируются). По 0,5 мл приготовленной взвеси клеток помещают в 24-луночные пластиковые планшеты и инкубируют в течение 3 сут в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывают количество выросших колоний и кластеров. Под колониями подразумевают образовавшиеся в культуре очаги гемопоэза, содержащие более 30 кроветворных элементов, а под кластерами — от 5 до 30 клеток. С целью морфологического изучения колоний и кластеров готовят цитологические препараты, которые окрашивают азур II-эозином.

Вычисление общего числа гемопоэтических прекурсоров в бедре мыши производится по формуле:

$$X = \frac{A \times B \times C}{D \times 0,1},$$

где X — число клеток-предшественников в бедре; A — количество колоний (кластеров), выросших в культуре из 10⁵ миелокариоцитов; B — общая клеточность костного мозга (×10⁶/бедро); C — число не адгезировавших после прилипания клеток (×10⁶); D — число костномозговых клеток, эксплантированных в чашки Петри для прилипания (×10⁶).

5.2.2. Определение эритропоэтической активности (ЭПА) в кондиционной среде, полученной от нестимулированных прилипающих, неприлипающих костномозговых нуклеаров и в сыворотке периферической крови [6, 20]

Для получения кондиционной среды клеток костного мозга взвесь миелокариоцитов получавших исследуемое вещество и контрольных мышей (5×10⁶ клеток/мл) разделяется на адгезирующую и неадгезирующую фракции. Для получения супернатантов прилипающих нуклеаров среда с неадгезирующими элементами удаляется, а прилипающие клетки инкубируются в полной культуральной среде следующего состава: 90% среды RPMI-1640, 10% ЭТС, предварительно инактивированной теплом (56 °С, 30 мин), 2 мМ L-глутамина, 10 мМ НЕРЕС, 40 мг/л гентамицина, 25 мкМ 2-меркаптоэтанола 24 ч при 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. В случае изучения активности неприлипающих клеток удаляется адгезирующая фракция, концентрация неадгезирующих нуклеаров доводится до 2 млн клеток/мл, после чего полученную взвесь инкубируют 24 ч в вышеуказанных условиях.

По окончании инкубации в обоих случаях собирают кондиционные среды и хранят не более месяца при -20 °С.

Определение ЭПА кондиционной среды клеток костного мозга и сыворотки периферической крови проводят микрометодом в 96-луночных планшетах. Кондиционная среда от адгезирующих, неадгезирующих миелокариоцитов, либо сыворотка крови по 0,05 мл смешивается в каждой лунке с 0,15 мл взвеси неприлипающих костномозговых клеток интактных мышей, содержащей в 1 мл 2×10⁵ жизнеспособных нуклеаров. Культуральная среда должна содержать 89% среды RPMI-1640, 10% инактивированной ЭТС, 50 мг/л

гентамицина, 280 мг/л L-глутамина, 1% метилцеллюлозы. Инкубация в вышеуказанных условиях длится 3 сут, после чего подсчитывается количество выросших колоний.

Параллельно ставят контрольное исследование, в котором в культуру (вместо тестируемого материала) добавляют стандартный препарат эритропоэтина в дозах 0,1; 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,25; 1,5; 1,75; 2,0; 3,0 МЕ/мл. На каждую точку исследования используют не менее 6 лунок. По результатам культивирования строится «калибровочная» кривая, по которой определяется содержание эритропоэтина в 1 мл тестируемого материала.

При отсутствии стандарта эритропоэтина эритропоэтическую активность можно выражать в условных единицах. Одна единица равна тому минимальному количеству (объему) тестируемого материала, который способен вызывать удвоение числа эритроидных колоний при стандартном количестве пассируемых клеток-мишеней.

Содержание эритропоэтина в исследуемом материале можно определять также с использованием метода иммуноферментного анализа (ИФА).

Специфическая активность препаратов, избирательно стимулирующих костномозговой гранулоцитопоэз, оценивается с использованием следующих показателей:

- определение в периферической крови общего количества лейкоцитов и их отдельных морфологических форм;
- подсчет общей клеточности костного мозга и миелограмм.

*5.2.3. Изучение способности костномозговых нуклеаров образовывать гранулоцитарные колонии в системе *in vitro* (определение эффективности клонирования КОЕ-Г) [6, 20]*

Концентрация жизнеспособных неприлипающих элементов доводится до 2×10^5 на 1 мл полувязкой культуральной среды следующего состава: 79% RPMI-1640, 500 ЕД/мл рекомбинантного гранулоцитарного КСФ, 1% метилцеллюлозы, 20% ЭТС, 280 мг/мл L-глутамина, 4 мкМ 2-меркаптоэтанола, 50 мг/л гентамицина. По 0,5 мл приготовленной клеточной взвеси помещают в 24-луночные планшеты и культивируют в течение 7 сут в CO_2 -инкубаторе при 37 °С, 5% CO_2 и 100% влажности воздуха. После инкубирования подсчитывают число выросших колоний и кластеров. Под колониями подразумевают образующиеся в полутвердой культуре клеточные агрегаты, содержащие более 50 кроветворных элементов, а под кластерами — от 5 до 50 клеток. С целью морфологического изучения колоний и кластеров готовят препараты, которые окрашиваются азур II-эозином.

5.2.4. Определение колониестимулирующей активности (КСА) в кондиционной среде, полученной от нестимулированных прилипающих, неприлипающих костномозговых нуклеаров и в сыворотке периферической крови [6, 20]

Кондиционные среды от прилипающих и неприлипающих миелокариоцитов получают описанным выше способом.

Тестирование КСА проводится микрометодом в 96-луночных планшетах. В каждую лунку вносят по 0,05 мл супернатантов от прилипающих, неприлипающих клеток костного мозга, либо сывороток периферической крови получавших исследуемое вещество животных. К ним прибавляют 0,15 мл взвеси жизнеспособных неадгезирующих миелокариоцитов (2×10^5 клеток/мл) интактных мышей в культуральной среде, состоящей из 80% среды RPMI-1640, 19% инактивированной ЭТС, 50 мкМ 2- меркаптоэтанола, 50 мг/л гентамицина, 280 мг/л L-глутамина. После культивирования в течение 7 сут в CO_2 -инкубаторе при 37 °С, 5% CO_2 и 100% влажности воздуха подсчитывают число выросших колоний, по которому судят об уровне КСА в исследуемых супернатантах.

В контрольной серии вместо тестируемого материала добавляют стандартный препарат Г-КСФ в дозах 25, 50, 75, 100, 125, 150, 175, 200 МЕ/мл.

По результатам культивирования строится «калибровочная» кривая, относительно которой пересчитывают количество МЕ активности на 1 мл тестируемого материала.

Уровень КСА можно определять в условных единицах. Одна единица равна тому минимальному количеству (объему) тестируемого материала, который способен вызывать удвоение числа гранулоцитарно-макрофагальных колоний при стандартном количестве пассируемых клеток-мишеней.

Содержание Г-КСФ (ГМ-КСФ, М-КСФ) в исследуемом материале можно определять также с использованием метода иммуноферментного анализа.

5.3. Рекомендации по объему экспериментальных исследований и обработке экспериментальных данных

Обязательным является проведение в полном объеме первого и второго этапа исследования.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводится стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрических и непараметрических критериев.

5.4. Формы представления экспериментальных данных

Результаты исследований представляются в форме, соответствующей требованиям уполномоченного федерального органа исполнительной власти.

5.5. Интерпретация результатов

Ускорение восстановления клеточности костного мозга с последующим возрастанием числа зрелых клеток в периферической крови после введения изучаемого вещества на фоне цитостатической миелосупрессии следует рассматривать как проявление гемостимулирующего эффекта у исследуемого препарата. Увеличение количества колониеобразующих единиц является признаком активации глубокого резерва кроветворения. Повышение уровней гуморальных факторов в супернатантах клеток костного мозга свидетельствует об опосредованном влиянии вещества на процессы костномозгового кроветворения.

Заключение

Соединениями, обладающими достаточной гемостимулирующей активностью, следует считать:

1) избирательно стимулирующие гранулоцитопоз — вещества, достоверно увеличивающие абсолютное содержание полиморфоядерных нейтрофильных гранулоцитов в периферической крови экспериментальных животных не менее чем на 150% от исходного уровня по сравнению с контролем (различные модели гемодепрессии) в период интенсивного восстановления кроветворения;

2) избирательно стимулирующие эритропоз — вещества, достоверно увеличивающие абсолютное содержание ретикулоцитов в периферической крови экспериментальных животных не менее чем на 150% от исходного уровня по сравнению с контролем в период интенсивного восстановления кроветворения;

3) «одновременно» стимулирующие несколько ростков гемопоэза — вещества, увеличивающие абсолютное содержание клеток нескольких ростков кроветворения в периферической крови экспериментальных животных не менее чем на 150% от исходного уровня по сравнению с контролем в период интенсивного восстановления кроветворения.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Алмазов В.А., Афанасьев Б.В., Зарицкий А.Ю., Шишков А.Л. Лейкопении. — Л.: Медицина, 1981. — 240 с.
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Роль гемопоэзиндуцирующего микроокружения в регуляции кроветворения при цитостатических миелосупрессиях. — Томск: СТТ, 1999. — 128 с.
3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др. Механизмы гемостимулирующего эффекта гранулоцитарного колоннестимулирующего фактора при цитостатическом воздействии // Бюлл. эксперим. биологии и медицины. — 1999. — Т. 128. — № 8. — С. 194–199.
4. Гольдберг В.Е., Дыгай А.М., Новицкий В.В. Рак легкого и система крови. — Томск: Изд-во ТГУ, 1992. — 236 с.
5. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. — Томск, 1992. — 264 с.
6. Гольдберг Е.Д., Новицкий В.В. Противоопухолевые антибиотики антрациклинового ряда и система крови. — Томск, 1986. — 240 с.
7. Гормонотерапия / Под ред. Х. Шамбах, Г. Кнаппе, В. Карола. — М.: Медицина, 1988. — 416 с.
8. Дементьева Л.А. Противоопухолевые свойства препаратов родиолы розовой: Автореф. дис. ... канд. биол. наук. — Томск, 1987. — 13 с.
9. Закенфельд Г.К. К механизму иммуностимулирующего действия зимозана // Неспецифические стимуляторы в иммунотерапии опухолей. — Рига, 1985. — С. 80–130.
10. Зуева Е.П. Коррекция препаратом подорожника некоторых нарушений гомеостаза, вызванных фторафуром в эксперименте // Актуальные проблемы фармакологии и поиска новых лекарственных препаратов. — Томск, 1984. — Т. 1. — С. 95–99.
11. Лабораторные методы исследования в клинике: Справочник / Под ред. В.В. Миньшикова. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
12. Николаев А.И., Алимов Р.А. Влияние некоторых стимуляторов кроветворения на противоопухолевую активность саркозила // Вопр. онкологии. — 1964. — № 10. — С. 78–81.
13. Павлов А.Д., Морщакова Е.Ф. Регуляция эритропоэза: Физиологические и клинические аспекты. — М.: Медицина, 1987. — 272 с.
14. Переводчикова Н.И. Противоопухолевая химиотерапия (Руководство по химиотерапии опухолевых заболеваний). — М.: Практическая медицина, 2005. — 704 с.
15. Сакаева Д.Д., Лазарева Д.Н. Клиническая фармакология в онкологии. — М.: ООО «Медицинское информационное агентство», 2007. — 336 с.
16. Barrios L., Poletti O.H. Effects of filgrastim on granulopoietic cells of mice pretreated with methotrexate // Biocell. — 2005. — Vol. 29. — № 1. — P. 7–14.
17. Iscove №., Sieber F. Erythroid progenitor in mouse bone marrow detected by macroscopic colony formation in culture // Exp. Hematol. — 1975. — Vol. 3. — P. 32–43.
18. Ford C.D., Greenwood J., Anderson J. et al. CD34+ cell adhesion molecule profiles differ between patients mobilized with granulocyte-colony-stimulating factor alone and chemotherapy followed by granulocyte-colony-stimulating factor // Transfusion. — 2006. — Vol. 46. — № 2. — P. 193–198.
19. Metcalf D. Haemopoietic colonies. — Berlin, 1977. — 227 p.
20. Metcalf D. Hematopoietic cytokines // Blood. — 2008. — Vol. 111. — № 2. — P. 485–491.
21. Nakajama R., Ishida Y., Yamaguchi F. et al. Beneficial effect of murostasin in experimental leukopenia induced by cyclophosphamide or irradiation in mice // Drug. Res. — 1988. — Vol. 38. — № 11. — P. 986–992.
22. Ogawa T., Takai T., Kato T. et al. Upregulation of the Release of Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor from Keratinocytes Stimulated with Cysteine Protease Activity of Recombinant Major Mite Allergens, Der f 1 and Der p 1 // Int. Arch. Allergy Immunol. — 2007. — Vol. 146. — № 1. — P. 27–35.
23. Okazaki T., Ebihara S., Asada M. et al. Granulocyte colony-stimulating factor promotes tumor angiogenesis via increasing circulating endothelial progenitor cells and Gr1+CD11b+ cells in cancer animal models // Int. Immunol. — 2006. — Vol. 18. — № 1. — P. 1–9.
24. Roberts A.W. G-CSF: a key regulator of neutrophil production, but that's not all! // Growth Factors. — 2005. — Vol. 23. — № 1. — P. 33–41.
25. Sasse E.C., Sasse A.D., Brandalise S. et al. Colony stimulating factors for prevention of myelosuppressive therapy induced febrile neutropenia in children with acute lymphoblastic leukaemia // Cochrane Database Syst. Rev. — 2005. — Vol. 3. — CD004139.

ГЛАВА 50

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ АНТИОКСИДАНТНОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: д. м. н., проф. В.Г. Макаров; к. б. н. М.Н. Макарова;
к. м. н. С.В. Буданов; к. х. н. В.П. Пахомов; Е.Ю. Демченкова; к. б. н. Н.М. Онацкий

Введение

В развитии многих патологических состояний важную роль играет избыточная продукция клеткой свободных радикалов, защиту от которой обеспечивает функционирование антиоксидантной системы (АОС) клетки.

Средствами профилактики и лечения заболеваний, связанных с усилением свободно-радикального окисления, являются природные антиоксиданты: аскорбиновая кислота, α -токоферол, β -каротин и современные синтетические антиоксиданты эмоксипин, мексидол, мексикор. Однако продолжается активный поиск фармакологических средств, обладающих антиоксидантной активностью.

Антиоксидантные свойства биологически активных веществ могут реализоваться по следующим механизмам: нейтрализация активных форм кислорода, обрыв цепных свободнорадикальных реакций, хелатирование ионов металлов переменной валентности, влияние на активность ферментов участвующих в генерации и нейтрализации свободных радикалов.

При изучении антиоксидантной активности фармакологических веществ целесообразно иметь в виду не только многообразие механизмов антиоксидантной активности, но и то, что роль каждого из них может существенно различаться при различных способах активации свободнорадикальных процессов, особенно в случае природных антиоксидантов, способных иметь одновременно несколько точек приложения. Механизм, который является действующим или доминирующим в конкретной ситуации, зависит от условий реакции и определяет выраженность антиоксидантной активности.

Оценка антиоксидантной активности фармакологических веществ должна включать в себя несколько этапов:

1. Скрининг биологически активных веществ – *in vitro* или *ex vivo* на моделях с генерацией определенного радикала как показатель антирадикальной активности.
2. Оценка антиоксидантной активности фармакологического вещества в различных тканях, сыворотке крови и эритроцитах при индукции свободнорадикальной патологии в условиях воспроизведения стандартных фармакологических моделей как показатель антиоксидантной активности.

1. Скрининг биологически активных веществ – *in vitro* или *ex vivo* на моделях с генерацией определенного радикала

Выбор адекватных интегральных методов оценки антиоксидантной активности, в том числе для проведения скрининга биологически активных веществ и препаратов, имеет первостепенное значение. Исследование препарата в «чистых» модельных системах с генерацией определенного типа радикалов либо специфических продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) позволяет получить дополнительную информацию о механизме его антиоксидантного действия.

1.1. Гидроксильный радикал ($\cdot\text{OH}$)

В эксперименте для регистрации образования гидроксильного радикала используют спектрофотометрические, хроматографические и флуоресцентные методы:

1. Спектрофотометрический метод с использованием 1,3-глутариламино-5-нитробензола, который под действием гидроксильного радикала окисляется до 1,3-глутариламино-2-окси-5-нитробензола. Оценка скорости образования $\cdot\text{HO}$ осуществляется по степени деструкции 2-дезоксид-Д-рибозы. Для генерации гидроксильного радикала используют суспензию нейтрофилов, стимулированную зимозаном или другим стимулятором. 2-дезоксид-Д-рибоза подвергается атаке $\cdot\text{OH}$ с образованием низкомолекулярных диальдегидов, концентрация которых выявляется по реакции с тиобарбитуровой кислотой, по оптической плотности растворов при длине волны 532 нм.

Вариантом данного метода является генерация гидроксильного радикала в реакции Фентон, в присутствии Fe^{3+} -ЭДТА комплекса, перекиси водорода и аскорбиновой кислоты. Образовавшийся гидроксильный радикал вызывает деструкцию дезоксирибозы при низких значениях рН, с образованием конечных продуктов, реагирующих с тиобарбитуровой кислотой. Регистрация результатов проводится аналогично, по продуктам деструкции 2-дезоксид-Д-рибозы.

2. Метод определения гидроксильного радикала, основанный на его способности образовывать гидроксильные производные ароматических молекул, например, образование 2,3- и 2,5-дигидроксидбензойной кислоты после введения салицилатов. Анализ продуктов реакции производят методом ВЭЖХ.

3. Метод с генерацией гидроксильного радикала в реакции Фентон и регистрацией его образования по изменению интенсивности флуоресценции. Дибутират флуоресцеина гидролизует в две стадии при участии гидролаз плазмы крови с образованием 2-(3, 6, 9-тригидрокси-9Н-9-ксантинил)-бензойной кислоты, которая является объектом атаки $\cdot\text{HO}$ радикалов. Под действием гидроксильных радикалов образуется хиноидная форма флуоресцеина, обладающая интенсивной флуоресценцией при $I_{\text{возб.}}$ 490 нм и $I_{\text{исп.}}$ 530 нм.

4. Еще одним флуориметрическим методом является использование терефталевой кислоты, которая при взаимодействии с гидроксильным радикалом окисляется до 2-гидроксидтерефталата, который обладает интенсивной флуоресценцией при $I_{\text{возб.}}$ 323 нм и $I_{\text{исп.}}$ 435 нм.

1.2. Супероксиданион радикал ($\text{O}_2\cdot^-$)

Генерацию $\text{O}_2\cdot^-$ в эксперименте осуществляют двумя типами методов — прямыми и непрямые. Прямые методы основаны на использовании физических способов генерации: фотолиз, радиолит, обработка ультразвуком. В непрямых методах используются окислительно-восстановительные реакции.

а) Наиболее распространенным методом генерации супероксиданион радикала является ксантин: ксантиноксидазная реакция. Ксантиноксидаза в присутствии кислорода воздуха катализирует реакцию окисления ксантина с образованием $\text{O}_2\cdot^-$. Супероксиданион радикал, вступая в реакцию с р-нитрофенилтетразолием хлоридом, образует окрашенное в красный цвет соединение формазан с $\lambda_{\text{погл.}}$ 540 нм. В качестве индикатора в этой реакции вместо р-нитрофенилтетразолия хлорида может быть использован цитохром С с $\lambda_{\text{погл.}}$ 550 нм.

б) Кроме того, для генерации супероксиданион радикала из кислорода используют реакции окисления НАД $\cdot\text{H}$ и рибофлавина.

Для регистрации образованного супероксиданион-радикала используют различные хромофоры. При этом субстанции индикатора или окисляются или восстанавливаются радикалами $\text{O}_2\cdot^-$ с образованием окрашенного продукта.

1.3. Перекись водорода (H_2O_2)

Перекись водорода взаимодействует с концентрированными растворами молибдатов с образованием иона пероксомолибдата, при этом образуется окрашенный комплекс с

максимумом поглощения при 410 нм. При добавлении в инкубационную систему вещества, способного нейтрализовать перекись водорода, оптическая плотность раствора снижается пропорционально активности исследуемого вещества.

1.4. Свободнорадикальные формы липидов (L^{\cdot} , LO^{\cdot} , LOO^{\cdot})

Современные знания механизма реакций цепного окисления липидов в большой мере связаны с открытием так называемого «сверхслабого свечения» хемилюминесценции (ХЛ), которое сопровождает эти реакции. При изучении кинетики хемилюминесценции обнаружился тесный параллелизм между скоростью реакции перекисного окисления липидов и интенсивностью хемилюминесценции.

Будучи прямым биофизическим методом определения липидных радикалов в мембранных системах клеток, метод ХЛ оказался адекватным и для определения уровня антиоксидантов в биологическом материале и антиоксидантной активности веществ.

В экспериментах *in vitro* используют различные инициаторы перекисного окисления липидов: металлы переменной валентности, α,α' -азобис (изобутиронитрил); 2,2'-азобис (2-амидинопропан) дигидрохлорид; 2,2'-азобис (2,4-диметилвалеронитрил); 2,2'-азобис (2,4-диметил-4-метоксивалеронитрил). Регистрация образования продуктов перекисного окисления липидов базируется в основном на определении концентрации гидроперекисей липидов, диеновых конъюгатов, малонового диальдегида (и др. продуктов реагирующих с 2'-тиобарбитуровой кислотой), а также конечных продуктов окисления липидов.

1.5. Перекиси липидов

Этот параметр отражает общее содержание гидроперекисей и содержание кислорода в перекиси липидов. Поскольку гидроперекиси — первичные продукты ПОЛ и играют центральную роль в дальнейшем аутоокислении липидов, изучение влияния антиоксидантов на образование гидроперекисей может рассматриваться как важнейший метод оценки антиоксидантной или антирадикальной активности того или другого антиоксиданта.

А. Одним из методов определения перекисей является *йодометрическое титрование*, в основе которого лежит определение свободного йода, образующегося в результате стехиометрического восстановления пероксидных групп йодид-ионом. Количество выделившегося свободного йода или трийодид иона определяют спектрофотометрически, измеряя поглощение при $\lambda = 380$ нм, либо титруя йод раствором тиосульфата (прямое титрование).

Б. Модификацией этого метода является *спектрофотометрическое определение* гидроперекисей липидов, при этом высокое значение коэффициента молярной экстинкции трийод иона ($\lambda_{\max} = 290$ и 360 нм) обеспечивает высокую чувствительность метода, однако не избавляет от низкой селективности.

В. *Железо-тиоцианатный метод* (тиоцианат анион) — гидроперекиси липидов определяют по индукционному периоду окисления линолевой кислоты. О накоплении перекисей липидов судят по изменению оптической плотности ($\lambda = 500$ нм) за счет образования тиоцианатного комплекса железа (III).

1.5.1. Диеновые конъюгаты

Определение диеновых конъюгатов имеет значительное преимущество для оценки ПОЛ, поскольку отражает раннюю стадию окисления. Обычным субстратом для определения диеновых конъюгатов выступает любое вещество, содержащее полиненасыщенные жирные кислоты.

Диеновые конъюгаты обладают поглощением в УФ-области ($\lambda = 232$ нм), коэффициент молярной экстинкции $21-24 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Пробоподготовка для анализа диеновых конъюгатов обязательно включает в себя экстрагирование липидов органическими растворителями.

А. Экстракция диеновых конъюгатов из сыворотки крови или ткани гептан-изопропанольной смесью, с последующим измерением оптической плотности в гептановой или изопропанольной фазе ($\lambda = 232-234$ нм).

Б. При анализе с использованием ВЭЖХ, установлено, что диеновые конъюгаты, образующиеся в организме человека, в основном представлены изомерами линолевой кислоты, октодека-9 (цис), 11(транс)-диеновой кислоты.

1.5.2. Продукты гомолитического распада, реагирующие с 2'-тиобарбитуровой кислотой (ТБК-РП)

Субстратом для данной реакции является малоновый диальдегид (МДА) и другие низкомолекулярные диальдегиды, который образуется в результате разрушения эндопероксидов полиненасыщенных жирных кислот.

МДА реагирует с 2'-тиобарбитуровой кислотой (ТБК) с образованием розового продукта с max поглощения 532–535 нм при pH менее 3 и нагревании (80–100 °С).

На сегодняшний день для этой модели используются разнообразные субстраты, включая биологические ткани и жидкости, линолевая и другие жирные кислоты, а также ЛПНП. Для запуска ПОЛ используют любые доступные инициаторы (Fe^{2+} , Cu^{2+} , ААРН, АМVN и пр.).

Для количественной оценки образовавшихся диальдегидов используются различные инструментальные методы.

Спектрофотометрический метод основан на определении оптической плотности образовавшегося хромогенного комплекса с 2'-тиобарбитуровой кислотой ($\lambda = 532\text{--}535$ нм). Также для этого метода предложены различные варианты пробоподготовки:

— определение МДА в нативной плазме крови, разделение водной и липидной фаз сыворотки крови достигается центрифугированием при 3000 об/мин, для дальнейшего определения используют супернатант;

— в гомогенате печени, после осаждения белков фосфорновольфрамовой кислотой;

— определение МДА в бутанольной фракции, где оптическую плотность хромогенного комплекса измеряют на двух длинах волн (535 и 580 нм), чтобы избежать мутности образцов.

Метод ВЭЖХ позволяет определять непосредственно сам МДА в сыворотке крови, однако данный метод требует предварительного гидролиза связанного МДА из его комплексов.

Флуориметрические методы для определения МДА, например, определение МДА-ТБК комплекса при $I_{\text{возб.}}$ 515 нм и $I_{\text{исп.}}$ 554 нм. Для образования флуоресцентных комплексов с МДА можно использовать 4,4-сульфонилданилин, этил-р-аминобензоат, р-аминобензойную кислоту, 4-аминоацетофенон.

Еще один метод для оценки ПОЛ — так называемый *ПОЛ-586 исследование*. Этот метод позволяет определить МДА и 4-гидроксиалкены, но не специфичен для этих групп. Хромофор образуется за счет конденсации альдегидов с N-метил-2-фенилиндолом, и обладает поглощением ($\lambda = 586$ нм). Метод может использоваться как альтернатива для метода определения ТБК–РП.

1.5.3. Измерение конечных продуктов

В процессе ПОЛ образуется сложная смесь, включающая эпоксиды, кетоны, углеводороды и насыщенные и ненасыщенные альдегиды типа гексаналь. Предложены различные методы оценки этих более или менее устойчивых конечных продуктов окисления.

1. Анизидиновый метод направлен на определение 2-алкенолов и сопровождается изменением концентрации анизидина, что может быть оценено спектрофотометрически.

2. Карбонильные компоненты (пентаналь, дека-2,4-диеналь и окта-3,5-диен-2-он), придающие липидам прогорклый запах, образуются за счет разложения первичных продуктов окисления 13-гидропероксидов из эфирных групп линолеата и вызывает образование вторичных продуктов: гексаналь, пентан, дека-2,4-диеналь и 4-гидроксиалкены типа 4-гидроксинон-2-еналь и другие в зависимости от типа жирных кислот, вступивших в реакцию, и способа их окисления.

1.6. Оценка восстанавливающей активности

Антирадикальные свойства многих веществ во многом обусловлены их способностью к легкой отдаче электронов, в связи с чем оценка восстанавливающей способности исследуемых соединений является одним из широко распространенных методов оценки антиоксидантной активности. Оценка восстанавливающей активности тех или иных соединений может проводиться по отношению к специфическим радикалам (ABTS^{•+} и DPPH), а также по неспецифическому восстановлению тех или иных субстратов.

К безсубстратным методам определения антирадикальной активности относят методы, основанные на использовании ABTS^{•+} и DPPH радикалов.

1.6.1. Использование ABTS^{•+} радикала

Методы основаны на ингибировании образования ABTS^{•+} радикального катиона без вовлечения субстрата. ABTS (2,2'-азинобис (3-этилбензотиазолин 6-сульфонат) имеет λ_{max} поглощения на 342 нм, хорошо растворим в воде и химически стабилен. Это — субстрат для пероксидазы, который может окисляться в присутствии H₂O₂ с образованием метастабильного радикального катиона с характерным спектром поглощения и высокой оптической плотностью на 660, 734 и 820 нм. Предложено два метода по оценке ингибирования ABTS^{•+}.

1. Формирование ABTS^{•+} протекает под действием коммерческой пероксидазы, при этом субстрат окисляется в присутствии H₂O₂ с образованием стабильного радикального катиона [28].

2. Другой вариант базируется на формировании ABTS^{•+} при взаимодействии ABTS с радикалом феррилмиоглобина, которому он отдает электрон, с дальнейшим образованием метмиоглобина и перекиси водорода. Антиоксиданты подавляют образование радикального катиона и снижают оптическую плотность исследуемого раствора при $\lambda = 734$ нм. При этом антиоксиданты нейтрализуют непосредственно радикальный катион, а не его образование, через нейтрализацию феррилмиоглобина или перекиси водорода.

1.6.2. Использование дифенилпикрилгидразил (DPPH) радикала

DPPH радикал имеет λ_{max} поглощения на 517 нм. В присутствии донора водорода 1,1-дифенил-2-пикрилгидразил восстанавливается с утратой специфической окраски.

1.6.3. Железо восстанавливающая активность (FRAP)

Метод основан на восстановлении Fe³⁺ в Fe²⁺. Для этой цели предложено несколько различных соединений, имеющих в своей структуре этот ион.

1. Метод базируется на восстановлении Fe³⁺ в комплексе трипиридилтриазина Fe(TPTZ)³⁺ до окрашенного в синий цвет комплекса Fe(TPTZ)²⁺ в присутствии антиоксиданта с восстанавливающими свойствами в кислой среде. Регистрация результатов проводится по увеличению оптической плотности $\lambda = 593$ нм.

2. Оценка восстанавливающей активности в реакции восстановления калия феррицианида. Калия гексаферрицианид K₃[Fe³⁺(CN)₆] в присутствии вещества, обладающего восстанавливающими свойствами, восстанавливается до K₄[Fe²⁺(CN)₆], взаимодействие которого с окисленной формой Fe²⁺ приводит к образованию окрашенного в синий цвет соединения Fe₄[Fe(CN)₆]₃. Изменение оптической плотности осуществляется при $\lambda = 700$ нм.

1.6.4. Оценка восстанавливающей активности в реакции восстановления цитохрома C

Коммерческий препарат цитохрома C, представляет собой ферментный препарат, получаемый путем экстракции из ткани сердца крупного рогатого скота и свиней. Оптическая плотность раствора цитохрома C ($\lambda = 550$ нм) отражает состояние активного центра

фермента, содержащего ион железа: коэффициент молярной экстинкции окисленной формы составляет $8400 \text{ моль}^{-1} \times \text{л} \times \text{см}^{-1}$, а коэффициент молярной экстинкции восстановленной формы составляет $29500 \text{ моль}^{-1} \times \text{л} \times \text{см}^{-1}$. Подобные изменения в спектральных характеристиках цитохрома С позволяют оценить восстанавливающую активность исследуемого образца.

1.6.5. Амперометрическое определение восстанавливающей активности образцов

Определение осуществляется на хроматографе с амперометрическим детектором и заключается в измерении электрического тока в ячейке, возникающего при окислении анализируемого вещества на поверхности рабочего электрода при подаче на него потенциала определенного значения. Измерение производится при постоянной величине потенциала на рабочем электроде (+1,3 В). Изменения электрического тока в ячейке в течение времени обрабатываются при помощи программного обеспечения, при этом регистрируют площадь под пиком (нАхс). Предел допускаемого значения относительного среднеквадратичного отклонения должен составлять не более 5%.

Методы оценки восстанавливающей активности достаточно простые и быстрые и не требуют сложного оборудования, однако восстанавливающая способность вещества не обязательно отражает его антиоксидантные свойства.

На заключительном этапе скрининга антиоксидантной активности вещества возникает вопрос о стандартах, которые бы позволили сравнить полученные в эксперименте результаты с антиоксидантной активностью известных антиоксидантов, а также с данными, представленными в литературе или в других лабораториях.

Среди наиболее распространенных показателей антиоксидантной активности можно выделить:

ТЕАС (trolox equivalent antioxidant capacity — антиоксидантная активность в эквивалентах тролокса). Тролокс (6-гидрокси-2,5,7,8-тетраметилхроман-2-карбоновая кислота), являясь водорастворимым аналогом токоферола, в настоящее время принят за стандарт для оценки антиоксидантной активности, и его активность принимается за 1,0.

Наравне с ним используются эквиваленты аскорбиновой кислоты и несколько реже — эквиваленты галловой кислоты.

Величина $S_{1/2}$ -концентрация антиоксиданта, при которой нейтрализуется половина свободных радикалов, образующихся в ходе реакции, — также является весьма удобной, особенно в случае индивидуальных соединений.

Используемый ранее показатель — % ингибирования — отражает долю, на которую снижается концентрация свободных радикалов в системе под действием антиоксиданта, но по этому показателю бывает трудно сравнить результаты, полученные по разным методикам или при разных концентрациях антиоксиданта.

2. Оценка антиоксидантной активности фармакологического вещества в различных тканях, сыворотке крови и эритроцитах при индукции свободнорадикальной патологии в условиях воспроизведения стандартных фармакологических моделей

Изучение характера изменений состояния основных звеньев АОС в различных тканях, сыворотке крови и эритроцитах при индукции свободнорадикальной патологии проводится в условиях воспроизведения стандартных фармакологических моделей.

В качестве таких моделей обычно используют: аллоксановый сахарный диабет, ССІ4 — повреждение печени, язвенное повреждение желудка (например, перевязка пилорического отдела желудка по Shay).

Далее в биологических жидкостях и тканях проводят оценку антиоксидантного статуса организма. При этом принято выделять три главных звена АОС:

— антирадикальные и антиперекисные ферменты (супероксиддисмутаза, каталаза, глутатионпероксидаза и другие пероксидазы);

— система глутатиона и связанных с ним биоантиоксидантов: глутатион (восстановленный и окисленный), ферменты, участвующие в его метаболизме (глутатион-S-трансфераза, глутатионредуктаза, глутатиондегидроаскорбатредуктаза), а также мочева кислота, аскорбиновая кислота и ее формы, токоферолы, полифенолы, каротиноиды, ретинол и др.;

— ферменты, участвующие в восстановлении NADP⁺ до NADPH (глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, декарбоксилирующая малатдегидрогеназа, изоцитратдегидрогеназа и др.).

Определение каталазной активности. Оценку активности каталазы осуществляют по скорости снижения концентрации перекиси водорода в инкубационной среде. Регистрация осуществляется спектрофотометрически при длине волны 230 нм.

Определение супероксиддисмутазной активности. Генерацию супероксиданион радикала осуществляют в ксантин-ксантинооксидазной реакции. Ксантинооксидаза в присутствии кислорода воздуха катализирует реакцию окисления ксантина с образованием O₂^{•-}. Супероксиданион-радикал вступая в реакцию с р-нитрофенилтетразолием хлоридом, образует окрашенное в красный цвет соединение формазан с max поглощения 540 нм.

Определение глутатионпероксидазной активности. Принцип метода: глутатионпероксидаза, используя в качестве кофермента восстановленный глутатион, катализирует восстановление гидроперекиси трет-бутила. Об активности глутатионпероксидазы судят по скорости убыли концентрации восстановленного глутатиона. После 5-ти минутной инкубации на водяной бане при t=37 °С реакцию останавливают 20% трихлоруксусной кислотой. Для регистрации оставшегося после реакции глутатиона к супернатанту в Трис-ЭДТА буфере (рН 8,5) добавляют реагент Элмана. Оптическую плотность каждой пробы измеряют против воды на спектрофотометре при длине волны 412 нм.

Определение активности фермента в сопряженной с глутатионредуктазой системе по скорости окисления НАДФН. Оптическую плотность каждой пробы измеряют против воды на спектрофотометре при длине волны 340 нм. При этом способе оценке не требуется использование реагента Элмана, а также возможен кинетический способ измерения.

Определение глутатионредуктазной активности. По мере восстановления окисленного глутатиона расходуется эквимольное количество НАДФН, скорость уменьшения концентрации которого регистрируют по снижению оптической плотности при длине волны 340 нм. Неспецифическую НАДФН-оксидазную активность учитывают с помощью холостой пробы, не содержащей глутатион.

Определение глутатион-S-трансферазной активности. Принцип метода: основан на оценке скорости ферментативного образования GS-2,4-динитробензола в реакции восстановленного глутатиона с 1-хлор-2,4-динитробензолом, водный раствор образующегося продукта имеет максимум поглощения при $\lambda = 340$ нм.

Определение глюкозо-6-фосфатдегидрогеназной активности. Метод основан на спектрофотометрическом определении количества восстановленного NADPH, образующегося при окислении глюкозо-6-фосфата в фосфоглюконолактон. По мере образования NADPH светопоглощение пробы при длине волны 340 нм возрастает.

Определение концентрации восстановленного глутатиона. Принцип метода основан на способности низкомолекулярных тиоловых соединений при взаимодействии с реактивом Элмана образовывать окрашенное соединение (тио-2-нитробензойная кислота), водный раствор которого имеет максимум поглощения при длине волны 412 нм.

Определение концентрации продуктов ПОЛ–ТБК-реагирующих продуктов. Принцип метода основан на реакции взаимодействия малонового диальдегида с тиобарбитуровой кислотой с образованием окрашенного продукта. Измерения проводят при длине волны 535 и 580 нм.

Заключение

Необходимо проводить оценку возможной антиоксидантной активности фармакологических веществ по отношению к нескольким свободным радикалам, учитывая, что различные активные формы кислорода играют свою роль как в патологических, так и физиологических процессах.

Многие модели генерации радикалов основаны на инициации реакции ионами металлов переменной валентности. С целью определения механизма антиоксидантной активности необходимо выяснять вклад хелатирующей способности антиоксиданта в его общую антиоксидантную активность.

Также важно выяснить, связан ли эффект антиоксиданта с эффектом ловушки свободных радикалов, или он опосредован влиянием на ферменты, их генерирующие.

Подбор модели, характера свободного радикала или инициаторов необходимо осуществлять исходя из природы исследуемого антиоксиданта, учитывая его гидрофильность и окислительно-восстановительный потенциал.

Для получения наиболее убедительных результатов в отношении состояния антиоксидантной системы в условиях фармакологической модели, а также с целью выявления взаимосвязи изменений в пораженном органе с интегральными показателями состояния антиоксидантной системы, может быть предложена оценка антиоксидантных ферментов и низкомолекулярных соединений не только в пораженной органе или ткани, но и в системных биологических жидкостях.

Литература

1. Арутюнян А.В., Дубинина Е.Е., Зыбина Н.Н. Методы оценки свободнорадикального окисления и антиоксидантной системы организма / Методические рекомендации. — СПб.: ИКФ «Фолиант», 2000. — 104 с.
2. Бурлакова Е.Б. Биоантиоксиданты вчера, сегодня, завтра. В кн. Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. М.: Химия, 2006. — С. 10–45.
3. Владимиров Ю.А. Свободные радикалы в биологических системах // Соросовский образовательный журнал, 2000. — Т. 6, № 12. — С. 13–19.
4. Гаврилов В.Г., Гаврилова А.Р., Хмара Н.Ф. Измерение диеновых конъюгатов в плазме крови по УФ-поглощению гептановых и изопропанольных экстрактов // Лаб. дело, 1988. — № 2. — С. 60–63.
5. Дремина Е.С., Шаров В.С., Владимиров Ю.А. Определение антиоксидантной активности биологических и лекарственных препаратов: методологические аспекты // Пульмонология, 1995. — № 1. — С. 73–75.
6. Коркина Л.Г., Величковский Б.Т., Черемисина З.П. и др. Скрининг препаратов, обладающих свойствами антиоксидантов и хелаторов // Вестник Фармакологического комитета, 1999. — № 2. — С. 13–14.
7. Макарова М.Н., Макаров В.Г., Зенкевич И.Г. Антирадикальная активность флавоноидов и их комбинации с другими антиоксидантами // Фармация, 2004. — № 2. — С. 30–32.
8. Смирнов Л.Д. Структура, фармакологические свойства и медицинское применение гетероароматических антиоксидантов. В кн.: Химическая и биологическая кинетика. Новые горизонты. М.: Химия, 2006. — С. 102–127.
9. Фридович И. Радикалы кислорода, пероксид водорода и токсичность кислорода. В кн.: Свободные радикалы в биологии / под ред. акад. Н.М. Эмануэля. — М., 1979. — Гл. 6. — С. 272–284.
10. Эмануэль Н.М. // Изв. АН СССР. Сер. Биол., 1974. — С. 773.
11. Antolovich M., Prenzler P.D., Patsalides E., McDonald S., Robards K. Methods for testing antioxidant activity // The Analyst., 2002. — Vol. 127. — P. 183–198.
12. Brown J.E., Khodr H., Hider R.C., Rice-Evans C.A. Structural dependence of flavonoid interaction with Cu^{2+} ions: implication for their antioxidant properties // Biochem. J., 1998. — Vol. 330. — P. 1173–1178.
13. Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., van Poel B. et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers // J. Nat. Prod., 1998. — Vol. 61. — P. 71–76.
14. Draper H.H., Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation // Methods in enzymology, 2000. — Vol. 186. — P. 421–431.

15. Ek M., Gierer J., Yansbo K. et al. Study on selectivity of bleaching with oxygen-containing species // *Holzforschung*, 1989. — Vol. 43, №6. — P. 391–396.
16. Halliwell B., Gutteridge J.M. Formation of thiobarbituric-acid-reactive substance from deoxyribose in the presence of iron salts: the role of superoxide and hydroxyl radicals // *FEBS Lett.*, 1981. — Vol. 128, № 2. — P. 347–352.
17. Kang M.Y., Tsuchiya M., Packer L., Manabe M. *In vitro* study on antioxidant potential of various drugs used in the perioperative period // *Acta Anaesthesiol Scand.*, 1998 — Vol. 42. — P. 4–12.
18. Krasowska A., Rosiak D., Szkapiak K., Lukaszewicz M. Chemiluminescence detection of peroxy radicals and comparison of antioxidant activity of phenolic compounds // *Current Topics in biophysics.*, 2000. — Vol. 24, № 920. — P. 89–95.
19. Moimi H., Arroyo A., Vaya J., Packer L. Bioflavonoids effects on the mitochondrial respiratory electron transport chain and cytochrome c redox state // *Redox Report.*, 1999. — Vol. 4, № 1/2. — P. 35–41.
20. Noguchi №., Yamashita H., Goton № et al. 2,2'-azobis (4-methoxy-2,4-dimethylvaleronitrile), a new lipid-soluble azo initiator: application to oxidations of lipids and low-density lipoproteins in solution and aqueous dispersions // *Free rad. boil & med.*, 1998. — Vol. 24, № 2. — P. 259–268.
21. Pick A., Keisari Y. Superoxide anion and hydrogen peroxide production by chemically elicited peritoneal macrophages // *Cellular. Immunol.*, 1981. — Vol. 59. — P. 301–308.
22. Saran M., Michel C., Steumaier K., Bors W. Arguments Against the Significance of the Fenton Reaction Contributing to Signal Pathways Under *in vivo* Conditions // *Free Red. Res.*, 2000. — Vol. 33. — P. 567–579.
23. Singh S., Hider R.C., Colorimetric detection of the hydroxyl radical: comparison of hydroxyl radical generating ability of various iron complexes // *Anal.Biochem.*, 1998. — Vol. 171. № 1. — P. 47–54.
24. Sugihara №., Arakawa T., Ohnishi M., Furuno K. Anti- and pro-oxidative effects of flavonoids on metal-induced lipid hydroperoxide-dependent lipid peroxidation in cultured hepatocytes loaded with alpha-linolenic acid // *Free Radic. Biol. Med.*, 1999. — Vol. 27, № 11–12. — P. 1313–1323.
25. Tubaro F., Ghiselli A., Rapurri P., Maiorino M., Ursini F. Analysis of plasma antioxidant capacity by competition kinetics // *Free Radical Biology & Medicine.*, 1998. — Vol. 24, № 7/8. — P. 1228–1234.
26. Valkonen M., Kuusi T. Spectrophotometric assay for total peroxy radical-trapping antioxidant potential in human serum // *J. Lipid Res.*, 1997. — Vol. 38. — P. 823–833.

ГЛАВА 51

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИЗУЧЕНИЮ СПЕЦИФИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ДЛЯ РЕГЕНЕРАТИВНОЙ МЕДИЦИНЫ

*Составители: д. м. н., проф., академик РАМН А.М. Дыгай; д. м. н. Г.Н. Зюзьков;
д. м. н., проф. В.В. Жданов; д. м. н. Е.В. Удут; д. м. н. Т.Ю. Хричкова;
к. м. н. Л.А. Мирошниченко; к. м. н. Е.В. Симанина; к. м. н. Л.А. Ставрова*

Введение

Важным звеном патогенеза дегенеративных заболеваний является низкая степень реализации собственного регенераторного потенциала поражаемых патологическим процессом тканей. При этом способность к самоподдержанию и пластичность стволовых клеток (СК) взрослого организма [1, 5, 23] определяют возможность проведения клеточной терапии путем фармакологической стимуляции функций прогениторных элементов [5, 7, 10–12, 21]. СК *in situ* способны к длительному пребыванию в покоящемся состоянии (фазе G0 клеточного цикла), а при активации — к самовоспроизведению с сохранением мультипотентности, либо асимметричному делению, когда одна из дочерних клеток сохраняет свои дифференцировочные потенции, а другая коммитируется в одном из направлений. Наиболее значительной и мобильной популяцией данных клеточных элементов в организме являются мезенхимальные СК костного мозга [1, 5, 8, 12, 28, 29]. Прогениторные клетки под воздействием определенных внешних либо внутренних стимулов способны покидать свою «нишу» и выходить в периферическую кровь. При этом под влиянием хемоаттрактантов, продуцируемых клетками поврежденных органов, и в результате повышенной экспрессии ими факторов адгезии может происходить «оседание» мобилизованных СК в зоне поражения с дальнейшей реализацией их ростового потенциала [5, 12, 13, 15, 21, 24, 30, 31]. При этом регенерация может осуществляться не только за счет тканеспецифичной дифференцировки мигрировавших прогениторных клеток, но и являться следствием их развития в элементы микроокружения, опосредованно ускоряющие течение восстановительных процессов [5, 12]. Кроме того, важное значение для компенсации нарушений деятельности «органов-мишеней» играет состояние пула регионарных клеток-предшественников, также обладающих достаточно высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом [12, 14, 26]. Таким образом, весьма перспективными можно считать разработку и изучение потенциальных ЛС, обладающих способностью воздействовать на клетки-предшественники различных классов. В связи с этим становится актуальной проблема единого подхода к качественной и достоверной оценке эффективности разрабатываемых средств — модификаторов функций прогениторных клеток для регенеративной медицины. При этом следует отметить, что наиболее физиологичным фармакологическим подходом к решению задач регенеративной медицины является стимуляция эндогенных СК, основанная на принципе подражания деятельности естественных регуляторных систем [11, 12].

1. Общие положения

Стволовые клетки — недифференцированные клеточные элементы, способные к длительному самоподдержанию, асимметричному делению, миграции и обладающие высоким пролиферативным и дифференцировочным потенциалом.

Прогениторные клетки — гетерогенная группа клеток-предшественников, включающая в себя стволовые клетки и их частично детерминированные и коммитированные производные.

Мезенхимальные стволовые клетки — исторически сложившийся термин, подразумевающий мультипотентные стволовые клетки, не отражает происхождение и ограниченную возможность гистогенетического развития лишь в мезенхимальном направлении.

Регионарные стволовые клетки — резидентные стволовые клетки органов и тканей.

Потентность — спектр возможных направлений дифференцировки СК.

Пролиферация — процесс деления, размножения клеток.

Дифференцировка — процесс реализации генетически обусловленной программы формирования специализированного фенотипа клеток, отражающего их способность к профильным функциям.

Самоподдержание — образование в процессе деления себе подобных клеток.

Хоминг — процесс миграции клеток, сопровождающийся их «приживлением» в ткани с возможностью реализации своего ростового потенциала.

Тканевое микроокружение — система клеточных элементов и внеклеточного матрикса тканей, осуществляющая жизнеобеспечение и контроль над функционированием стволовых и зрелых паренхиматозных клеток посредством межклеточных взаимодействий и гуморальных факторов.

Колониеобразующие единицы — клетки-предшественники, способные в определенных условиях формировать колонии, в которых все элементы являются потомками одной клетки.

Регенеративная медицина — раздел медицины, предусматривающий деятельность, направленную на восстановление пораженных органов и тканей организма путем использования свойств эндогенных и/или экзогенных прогениторных клеток.

Дегенеративные заболевания — хронические заболевания, при которых дистрофические и другие виды патологических изменений в тканях сопровождаются нарушением их способности к восстановлению и компенсации в результате недостаточной реализации собственного регенераторного потенциала.

2. Цели и задачи исследования. Основные этапы исследования

Целью исследования является оценка способности веществ повышать степень реализации регенераторного потенциала поврежденных тканей организма путем стимуляции функций прогениторных клеток.

Задачи исследования:

— оценить фармакологические эффекты препарата в отношении клеток-предшественников;

— исследовать влияние фармакологического агента на механизмы регуляции функций прогениторных клеток;

— оценить терапевтическое действие потенциального ЛС.

Основными этапами исследования являются:

— целенаправленный скрининг потенциальных средств для регенеративной медицины — модификаторов функций прогениторных клеток;

— углубленное изучение специфической активности средств для регенеративной медицины;

— изучение фармакологического действия средств для регенеративной медицины на механизмы регуляции функций прогениторных клеток.

3. Рекомендуемые тесты и биологические модели

Для оценки специфической активности в отношении родоначальных элементов обязательным является использование культуральных методов. Данные методы дают наиболее достоверную информацию о состоянии пула прогениторных элементов в ис-

следуемом материале, так как основаны на их обнаружении путем выявления клеток, обладающих характерными исключительно для предшественников биологическими свойствами. Отражают функциональный характер понятий «стволовость» и «прогениторные клетки» [12, 23], являются высокочувствительными и относительно простыми методами.

Для уточнения популяционного состава прогениторных клеток, углубленного изучения механизмов их регуляции, характеристики функционального состояния родоначальных элементов и клеток микроокружения тканей возможно дополнительное использование методов проточной цитометрии, клеточного сортирования, гисто- и цитохимических методов, иммуноферментного анализа и др.

Изучение экспериментальной терапевтической эффективности средств проводится в соответствии с методическими рекомендациями «Руководства по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», ограничиваясь с учетом предполагаемой области применения наиболее информативными функциональными тестами, морфологическими и биохимическими методами. При этом в качестве моделей патологических состояний используют не менее двух моделей дегенеративных и/или хронических заболеваний: хронический токсический гепатит и начальные стадии цирроза [17], вызываемые курсовым введением тетрахлоруглерода, либо тетрахлоруглерода совместно с алкоголем; сахарный аллоксановый диабет [3, 4, 20]; постгипоксическая энцефалопатия [14, 15]; постинфарктный кардиосклероз [16, 22] и др.

4. Условия проведения исследования

Исследования проводятся в лабораторных условиях в экспериментах *in vitro* и *in vivo*.

К исследованию принимаются идентифицированные и/или стандартизованные вещества (субстанции и/или лекарственные формы) и/или смесь веществ со следующими известными характеристиками:

- методы получения;
- условия растворимости (водорастворимые, жирорастворимые);
- подлинность.

5. Оборудование, инструменты и реактивы

Стерильное боксированное помещение, ламинарный шкаф, микроскоп прямого света, инвертированный микроскоп с системой визуализации; термостат, CO₂-инкубатор, холодильная установка ультранизких температур, система тонкой очистки воды, микротом, криостат, биохимический анализатор, центрифуга, весы, стандартизованные и сертифицированные для лабораторных исследований культуральные среды и дополнительные компоненты к ним, культуральная посуда, а также другие приборы и реактивы, определяемые задачами конкретного исследования и используемого метода (клеточный сортер, счетчик для ИФА и т.д.).

6. Растворители и разбавители

Определяются известными к началу эксперимента характеристиками вещества. Данные средства служат контрольными веществами при проведении экспериментов.

7. Дозы, пути, режимы введения и продолжительность исследования

Определяются индивидуально, в зависимости от известных к началу эксперимента свойств вещества, этапа и метода исследования.

Исследование состояния пула прогениторных элементов при введении веществ *in vivo* проводят у контрольных и получающих исследуемое вещество животных в динамике в период с 1 по 10 сутки (не менее 3 сроков наблюдения) после начала введения веществ. Оптимальными являются 3, 5 и 8-е сутки, позволяющие с наибольшей вероятностью регистрировать изменения функций родоначальных клеток. Сроки изучения

терапевтической эффективности средств определяются индивидуально в зависимости от периода морфофункционального восстановления «органа-мишени».

8. Экспериментальные животные

Линейные конвенциональные либо свободные от патогенной флоры мыши, а также линейные и/или беспородные крысы и другие животные, рекомендуемые настоящим руководством, с учетом предполагаемой области применения вещества.

9. Рекомендации по выбору препарата сравнения

Определяются известными к началу эксперимента характеристиками вещества. При этом при проведении экспериментов по изучению прямого влияния веществ на функции прогениторных клеток в системе *in vitro* наиболее часто используют раннедействующие факторы роста (фактор стволовой клетки, фактор роста фибробластов). При исследовании мобилизующего СК действия вещества в качестве препарата сравнения обязательно применяют Г-КСФ. Изучение экспериментальной терапевтической эффективности средств для регенеративной медицины допускается в сравнении с препаратами, рекомендуемыми настоящим руководством, с учетом предполагаемой области применения вещества.

10. Описание эксперимента и особенностей его проведения (отдельно для каждой модели / метода в соответствии с этапами исследования)

10.1. Первый этап

Целью первого этапа исследований является обнаружение специфической активности веществ в отношении мезенхимальных и органоспецифичных прогениторных клеток в системе *in vitro*.

Задачи исследования соответствуют названиям отдельных методов, которые в совокупности позволяют относительно быстро и наиболее достоверно провести скрининг веществ с выявлением потенциальных средств для регенеративной медицины.

10.1.1. Оценка специфической активности веществ по действию на мезенхимальные клетки-предшественники костного мозга (определение влияния на эффективность колониеобразования из фибробластных колониеобразующих единиц (КОЕ-Ф) *in vitro* [9])

Тип клеток определяется простотой техники их культивирования и важной ролью мезенхимальных прогениторных элементов микроокружения различных тканей в обеспечении репаративных процессов.

Бедренная кость мыши стерильно выделяется (в условиях ламинар-бокса), очищается от мягких тканей, после чего костный мозг из кости асептически эксплантируется и суспендируется в среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Затем миелокарициты дважды отмываются центрифугированием. В случае высокого содержания эритроцитов в клеточном материале, его разделяют на градиенте плотности с использованием препарата Ficoll-Paque, Histo-Paque, либо специально приготовленного раствора фиколл-гипака (плотность 1,066–1,077 г/см³). Образующийся при центрифугировании (3000 об/мин, 20 мин) интерфазный слой (содержит прогениторные клетки) собирают, отмывают и используют в дальнейшей работе. Концентрация жизнеспособных костномозговых нуклеаров доводится до 5×10⁵ /мл полувязкой среды следующего состава: 79% среды DMEM, 1% метилцеллюлозы, 20% ЭТС, 8000 МЕ/л гепарина, 280 мг/мл L-глутамина, 50 мг/л гентамицина (все компоненты культуральной среды предварительно тестируются). В полученную среду вносят различное количество исследуемого вещества. По 0,5 мл приготовленной взвеси клеток в среде, содержащей в различной концентрации (не менее 8 вариантов) тестируемую субстанцию, помещают в 24-луночные пластиковые планшеты и инкубируют в течение 7 сут в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂ и 100% влаж-

ности воздуха. На каждое разведение исследуемого вещества используют не менее 6 лунок. После инкубации подсчитывают количество выросших КОЕ-Ф и кластеров (КлОЕ-Ф). Под колониями подразумевают образовавшиеся в культуре очаги мезенхимопоэза, содержащие более 50 фибробластоподобных элементов, а под кластерами — от 5 до 50 клеток. С целью морфологического изучения колоний и кластеров готовят цитологические препараты, которые окрашивают гематоксилин-эозином.

10.1.2. Оценка специфической активности веществ по действию на печеночные клетки-предшественники in vitro [17]

Выбор типа клеток связан с относительной простотой метода культивирования печеночных прогениторных элементов при схожести характера их реакций на внешние факторы с таковым большинства других регионарных/тканеспецифичных клеток-предшественников, а также их высокой чувствительностью к различным стимулам.

Ткань печени (взятая в условиях ламинар-бокса) помещается в среду следующего состава: 89% DMEM, 10% инактивированной ЭТС, 6 г/л глюкозы, 280 мг/л L-глутамина, 50 мг/л гентамицина, 8000 МЕ/л гепарина, 10 мг/л инсулина. Затем материал гомогенизируется и фильтруется через капроновую сетку для удаления крупных агрегатов клеток. Полученная взвесь суспендируется, дважды отмывается центрифугированием, после чего подсчитывается общее количество жизнеспособных нуклеаров. В случае высокого содержания эритроцитов в клеточном материале, его разделяют на градиенте плотности вышеописанным способом. После этого клетки помещаются в питательную среду того же состава, с добавлением 10 нг/мл фактора роста стволовых клеток. Концентрация клеточных элементов доводится до 2×10^5 /мл и по 0,5 мл приготовленной взвеси, содержащей в различной концентрации (не менее 8 вариантов) тестируемую субстанцию, помещают в пластиковые 24-луночные планшеты. Культуру инкубируют в течение 10 сут в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывают число колоний. Под колониями подразумевают круглое либо неправильной формы свободно плавающее образование, содержащее более 50 клеток. С целью морфологического изучения колоний готовят цитологические препараты, которые окрашивают гематоксилин-эозином.

В случае заранее определенного «органа-мишени» фармакологического вещества возможно проведение исследования влияния тестируемого вещества сразу в отношении клеток-предшественников конкретной ткани. Для этого используются культуральные методы [15–20].

10.2. Второй этап

Целью второго этапа является обязательное исследование терапевтических эффектов вещества и механизмов их развития, связанных с отдельными популяциями прогениторных клеток.

Задачи исследования соответствуют названиям конкретных методов.

10.2.1. Исследование механизмов развития терапевтических эффектов, связанных с реализацией ростового потенциала прогениторных клеток

Используемые культуральные методы позволяют в условиях *in vivo* вскрыть роль регионарных тканеспецифичных предшественников и мультипотентных МСК «тканей депо» в регенерации поврежденных органов. При этом изучение состояния пула МСК ограничивается исследованием их содержания в костном мозге, как наиболее мобильной популяции данных элементов в организме.

10.2.1.1. Исследование содержания коммитированных мезенхимальных клеток-предшественников (КОЕ-Ф)

В состав популяции данных клеточных элементов помимо коммитированных стромальных прекурсоров входят истинные (мезенхимальные) стволовые клетки [5, 21].

Исследование проводят в период с 1 по 10 сутки после введения веществ (не менее 3 сроков). Оптимальными являются 3, 5 и 8-е сутки, позволяющие с наибольшей вероятностью регистрировать максимальные изменения функций родоначальных клеток.

Получение взвеси клеток костного мозга (5×10^5 /мл), их культивирование и подсчет количества предшественников осуществляют у контрольных и получающих исследуемое вещество животных вышеуказанным способом (п. 10.1.1.).

10.2.1.2. Подсчет числа мезенхимальных стволовых клеток

Возможно проведение исследования лишь в один из сроков. При этом сопоставляется характер изменений данного показателя с таковым при изучении КОЕ-Ф.

Количество мезенхимальных стволовых клеток (МСК) определяется методом лимитирующих разведений при длительном культивировании клеточного материала [14, 21, 27].

Клетки костного мозга получают из бедренной кости вышеуказанным способом (п. 10.1). Затем их помещают в среду следующего состава: 89% DMEM, 10% ЭТС, 280 мг/л L-глутамин, 50 мг/л гентамицин, 8000 МЕ/л гепарина и 25 нг/мл фактора роста фибробластов и доводят до различной концентрации в 10-ти вариантах, от максимальной 10^6 /мл до минимальной 10^3 /мл. Каждый из вариантов разведения клеточного материала помещают в пластиковые, покрытые 1% желатином 96-луночные планшеты и инкубируют в течение 6 недель в CO_2 -инкубаторе при 37°C , 5% CO_2 и 100% влажности воздуха, со сменной среды 2 раза в неделю. После инкубации подсчитывают количество фибробластоподобных клеток в каждой лунке. При этом лунка, содержащая 10 и более клеток оценивается как положительная, а менее 10 — отрицательная. На основании полученных рядов «знаков», отражающих наличие или отсутствие родоначальных клеток в различных разведениях клеточного материала, определяют частоту встречаемости МСК с помощью обобщенной линейной модели для распределения Пуассона. Соответствие данных лимитирующих разведений одномерной модели Пуассона оценивается посредством линейной log-log регрессии. При этом теоретическая фракция отрицательных лунок μ_i распределяется как $\mu_i = \exp(-fx_i)$, где f — частота встречаемости МСК, x_i — количество клеток, высаженных в лунку [25, 27].

10.2.2. Определение содержания

мезенхимальных клеток-предшественников в периферической крови

Позволяет оценить мобилизующую прогениторные элементы активность веществ. Сроки соответствуют таковым в п. 10.2.1.1.

10.2.2.1. Исследование количества коммитированных мезенхимальных клеток-предшественников (КОЕ-Ф)

Периферическую кровь контрольных и получающих исследуемое вещество животных (в условиях ламинар-бокса) берут из шейных сосудов после частичной декапитации (шерсть на шее предварительно выстригается и область будущего разреза обрабатывается 70% спиртом) либо из ретроорбитального синуса с помощью стерильной пастеровской пипетки. Кровь собирают в центрифужную пробирку, содержащую 100 ЕД/мл гепарина, и получают лейкоконцентрат путем ее разделения на градиенте плотности. После этого полученный клеточный материал отмывают и используют в дальнейшей работе для клонирования КОЕ-Ф. Отличием процесса культивирования является дополнительная смена среды через 2 ч после начала инкубации, сопровождаемая удалением неприлипающих клеток из планшетов с помощью пипетки.

10.2.2.2. Подсчет мезенхимальных стволовых клеток

Для исследования используют клеточный материал интерфазного слоя. Исследуемую фракцию клеток помещают в 96-луночные планшеты, культивируют и производят анализ на основании полученных рядов «знаков», отражающих наличие или отсутствие родоначальных клеток в различных разведениях клеточного материала.

10.2.3. Изучение влияния веществ на состояние пула тканеспецифических клеток-предшественников

в «органах-мишенях» при моделировании патологических состояний

Выбор исследуемой ткани определяется органом, на восстановление структурно-функционального состояния которого будет направлено действие фармакологического средства. Оценивается суммарный эффект веществ в отношении регенераторного потенциала предполагаемого «органа-мишени», определяемый воздействием как на регионарные клетки-предшественники, так и родоначальные элементы «тканей-депо». Исследование проводят у контрольных и получавших исследуемое вещество животных. Сроки соответствуют таковым в п. 10.2.1.1.

10.2.3.1. Определение содержания нейральных стволовых клеток в головном мозге [14, 15, 26]

Нервная ткань для исследования (в условиях ламинар-бокса) берется из паравентрикулярной области больших полушарий головного мозга животных и помещается в 0,02% раствор ЭДТА, содержащий 1,25 г/л трипсина и 6 г/л глюкозы, и инкубируется в течение 10–15 мин при комнатной температуре (20–22 °С). После этого осуществляется диссоциация нервной ткани путем пипетирования инкубационной среды при помощи шприца через иглу диаметром 2 мм в течение 5–7 мин до получения взвеси нервных клеток. Полученная взвесь фильтруется через капроновую сеточку и дважды отмывается центрифугированием. Клетки помещаются в питательную среду DMEM, содержащую 6 г/л глюкозы, 280 мг/л L-глутамина, 50 мг/л гентамицина, 8000 МЕ/л гепарина, 10 мг/л инсулина и суспендируются. Затем подсчитывается количество жизнеспособных нуклеаров. После чего концентрацию живых клеточных элементов в среде того же состава, с добавлением 25 нг/мл фактора роста фибробластов (FGF-basic), доводят до 10^5 на мл и по 0,5 мл приготовленной взвеси помещают в пластиковые 24-луночные планшеты. Культуру инкубируют в течение 7 сут в CO_2 -инкубаторе при 37 °С, 5% CO_2 и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывают число колоний — нейросфер [5, 15, 26]. Под нейросферой подразумевают округлое образование, содержащее более 50 клеток. С целью идентификации элементов нейрального происхождения в колониях проводят цитоиммунохимическое исследование цитологических препаратов на нестин.

10.2.3.2. Определение количества клеток-предшественников в сердечной мышце [18, 22]

Сердце, извлеченное из грудной клетки (в условиях ламинар-бокса), дважды отмывается в физиологическом растворе. Затем сердечную мышцу измельчают с помощью ножниц и помещают на 10 мин в раствор ЭДТА, содержащий 1,25 мг/мл трипсина, при комнатной температуре. После этого материал диссоциируют до получения однородной клеточной взвеси, сначала путем пипетирования инкубационной среды при помощи шприца через иглу диаметром 2 мм в течение 5 мин, а затем с помощью гомогенизатора. Клеточный материал фильтруют через капроновую сеточку для удаления крупных агрегатов, дважды отмывают центрифугированием и подсчитывают общее количество жизнеспособных нуклеаров. Затем клетки помещают в среду следующего состава: 89% DMEM, 10% инактивированной ЭТС, 6 г/л глюкозы, 280 мг/л L-глутамина, 50 мг/л гентамицина, 8000 МЕ/л гепарина, 10 мг/л инсулина, 20 нг/мл фактора роста стволовых клеток, 25 нг/мл основного фактора роста фибробластов, 10 нг/мл эндотелиального фактора роста- β . Доводят концентрацию клеточных элементов до 2×10^5 /мл и по 0,5 мл приготовленной взвеси помещают в пластиковые 24-луночные планшеты. Инкубируют в течение 10 сут в CO_2 -инкубаторе при 37 °С, 5% CO_2 и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывают число колоний, содержащих веретеновидные клетки. Под колонией подразумевали образование, содержащее более 30 клеток. С целью идентификации специфических элементов и морфологического изучения колоний проинкубированный

клеточный материал окрашивают гематоксилином эозином и проводят цитоиммунохимическое исследование на кардиоспецифичный тропонин.

10.2.3.3. Изучение содержания стволовых клеток в поджелудочной железе [3, 4, 19, 20]

В стерильных условиях (ламинар-бокс) извлекают поджелудочную железу и отмывают ее в физиологическом растворе. Помещают в гомогенизатор с питательной средой DMEM, содержащей 5 ЕД/мл контрикала, и гомогенизируют до получения однородной клеточной взвеси при комнатной температуре. После этого клеточный материал фильтруют через капроновую сеточку для удаления крупных агрегатов и дважды отмывают центрифугированием. Подсчитывают общее количество жизнеспособных нуклеаров. Затем клетки помещают в среду следующего состава: 79% DMEM, 20% ЭТС, 10 г/л глюкозы, 500 мг/л L-глутамин, 50 мг/л гентамицин, 5000 МЕ/л гепарина, 10 мг/л инсулина, 10 нг/мл фактора роста стволовых клеток, 30 нг/мл эпидермального фактора роста, 10 нг/мл интерлейкина-6, 10 нг/мл фактора роста фибробластов. Доводят концентрацию жизнеспособных клеточных элементов до 2×10^5 /мл и по 0,5 мл приготовленной взвеси помещают в пластиковые 24-луночные планшеты. Инкубируют в течение 10 сут в CO₂-инкубаторе при 37 °С, 5% CO₂ и 100% влажности воздуха. После инкубации подсчитывают число многоклеточных ацинусоподобных образований. При необходимости проводят морфологическое (окрашивают гематоксилином — эозином) и цитохимическое исследование колоний.

10.2.3.4. Оценка содержания паренхиматозных клеток-предшественников в печени

Проводится по способу п. 10.1.2.

10.3. Третий этап

Целью третьего этапа исследований является изучение влияния веществ на механизмы регуляции функций прогениторных клеток.

Задачи исследования соответствуют названиям конкретных методов.

Результаты экспериментов позволяют вскрыть наиболее важные закономерности и механизмы развития специфических эффектов вещества на субклеточном и молекулярном уровнях организации.

10.3.1. Изучение влияния веществ на состояние пула клеток-предшественников различных классов у интактных животных

Проводится в соответствии с п. 10.2.1.

При этом проводится сопоставление результатов с данными экспериментов, выполненных при исследовании влияния веществ на прогениторные клетки при моделировании заболеваний (п. 10.2.1). Эксперимент позволяет выявить особенности реагирования клеток-предшественников, определяемые условиями моделей патологических состояний.

10.3.2. Изучение влияния веществ на содержание мезенхимальных клеток-предшественников (КОЕ-Ф)

в «органах-мишенях» на фоне моделирования патологических состояний

Эксперимент в совокупности с данными по терапевтической эффективности вещества (п. 10.2) и результатами исследования состояния пула паренхиматозных (тканеспецифичных) стволовых клеток в пораженном органе (п. 10.2.1) позволяет сделать заключение о роли предшественников тканевого микроокружения в течении репаративных процессов в условиях патологических состояний и при введении исследуемого вещества.

Культивирование и подсчет количества КОЕ-Ф осуществляют у контрольных и получавших исследуемое вещество животных вышеуказанным способом (п. 10.1.1).

10.3.3. Определение связывающей способности стромальных клеточных элементов микроокружения в отношении прогениторных элементов [2]

Данная характеристика клеток является интегральным показателем, отражающим совокупность функциональных свойств элементов микроокружения (экспрессия молекул адгезии, продукция гуморальных факторов хоминга), обеспечивающих процесс миграции и/или хоминга СК.

Получают адгезирующую фракцию клеток контрольной и получавшей исследуемое вещество групп путем удаления неприлипающих элементов после инкубации клеточного материала (5×10^6 клеток/мл) при 37°C , 5% CO_2 и 100% влажности в течение 45 мин в среде на основе RPMI-1640 или DMEM. Клетки интактных животных, в отношении которых исследуется данная активность, в концентрации 5×10^5 /мл наслаивают поверх адгезирующих стромальных элементов и инкубируют в CO_2 -инкубаторе при 37°C , 5% CO_2 и 100% влажности воздуха в течение 90 мин. Среду с не связавшимися клетками собирают и исследуют в тест-системе по стандартной методике клонирования соответствующих КОЕ. Контролем является изначальное количество клеток-предшественников в исследуемом материале. Связывающая способность стромальных клеток определяется по разности значений в контроле и числом КОЕ, которые не связались после их инкубации (при этом результаты трактуются по обратной зависимости от величины значений).

10.3.4. Определение адгезивных свойств клеток-предшественников [2, 6]

Проводится в отношении различных субстратов: клеточные элементы микроокружения тканей, компоненты экстрацеллюлярного матрикса, пластик и др. Метод позволяет выявить влияние вещества на экспрессию факторов адгезии клетками-предшественниками (в отношении определенных компонентов внеклеточного матрикса) и на основании результатов экспериментов п. 10.2.1 определить их значимость в развитии феноменов мобилизации и хоминга СК.

Предпочтительным является исследование способности родоначальных клеток связываться со стромой [6]. В качестве модели используют облученную дозой 20 Гр (гамма-излучение) культуру ткани (по отношению к которой изучают свойства), образующуюся после инкубации по способу п. 10.1.1 в течение 3–5 недель. Исследуемый клеточный материал (5×10^5 /мл) наслаивают поверх моделируемой стромы и инкубируют в CO_2 -инкубаторе при 37°C , 5% CO_2 и 100% влажности воздуха в течение 90 мин. Среду с не связавшимися клетками собирают и исследуют в тест-системе по стандартной методике клонирования соответствующих КОЕ. Контролем является изначальное количество клеток-предшественников в исследуемом материале. Средство родоначальных элементов с субстратом определяется по разности значений в контроле и числом КОЕ, которые не связались после их инкубации на смоделированной строме.

10.3.5. Оценка продукции факторов хоминга (хемотаксических факторов) прогениторных элементами клетками микроокружения тканей

Метод позволяет вскрыть роль изменения секреторной функции клеток микроокружения (продукция гуморальных факторов) под влиянием вещества в развитии феноменов мобилизации и хоминга СК (в зависимости от вида исследуемой ткани: «ткань-депо» СК либо ткань «органа-мишени» соответственно).

Клеточный материал (5×10^5 клеток/мл), содержащий прогениторные клетки, находящиеся в жидкой культуральной среде, помещают поверх предварительно подготовленной 1% агаровой среды, в которой находятся клеточные элементы тканей контрольных и получавших исследуемое вещество животных (2×10^6 клеток/мл). Полученную двухслойную культуру инкубируют в CO_2 -инкубаторе при 37°C , 5% CO_2 и 100% влажности воздуха в течение 24 ч. Затем путем отмывания с поверхности агаровой среды собирают неприлипающие клетки и исследуют в тест-системе по стандартной методике

клонирования соответствующих КОЕ. На основании регистрации разницы количества прогениторных элементов, содержащихся в клеточном материале до и после его помещения на агаровую среду, осуществляют подсчет мигрировавших в агаровую среду клеток-предшественников. При этом наличие прогениторных элементов определяется по способности клеточного материала к колониеобразованию. Количество мигрировавших клеток и продукцию факторов хоминга оценивают в условных единицах по формуле:

$$X = a - b;$$

где a — количество колоний выросших (в контроле) из неприлипающих элементов, полученных с поверхности агаровой среды, не содержащей клетки; b — количество колоний выросших из неприлипающих элементов, полученных с поверхности агаровой среды, содержащей клетки.

10.3.6. Определение продукции гуморальных факторов регуляции прогениторных элементов клетками микроокружения тканей и изучение содержания регуляторов в сыворотке крови [9]

Для получения кондиционной среды клеток взвесь элементов исследуемой ткани получавших исследуемое вещество и контрольных животных (5×10^6 клеток/мл) разделяют на адгезирующую и неадгезирующую фракции вышеуказанным способом (п. 10.3.3). Для получения супернатантов прилипающих нуклеаров среда с неадгезирующими элементами удаляется, а прилипающие клетки инкубируются в полной культуральной среде на основе DMEM или RPMI-1640 в течение 24 ч при 37°C , 5% CO_2 и 100% влажности воздуха. В случае изучения активности неприлипающих клеток удаляется адгезирующая фракция, концентрация неадгезирующих нуклеаров доводится до 2×10^6 /мл, после чего полученную взвесь инкубируют 24 ч в вышеуказанных условиях. По окончании инкубации в обоих случаях собирают кондиционные среды и хранят не более месяца при -20°C .

Для определения суммарной активности ростовых факторов в полученных супернатантах применяют тест-системы, в качестве которых используют культуры клеток соответствующих тканей [9].

Содержание отдельных гуморальных факторов в исследуемых биологических жидкостях определяют методом иммуноферментного анализа.

11. Рекомендации по объему экспериментальных исследований и обработке экспериментальных данных

Обязательным является проведение в полном объеме первого и второго этапа исследования. Третий этап проводится на усмотрение разработчиков препарата.

Статистическая обработка экспериментальных данных проводится стандартными методами вариационной статистики с использованием параметрических и непараметрических критериев.

12. Формы представления экспериментальных данных

Результаты исследований представляются в форме, соответствующей требованиям государственных органов регистрации ЛС.

13. Интерпретация результатов

Увеличение уровня колониеобразования исследуемого клеточного материала при введении вещества *in vivo* либо его добавлении *in vitro* следует расценивать как стимулирующее влияние агента на соответствующие предшественники. Возрастание содержания прогениторных элементов в периферической крови свидетельствует о мобилизации СК из «тканей-депо». При этом повышение количества СК в костном мозге свидетельствует о вовлечении в процесс компенсации поврежденных механизмов регенерации «глубокого

резерва». Интерпретация результатов экспериментов п. 10.3 проводится в сопоставлении с данными исследований первого и второго этапа в соответствии с рекомендациями, указанными при описании конкретного метода п. 10.3.

Вещество может быть отнесено к средствам для регенеративной медицины только в случае соответствия степени его влияния на прогениторные клетки с уровнем терапевтической эффективности (не менее чем на двух моделях патологических состояний), определяемой с помощью морфологических и/или биохимических методов и/или функциональных тестов.

Заключение

Средствами для регенеративной медицины — модификаторами функций прогениторных клеток, обладающими достаточной специфической активностью, следует считать:

1) избирательно стимулирующие регионарные прогениторные клетки — вещества, увеличивающие содержание тканеспецифичных колониеобразующих единиц в «органе-мишени» не менее чем на 150% от исходного уровня по сравнению с контролем (модели патологических состояний) в период, предшествующий морфо-функциональному восстановлению «органов-мишеней» (с доказанной терапевтической эффективностью не менее чем на двух моделях патологических состояний);

2) избирательно усиливающие выход мультипотентных стволовых клеток из «тканей-депо» в периферическую кровь, либо стимулирующие их мобилизацию на фоне повышения пролиферативной активности костномозговых МСК — вещества, увеличивающие содержание МСК в периферической крови не менее чем на 150% от контрольных значений (модели патологических состояний) в период, предшествующий ускорению регенерации пораженных тканей, и содержание МСК в костном мозге получавших исследуемое вещество животных на уровне не ниже исходного к окончанию периода морфо-функционального восстановления «органа-мишени» (с доказанной терапевтической эффективностью не менее чем на двух моделях патологических состояний);

Средствами для регенеративной медицины — модификаторами функций прогениторных клеток, обладающими высокой специфической активностью, следует считать одновременно стимулирующие костно-мозговые мультипотентные стволовые клетки, мобилизующие их из «тканей-депо» и повышающие функциональную активность регионарных прогениторных клеток — вещества, увеличивающие содержание МСК в периферической крови и число паренхиматозных колониеобразующих единиц в пораженных тканях не менее чем на 200% от соответствующих контрольных значений (модели патологических состояний) в период, предшествующий морфо-функциональному восстановлению «органа-мишени», и достоверно повышающие количество МСК и/или КОЕ-Ф в костном мозге в период регенерации (с доказанной терапевтической эффективностью не менее чем на двух моделях патологических состояний).

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. Современные взгляды на проблему стволовых клеток и возможности их использования в медицине // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2005. — № 4. — С. 184–199.
2. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В. и др. Участие мезенхимальных клеток-предшественников в заживлении ран на модели кожного лоскута // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2006. — № 3. — С. 132–134.

3. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В., Зюзков Г.Н. Механизмы терапевтических эффектов гранулоцитарного колониестимулирующего фактора при экспериментальном сахарном диабете // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2008. — № 4. — С. 230–233.
4. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Жданов В.В., Зюзков Г.Н. и др. Состояние пулов стволовых клеток при экспериментальном сахарном диабете // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2006. — № 3. — С. 123–126.
5. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзков Г.Н. Гипоксия и система крови. — Томск: Изд-во Том. ун-та, 2006. — 142 с.
6. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзков Г.Н., Жданов В.В. Механизмы мобилизации мезенхимальных клеток-предшественников гранулоцитарным колониестимулирующим фактором и гиалуронидазой // Бюл. эксперим. биол. и медицины. — 2007. — № 12. — С. 652–656.
7. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзков Г.Н., Жданов В.В. Формирование реакций системы крови под влиянием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора и гиалуронидазы // Бюл. эксперим. биол. и медицины. — 2008. — № 6. — С. 628–633.
8. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Зюзков Г.Н. и др. Роль гиалуронидазы в регуляции функций мезенхимальных клеток-предшественников // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2007. — № 2. — С. 115–119.
9. Гольдберг Е.Д., Дыгай А.М., Шахов В.П. Методы культуры ткани в гематологии. — Томск: Изд-во ТГУ, 1992. — 272 с.
10. Дыгай А.М., Верещагин Е.И., Зюзков Г.Н. и др. Мобилизация прогениторных клеток в кровь с помощью иммобилизованного гранулоцитарного колониестимулирующего фактора // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2009. — № 2. — С. 63–66.
11. Дыгай А.М., Зюзков Г.Н., Жданов В.В. и др. Регуляция функций прогениторных клеток с помощью гиалуронидазы // Вестник РАМН. — 2009. — № 11. — С. 6–9.
12. Патент (RU) на изобретение № 2330674 «Способ усиления мобилизации стволовых клеток».
13. Ставрова Л.А., Фомина Т.И., Плотников М.Б. и др. Фармакологическая регуляция функциональной активности стволовых клеток при восстановлении миокарда в постинфарктном периоде // Клеточные технологии в биологии и медицине. — 2005. — № 4. — С. 189–193.
14. Чертков И.Л., Дризе Н.И., Воробьев А.И. Схема кроветворения // Терапевтический архив. — 2005. — № 7. — С. 5–12.
15. Avigdor A., Goichberg P., Shvitiel S. e.a. CD44 and hyaluronic acid cooperate with SDF-1 in the trafficking of human CD34+ stem/progenitor cells to bone marrow // Blood. — 2004. — Vol. 103. — № 8. — P. 2981–2989.
16. Bonnefoix T., Bonnefoix P., Callanan M. e.a. Graphical representation of a generalized linear model-based statistical test estimating the fit of the single-hit poisson model to limiting dilution assays // J. Immunol. — 2001. — Vol. 167. — P. 5725–5730.
17. Gritti A., Bonfanti L., Doetsch F. e.a. Multipotent Neural Stem Cells Reside into the Rostral Extension and Olfactory Bulb of Adult Rodents // J. Neuroscience. — 2002. — V. 22. — P. 437–445.
18. In't Anker P.S., Noort W.A., Scherjon S.A. e.a. Mesenchymal stem cells in human second-trimester bone marrow, liver, lung, and spleen exhibit a similar immunophenotype but a heterogeneous multilineage differentiation potential // Haematologica. — 2003. — Vol. 88. — P. 845–852.
19. Minguell J.J., Erices A., Conget P. Mesenchymal stem cells // Experim. Biol. Med. — 2001. — Vol. 226. — P. 507–520.
20. Owen M., Friedenstein A.J. Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors // Ciba Found Symp. — 1988. — V. 136. — P. 42–60.
21. Takeyama K., Ohto H. PBSC mobilization // Transfus. Apheresis Sci. — 2004. — Vol. 31. — № 3. — P. 233–243.
22. Zhu H., Mitsuhashi N., Klein A. e.a. The Role of the Hyaluronan Receptor CD44 in Mesenchymal Stem Cell Migration in the Extracellular Matrix // Stem Cells. — 2006. — Vol. 24. — № 4. — P. 928–935.

ГЛАВА 52

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ АКТИВНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, ПОВЫШАЮЩИХ ФИЗИЧЕСКУЮ РАБОТОСПОСОБНОСТЬ

*Составители: д. м. н., проф. С.В. Чепур; д. м. н. проф. А.Э. Никитин;
д. м. н., доц. В.Н. Быков; к. м. н. А.А. Кузьмин; д. м. н., проф. В.А. Меркулов;
к. б. н. А.С. Насонов*

Введение

Физическая работоспособность является интегральным показателем состояния организма и лимитируется такими факторами, как мощность, емкость и эффективность механизмов энергопродукции аэробным и анаэробным путем; сила и выносливость мышц; нейромышечная координация; состояние опорно-двигательного аппарата и ЦНС. Аэробный механизм энергопродукции является основным при обеспечении выполнения длительных физических нагрузок умеренной интенсивности, а анаэробные механизмы — кратковременных нагрузок высокой интенсивности. В современной спортивной практике физические упражнения, в которых вклад анаэробных процессов (креатинфосфокиназный, гликолитический и миокиназный) составляет более 60% энергетического запроса, обычно относят к упражнениям анаэробного характера. Длительные физические нагрузки, где относительный вклад аэробного процесса в затратах энергии превышает 70%, относят к упражнениям аэробного характера. Упражнения, при которых аэробные и анаэробные процессы энергообеспечения имеют примерно равное значение, относятся к смешанным анаэробно-аэробным нагрузкам.

Несмотря на то, что в повседневной жизни и в профессиональной деятельности большинства людей задействована лишь небольшая доля их физических возможностей, физическая работоспособность является одной из основных составляющих качества жизни. Практически все заболевания вследствие различных причин приводят к снижению физической работоспособности, которое зачастую сохраняется даже после завершения периода реконвалесценции. Поэтому использование фармакологических веществ, повышающих физическую работоспособность (ФВПФР), может существенно ускорить процесс полного восстановления организма после перенесенного заболевания. Следует отметить, что в современных условиях жизнедеятельности человека, характеризующихся высоким уровнем урбанизации, а следовательно, гиподинамией и психо-эмоциональным напряжением, проблема снижения физической работоспособности является актуальной и для здоровых людей. В этом случае научно обоснованное использование ФВПФР в комплексе с дозированными физическими нагрузками позволит поддерживать организм в оптимальной физической форме.

К ФВПФР можно отнести вещества с различным химическим строением и механизмом действия. Настоящие методические рекомендации направлены на унификацию методов поиска ФВПФР, отбора наиболее перспективных препаратов и их углубленного исследования на этапе экспериментального (доклинического) изучения новых фармакологических веществ.

1. Первичная оценка фармакологического вещества, повышающего физическую работоспособность

Целью экспериментальных исследований, проводимых на этом этапе, является направленный скрининг изучаемых веществ по эффекту влияния на состояние физической работоспособности лабораторных животных и отбор ФВПФР, обладающих наиболее выраженным эффектом, для дальнейшего изучения. Эксперименты проводят на белых нелинейных крысах-самцах с массой тела 180–220 г.

Для скрининга используется экспериментальная модель бега крыс на тредмиле. Тредмил представляет собой прибор, состоящий из отсеков для размещения животных, каждый из которых имеет «бегущую дорожку» и электростимуляционную площадку. Тредмил может быть доукомплектован различными дополнительными устройствами и приспособлениями, которые позволяют в ручном или автоматическом режиме задавать параметры физической нагрузки и регистрировать временные показатели выполняемой животными физической работы, а также аналогово-цифровыми преобразователями (АЦП) и программным обеспечением для совместимости прибора с персональным компьютером. К таким устройствам относятся: блоки, регулирующие скорость движения ленты тредмила и угол ее наклона по отношению к горизонтали; блоки, регулирующие силу тока и частоту импульсов, подаваемых на электростимуляционную площадку; устройства для регистрации времени, проведенного животным на электростимуляционной площадке в течение теста.

В подготовительный период постановки эксперимента проводится подбор и подготовка животных, прошедших карантин, и предварительное обследование. Подготовка крыс состоит в их ежедневной тренировке, которая заключается в беге на тредмиле в течение 15 мин при скорости движения ленты 20 м/мин с углом наклона по отношению к горизонтали, равным 15°, на протяжении трех дней (по одной тренировке в день). Состояние физической работоспособности крыс оценивается по показателю ΦP , который рассчитывают как отношение времени выполнения бега к общему времени теста в % по формуле:

$$\Phi P = \frac{(T_{общ} - T_{пл})}{T_{общ}} \times 100,$$

ΦP — показатель физической работоспособности, %;

$T_{общ}$ — общее время теста, с;

$T_{пл}$ — время, проведенное животным на электростимуляционной площадке, с.

Исходные показатели работоспособности животных регистрируются в ходе контрольного тестирования на следующий день после трехдневной тренировки (четвертый день эксперимента). Животные, у которых на четвертый день не удастся выработать устойчивый навык бега на тредмиле, выбраковываются. Методом случайной выборки формируют три получающих исследуемое вещество (оценивают три дозы фармакологического вещества по одной группе животных на каждую) и 1 контрольную группу крыс. Число животных в группе должно быть не менее 10.

Выбор диапазона доз исследуемого вещества, если оно является известным фармакологическим препаратом, должен основываться на данных литературы о результатах экспериментальной оценки основного фармакологического эффекта этого препарата в исследованиях на лабораторных животных. В этом случае минимальная доза для оценки влияния исследуемого вещества на физическую работоспособность крыс будет соответствовать его терапевтической дозе (1 ТД) для данного вида животных, а максимальная — субтоксической дозе, которая на порядок превышает терапевтическую (10 ТД). В качестве промежуточной дозы используют пять терапевтических доз (5 ТД). В случае, когда исследуют новое вещество, реальная терапевтическая доза которого неизвестна, в качестве минимальной, промежуточной и максимальной используют дозы, равные 1/50, 1/20 и 1/10 от LD_{50} соответственно.

Исследуемое вещество, если оно является известным фармакологическим препаратом, вводят способом, который используют для клинического применения, однократно (на пятый день эксперимента) или курсом (начиная с пятого дня эксперимента). При однократном введении препарата контрольное тестирование животных проводят через 0,5–2 ч после введения (в зависимости от аппликации и фармакокинетики вещества), а затем через 6, 24, и 48 ч после введения оцениваемого вещества. При курсовом введении препарата (длительность курса до семи дней) контрольное тестирование животных проводят через 0,5–2 ч после каждого введения, а затем через 1 и 3 суток после окончания курса введения оцениваемого вещества. При курсовом введении препарата (длительность курса более семи дней) контрольное тестирование животных в течение курса проводят не реже двух раз в неделю через 0,5–2 ч после введения препарата, а также через 1 и 3 суток после окончания курса введения оцениваемого вещества.

В случае, когда исследуют новое вещество, его вводят способом, который предполагается для клинического применения, в одной серии экспериментов однократно (на пятый день эксперимента) и в другой серии экспериментов курсом (начиная с пятого дня эксперимента) ежедневно в течение пяти суток. При однократном введении препарата контрольное тестирование животных проводят через 0,5–2 ч после введения (в зависимости от аппликации и фармакокинетики вещества), а затем через 6, 24, и 48 ч после введения оцениваемого вещества. При курсовом введении препарата контрольное тестирование животных проводят ежедневно через 0,5–2 ч после первого введения препарата в этот день, а затем через 1 и 3 суток после окончания курса введения оцениваемого вещества.

Во всех случаях осуществляется наблюдение за животными, взятыми в эксперимент, на протяжении 14 суток с момента окончания введения исследуемого вещества.

Расчет средних величин показателя ΦP в группе проводится общепринятыми статистическими методами. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с исходным уровнем и с контролем используют непараметрические критерии, что объясняется отличным от нормального (экспоненциальным) распределением показателя ΦP .

Оцениваемый препарат считается перспективным ФВПФР для однократного применения, если по результатам тестирования выявлено достоверное увеличение показателя ΦP не менее чем в двух получающих исследуемое вещество группах животных (в двух оцениваемых дозах) относительно исходного уровня, а также относительно группы контроля на один из сроков тестирования. Препарат считается перспективным ФВПФР для курсового применения, если по результатам тестирования выявлено достоверное увеличение показателя ΦP не менее чем в двух получающих исследуемое вещество группах животных (в двух оцениваемых дозах) относительно исходного уровня, а также относительно группы контроля не менее чем на два срока тестирования подряд. В таком случае исследование препарата продолжается на этапе углубленного изучения, при этом для новых веществ определяется перспективность их однократного или курсового применения.

2. Углубленное изучение фармакологического вещества, повышающего физическую работоспособность

Основными задачами углубленного изучения перспективного ФВПФР являются:

- определение количественных характеристик активности ФВПФР по эффекту повышения работоспособности лабораторных животных при нагрузках аэробной и смешанной (на границе анаэробной и аэробной) мощности;
- оценка влияния перспективного ФВПФР на координацию движений мелких лабораторных животных;
- оценка влияния перспективного ФВПФР на функциональное состояние ССС (артериальное давление, частота сердечных сокращений);
- оценка влияния перспективного ФВПФР на функциональное состояние системы органов дыхания (показатели частоты дыхательных движений, минутного объема дыхания);

— выявление возможного негативного влияния перспективного ФВПФР на ориентировочно-исследовательскую и условно-рефлекторную деятельность лабораторных животных (модель умственной работоспособности человека).

Для проведения экспериментальных исследований методом случайной выборки формируют необходимое количество получающих исследуемое вещество животных (оценивают не менее трех доз фармакологического вещества — по одной группе животных на каждую дозу), 1 контрольную группу животных-самцов и такое же количество групп самок (для крыс число животных в группе не менее 10, для собак — не менее 4).

2.1. Определение количественных характеристик активности ФВПФР по эффекту повышения физической работоспособности лабораторных животных

2.1.1. Процедура тестирования лабораторных животных и обработки экспериментальных данных

ФВПФР вводят способом, который предполагается для клинического применения. На основании данных скринингового исследования препарат вводят однократно или курсом. При однократном введении препарата контрольное тестирование животных проводят через 0,5–2 ч после введения (в зависимости от аппликации и фармакокинетики вещества), а затем через 6, 24, и 48 ч после введения оцениваемого вещества. При курсовом введении препарата (длительность курса до семи дней) контрольное тестирование животных проводят ежедневно через 0,5–2 ч после первого введения препарата в этот день, а затем через 1, 3, 7 и 14 суток после окончания курса введения оцениваемого вещества. При курсовом введении препарата (длительность курса более семи дней) контрольное тестирование животных в течение курса проводят не реже двух раз в неделю через 0,5–2 ч после первого введения препарата в этот день, а также через 1, 3, 7 и 14 суток после окончания курса введения оцениваемого вещества.

Выбор диапазона доз исследуемого вещества должен основываться на данных скринингового исследования специфической активности вещества, при этом количество исследуемых доз должно быть достаточно для последующего расчета средней эффективной дозы препарата методом пробит-анализа по Финни.

Сравнение среднегрупповых показателей проводят с использованием непараметрических критериев. Для последующего расчета средних эффективных доз ФВПФР данные представляют в альтернативной форме. Наличие эффекта увеличения работоспособности отмечают у тех животных, индивидуальный показатель которых при контрольном тестировании превышает значение максимума (верхнего предела размаха как меры рассеяния признака) для этой экспериментальной группы, зарегистрированное при оценке исходного уровня работоспособности. Расчет средней эффективной дозы ФВПФР проводят методом пробит-анализа по Финни на пике активности вещества (для срока тестирования с максимальным увеличением работоспособности животных).

2.1.2. Определение количественных характеристик активности ФВПФР при нагрузках аэробной мощности в исследованиях на крысах

Эксперименты на крысах во всем исследуемом диапазоне доз, как при однократном, так и при курсовом введении ФВПФР, проводят по методике «Бег до отказа» и методике «МПК».

Методика «Бег до отказа». Для экспериментов на мелких лабораторных животных используют модель бега крыс на тредмиле до отказа. Подготовительный период постановки эксперимента аналогичен скрининговому исследованию. Исходным показателем работоспособности животных является время бега на тредмиле до отказа при скорости движения ленты 20 м/мин, которая увеличивается на 1 м/мин каждую последующую минуту теста, с углом наклона по отношению к горизонтали, равным 15°, регистрируемое в

ходе тестирования на следующий день после трехдневной тренировки. Оцениваемым показателем является время бега на тредмиле до отказа, регистрируемое в ходе контрольных тестирований в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

Методика «МПК». Для оценки влияния ФВПФР на состояние физической работоспособности крыс используют индекс максимального потребления кислорода (МПК). Установка для проведения экспериментальных исследований («Охутах») представляет собой комплекс оборудования, состоящий из герметичного тредмила и подсоединенного к нему газоанализатора. Расчет индекса МПК проводят прямым методом по результатам измерения содержания кислорода в выдыхаемом воздухе газоанализатором после выполнения животным ступенчато увеличивающейся физической нагрузки. Для дозирования физической работы, выполняемой животными, используют тредмил. За МПК принимают максимальное значение объема потребляемого кислорода (V_{O_2}), регистрируемое в процессе теста (V_{O_2} считается максимальным, если его значение после прироста изменяется не более чем на 5% при выполнении трех увеличивающихся по интенсивности нагрузок подряд). После достижения максимального значения V_{O_2} тест прекращается. Оцениваемым показателем является индекс МПК, регистрируемый в ходе контрольных тестирований в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

2.1.3. Определение количественных характеристик активности ФВПФР при нагрузках аэробной мощности в исследованиях на собаках

Физическую работоспособность на собаках оценивают по двум основным методикам: методике «Бег на тредмиле до отказа» и методике « PWC_{200} ». В подготовительный период проведения экспериментов в течение пяти дней у собак вырабатывают навык бега на тредмиле.

Методика «Бег на тредмиле до отказа» Бег на тредмиле со скоростью 5 км/час до отказа, количественный критерий оценки работоспособности — время бега до отказа, регистрируемое в ходе контрольных тестирований в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

Методика « PWC_{200} ». Двухступенчатая нагрузка на тредмиле разной мощности с отдыхом между нагрузками (модель велоэргометрии по критерию «physical work capacity» (PWC_{170}) для человека), количественный критерий оценки работоспособности — расчетная величина « PWC_{200} ».

2.1.4. Определение количественных характеристик активности ФВПФР при нагрузках смешанной (анаэробно-аэробной) мощности

Для экспериментов на мелких лабораторных животных используется модель плавания крыс с грузом до отказа. В подготовительный период постановки эксперимента крыс взвешивают и маркируют. Для оценки времени плавания используют емкость из органического стекла размером 20×20×80 см, наполненную водой, расстояние от поверхности воды до края емкости не менее 10 см.

Исходным показателем работоспособности животных является максимальное время плавания с грузом, масса которого равна 7% от массы тела животного при температуре воды в емкости от +29°C до +30°C. Исходный уровень работоспособности оценивают в день, предшествующий исследованию.

Оцениваемым показателем является время плавания до отказа, регистрируемое в ходе контрольных тестирований в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

2.1.5. Оценка влияния перспективного ФВПФР на координацию движений мелких лабораторных животных

Для экспериментов используют модель удерживания крыс на «вращающемся стержне». Установка для оценки координации движений крыс («Rota-Rod») представляет собой прибор, состоящий из вращающегося валика, разделенного на отсеки для размеще-

ния животных и двигателя, вращающего валик. Прибор может быть доукомплектован различными дополнительными устройствами и приспособлениями, которые позволяют в ручном или автоматическом режиме задавать параметры (скорость и ускорение) вращения валика и регистрировать время нахождения животных на стержне, а также АЦП и программным обеспечением для обеспечения совместимости прибора с ЭВМ.

Исходным показателем координации движений животных является максимальное время удержания на вращающемся стержне, которое измеряют в день, предшествующий исследованию.

Оцениваемым показателем является максимальное время удержания на вращающемся стержне, регистрируемое в ходе контрольных тестирований в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

2.2. Оценка влияния перспективного ФВПФР на функциональное состояние сердечно-сосудистой системы (артериальное давление, частота сердечных сокращений)

Эксперименты проводят на крысах и собаках. Для измерения артериального давления предпочтительно использовать неинвазивные методы, поскольку это позволит избежать необходимости формирования отдельных экспериментальных групп животных и проводить обследование биообъектов, тестируемых на состояние работоспособности. Частота сердечных сокращений измеряется с использованием электрокардиографа. Показатели артериального давления и частоту сердечных сокращений регистрируют до введения препарата (оценка исходного уровня) и в динамике наблюдения за животными через 1, 3, 6 ч после окончания введения препарата, а затем один раз в день на протяжении 14 суток.

Влияние ФВПФР на оцениваемые показатели выявляют по наличию достоверных отклонений среднегрупповых значений от исходного уровня и/или от показателей группы контроля в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

2.3. Оценка влияния перспективного ФВПФР на функциональное состояние системы органов дыхания (показатели частоты дыхательных движений, минутного объема дыхания)

Эксперименты проводят на крысах и собаках. Для измерения частоты дыхания и минутного объема дыхания предпочтительно использовать неинвазивные методы, поскольку это позволит избежать необходимости формирования отдельных экспериментальных групп животных и проводить обследование биообъектов, тестируемых на состояние работоспособности. Показатели регистрируют до введения препарата (оценка исходного уровня) и в динамике наблюдения за животными через 1, 3, 6 ч после окончания введения препарата, а затем один раз в день на протяжении 14 суток.

Влияние ФВПФР на оцениваемые показатели выявляют по наличию достоверных отклонений среднегрупповых значений от исходного уровня и/или от показателей группы контроля в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

2.4. Выявление возможного негативного влияния перспективного ФВПФР на ориентировочно-исследовательскую и условно-рефлекторную деятельность лабораторных животных (модель умственной работоспособности человека)

Эксперименты проводят на крысах и собаках.

Для оценки влияния ФВПФР на ориентировочно-исследовательское поведение крыс используют методику «открытое поле». Регистрация показателей поведения крыс проводится в ручном режиме или с использованием специальных приборов (актографов), которые позволяют в автоматическом режиме с помощью регистрации показателей датчиков движения фиксировать элементы спонтанного поведения животных. Оцениваемыми показателями являются: латентный период выхода в центр поля, количество выходов в центр

поля, пройденное расстояние по горизонтали (количество пересеченных квадратов или расстояние в метрах), количество и продолжительность актов груминга, количество болосов.

Показатели регистрируют до введения препарата (оценка исходного уровня) и в динамике наблюдения за животными после окончания введения вещества не чаще двух раз в неделю. Влияние ФВПФР на оцениваемые показатели выявляют по наличию достоверных отклонений среднегрупповых значений от исходного уровня и/или от показателей группы контроля в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

Для оценки влияния ФВПФР на условно-рефлекторную деятельность крыс используют методику условной реакции активного (УРАИ) и пассивного (УРПИ) избегания. Методика УРАИ основана на оценке формирования и воспроизведения условного рефлекса активного избегания на отрицательном (болевом) подкреплении. Экспериментальная установка для методики УРАИ представляет собой челночную камеру, состоящую из двух отсеков. Пол камеры должен быть приспособлен для подачи на него электрического тока. С торцов камера должна быть оборудована блоком световых и звуковых сигналов.

Суть методики состоит в оценке влияния ФВПФР на воспроизведение предварительно выработанного условного рефлекса. Для этого животных из получающих исследуемое вещество и контрольных групп в течение пяти дней обучают переходу из одного отсека камеры в другой после подачи условного сигнала с одной стороны и обратному переходу после подачи сигнала с противоположной стороны камеры. На начальном этапе формирования рефлекса переход стимулируется подачей электрического тока через специальный пол. Латентный период реакции избегания с точностью до одной секунды измеряется с помощью секундомера вручную или с помощью автоматического приспособления.

Оцениваемым показателем является среднее значение латентного периода реакции избегания из десяти предъявлений условного раздражителя. За день до введения ФВПФР регистрируют исходный показатель УРАИ для каждого животного.

Влияние ФВПФР на оцениваемые показатели выявляют по наличию достоверных отклонений среднегрупповых значений от исходного уровня и/или от показателей группы контроля по результатам контрольных тестирований в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

Методика «УРПИ» основана на оценке формирования и воспроизведения условного рефлекса пассивного избегания на отрицательном (болевом) подкреплении. Экспериментальная установка для методики УРПИ представляет собой челночную камеру, состоящую из двух отсеков с дверцей между ними. Стенки одного отсека непрозрачные (темный отсек). Пол темного отсека должен быть приспособлен для подачи на него электрического тока. Суть методики состоит в оценке влияния ФВПФР на воспроизведение предварительно выработанного условного рефлекса. Рефлекс УРПИ вырабатывается в одной пробе. Для этого животное помещают в светлый отсек и при его переходе в темный отсек закрывают дверцу и в течение 10 с на пол темного отсека подают ток. Затем дверцу открывают и дают животному возможность перейти в светлый отсек. Рефлекс считается воспроизведенным, если при контрольном тестировании крыса, помещенная в светлый отсек камеры в течение пяти минут не переходит в темный отсек.

Регистрируемым показателем является латентный период перехода в темный отсек установки, который с точностью до одной секунды измеряется с помощью секундомера вручную или с помощью автоматического приспособления.

Влияние ФВПФР на оцениваемые показатели выявляют по наличию достоверных отклонений среднегрупповых значений латентного периода от исходного уровня и/или от показателей группы контроля в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

Для оценки влияния ФВПФР на условно-рефлекторную деятельность собак используют методику «**краткосрочная память**» (**КП**), основанную на формировании и воспроизведении собаками условного рефлекса на положительном (пищевом) подкреплении. Эксперименты проводят в отдельном помещении, оборудованном специальным стендом, представляющим собой перегородку из непрозрачного материала, на которой

укреплены три кормушки и три блока условных (световых и звуковых) раздражителей. Каждый блок условных раздражителей расположен над определенной кормушкой, пространство перед кормушкой отделено от соседней кормушки непрозрачной ширмой. Напротив стенда с кормушками на удалении не менее десяти метров расположена непрозрачная ширма, предназначенная для скрытия их от визуального контроля собаки на время отсрочки реакции. В подготовительный период проведения эксперимента у собак вырабатывают условный рефлекс побежки к кормушке, обозначаемой условным раздражителем. Затем собак тренируют с отсрочкой между предъявлением условного раздражителя и возможностью осуществить побег. В течение времени отсрочки собаку заводят за непрозрачную ширму, расположенную напротив кормушек (для каждой собаки время отсрочки подбирается индивидуально).

Регистрируемым параметром тестирования является количество правильных выборов кормушки из десяти предъявлений. Исходный показатель регистрируют накануне исследования.

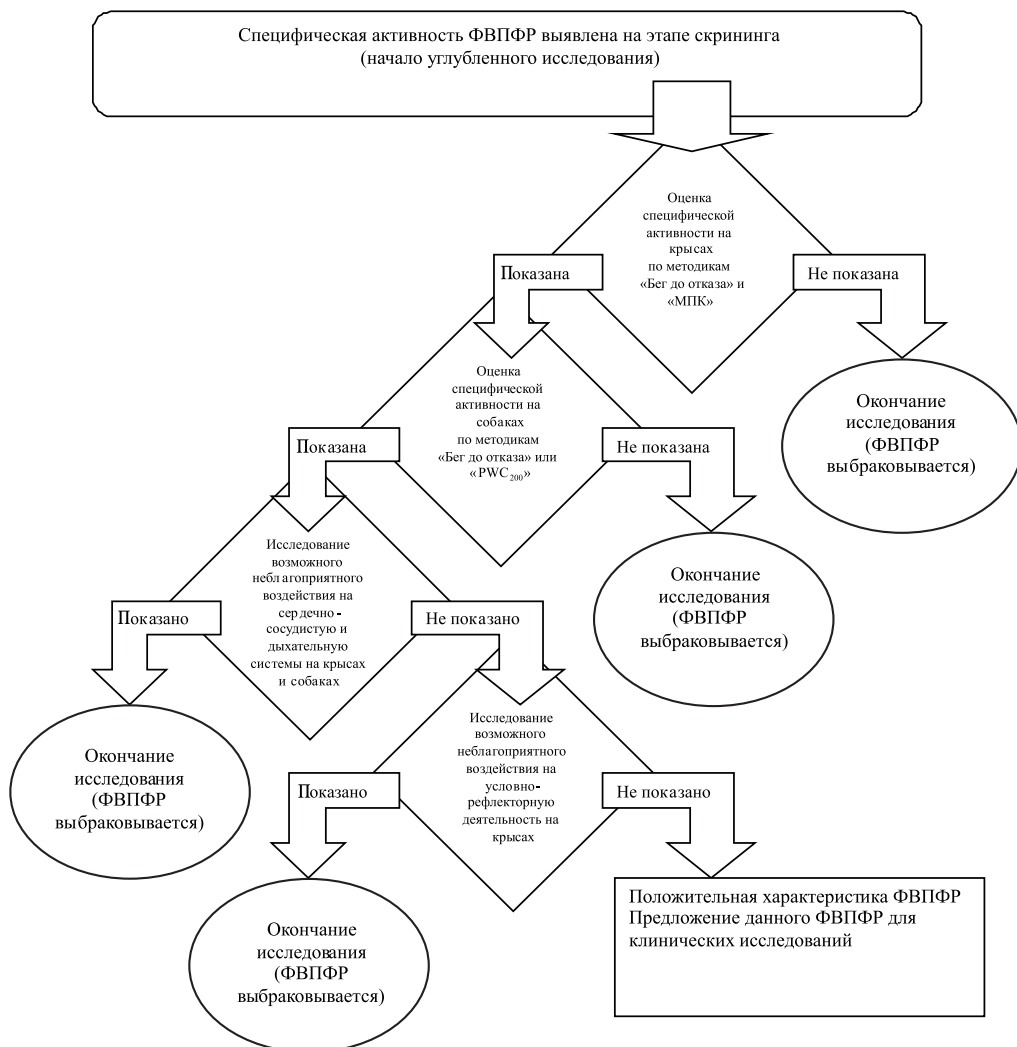


Рисунок 1. Алгоритм формирования вывода относительно исследуемого ФВПФР

Влияние ФВПФР на оцениваемые показатели выявляют по наличию достоверных отклонений среднегрупповых значений от исходного уровня и/или от показателей группы контроля в динамике наблюдения после введения ФВПФР.

Заключение

Рекомендованный комплекс методов для проведения экспериментальных исследований позволит выявить ФВПФР, которые по показателям эффективности могут быть предложены для КИ. В ходе доклинического изучения ФВПФР может возникнуть необходимость проведения дополнительных исследований, в таком случае перечень методов для углубленного изучения конкретного препарата может быть расширен.

Алгоритм формирования вывода относительно исследуемого ФВПФР представлен на рисунке 1.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Айрапетянц М.Г. Коррекция поведенческих и физиологических показателей неврозоподобного состояния белых крыс введением янтарной кислоты / М.Г. Айрапетянц // Журн. высш. нерв. деятельности, 2001. — № 3. — С. 360–366.
2. Арушанян Э.Б. Влияние фенамина на реакцию избегания у интактных и стриатэктомированных крыс / Э.Б. Арушанян, В.А. Батурич // Журн. высш. нерв. деятельности, 1975. — № 3. — С. 535–540.
3. Аулик И.В. Определение физической работоспособности в клинике и спорте [Текст] / И.В. Аулик 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1990. — 192 с.
4. Беритов И.С. Структура и функция коры большого мозга [Текст] / И.С. Беритов М.: Наука, 1969. — 476 с.
5. Бобков Ю.Г. Фармакологическая коррекция утомления / Ю.Г. Бобков [и др]; под общ. ред. Ю.Г. Бобкова. — М.: Медицина, 1984. — 208 с.
6. Борилкевич В.Е. К вопросу о понятии феномена «Физическая работоспособность» [Текст] / В.Е. Борилкевич // Теория и практика физ. культуры, 1983. — № 9–10. — С. 18–19.
7. Бородкин Ю.С. Фармакологический анализ участия гиппокампо-ретикулярного комплекса в процессах памяти [Текст] / Ю.С. Бородкин, В.А. Крауз // Журн. высш. нервн. деят. — 1973. — № 1. — С.166–173.
8. Бурчик М.В. Физическая работоспособность в условиях 120-суточной антиортостатической гипокинезии и факторы, ее обуславливающие [Текст] / М.В. Бурчик, В.В. Зайцева, В.Д. Сонькин // Физиология человека, 2000. — Т. 26, № 4. — С. 88–93.
9. Вайнбаум Я.С. Степ-тест с субмаксимальной нагрузкой для оценки физической работоспособности [Текст] / Я.С. Вайнбаум, А.А. Аскеров // Теория и практика физ. культуры, 1970. — № 2, С. 26–28.
10. Громова Е.А. Влияние острой и хронической депривации активности катехоламинергических систем, вызванной 6-оксидофамином, на поведение крыс / Е.А. Громова, Т.П. Семенова, Н.И. Грищенко // Журн. высш. нерв. деятельности, 1985. — № 6. — С. 1133–1141.
11. Жукова Е.М. Двигательная активность и эмоциональная реактивность в тесте «открытого поля» у крыс после фармакологической стимуляции или блокады нейропептидов в терминалях первичных чувствительных нейронов / Е.М. Жукова // Журн. высш. нерв. деятельности, 2001. — № 1. — С. 114–117.
12. Купалов П.С. Ситуационные условные рефлексы у собак в норме и патологии. [Текст] / П.С. Купалов, О.Н. Воеводина, М.М. Хананашвили. — Л.: Медицина, 1964. — 386 с.
13. Крауз В.А. Влияние этимизола на краткосрочную память и умственную работоспособность [Текст] / В.А. Крауз, В.А. Сорокоумов, А.А. Скоромец // Журн. высш. нервн. деят., 1972. — № 5. — С. 907–911.

14. Лурия А.Р. Основы нейропсихологии / А.Р. Лурия. — М.: Наука, 1973. — 288 с.
15. Любимов Б.И. Влияние психотропных веществ на физическую работоспособность животных в условиях высокой и низкой температур [Текст] / Б.И. Любимов, Г.З. Островская // Фармакол. и токсикол., 1977. — Т. 50. — № 2. — С. 133–136.
16. Маркель А.Л. К оценке основных характеристик поведения крыс в тесте «открытого поля» / А.Л. Маркель // Журн. высш. нерв. деятельности, 1981. — № 2. — С. 301–307.
17. Преображенская Л.А. Индивидуальные особенности собак при свободном выборе вероятности и ценности пищевого подкрепления // Журн. высш. нервн. деят., 1997. — № 3. — С. 487–499.
18. Рембовский В.Р. Экспериментальное изучение методов оценки поведенческих реакций животных на воздействие малых доз фосфорорганических отравляющих веществ [Текст] / В.Р. Рембовский, В.И. Попович, П.А. Скибарко, В.П. Кривокорытов. // Рос. хим. ж. (Ж. Рос. хим. об-ва им. Д.И. Менделеева), 2002. — Т. XLVI, № 6. — С. 98–102.
19. Чайченко Г.М. Влияние разрушенной перегородки и гиппокампа на осуществление челночных рефлексов избегания у крыс / Г.М. Чайченко // Журн. высш. нерв. деятельности, 1985. — № 2. — С. 253–260.
20. Шабанов П.Д. Воспроизведение «пассивного» избегания у крыс с помощью введения фармакологических агентов / П.Д. Шабанов // Журн. высш. нерв. деятельности, 1981. — № 1. — С. 158–163.
21. Швырков В.Б. Роль анализаторов условного и безусловного раздражений в функциональной системе условно-рефлекторного поведенческого акта / В.Б. Швырков, Б.Н. Безденежных // Журн. высш. нерв. деятельности, 1973. — № 1. — С. 15–23.

ГЛАВА 53

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ЭФФЕКТИВНОСТИ И БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ И ИХ КОМБИНАЦИЙ, ОБЛАДАЮЩИХ СВОЙСТВАМИ АНТИДОТОВ

*Составители: д. м. н., проф. Н.Н. Плужников; д. м. н., проф. С.В. Чепур;
д. м. н., проф. С.П. Нечипоренко; д. м. н., проф. А.Н. Петров; д. м. н. Е.А. Шибанов;
д. м. н., доц. В.Н. Быков; д. м. н. О.Л. Верстакова; к. м. н. Р.Д. Сюбаев*

Введение

Антидоты (противоядия, от греч. antidoton – против данного) – биологически активные вещества, проявляющие химический или физиологический антагонизм к определенному химическому соединению или группе соединений, вызывающих при введении в токсических дозах проявления интоксикации. Первоначально разработка антидотов была сопряжена с созданием противоядий к отравляющим веществам смертельного действия (яды растений и животных, фосфорорганические вещества, цианиды и т.д.). Вместе с тем современное развитие лекарственной токсикологии определяет необходимость выявления отрицательного взаимодействия ЛС для купирования побочных эффектов и симптомов передозировки лекарств при проведении терапии хронических заболеваний.

ЛС, применяемые в качестве антидотов, способны обезвреживать яд в организме в процессе физических или химических превращений или предупреждать и устранять токсические эффекты за счет антагонизма с ядом в действии на рецепторы, ферменты и физиологические системы, что зачастую и представляет собой основу наиболее эффективных способов профилактики и терапии интоксикаций.

По сравнению с другими ЛС оценка эффективности антидотов имеет ряд особенностей. Это связано с тем, что в большинстве случаев антидоты применяются однократно и по жизненным показаниям. Из-за ограниченной возможности КИ большое значение имеют экспериментальные доказательства эффективности и безопасности этих препаратов, тщательное изучение их побочных эффектов, оценка острой и подострой токсичности. Учитывая особенности применения антидотов, особое значение придается их эффективности по предотвращению смертельных исходов интоксикации и/или снижению риска нанесения существенного ущерба здоровью отравленных.

Данные методические рекомендации регламентируют порядок и объем исследований антидотов (в том числе вид и количество лабораторных животных), методы моделирования отравлений и критерии эффективности профилактических и лечебных препаратов. В них также приведены основные термины и понятия, используемые для количественной оценки антидотного эффекта, определен перечень материалов, представляемых для получения разрешения на проведение I-ой фазы КИ. Применительно к интоксикациям конкретными веществами исследователь может уточнять порядок оценки антидотов.

1. Общие положения

На препараты, предлагаемые для КИ в качестве средств, обладающих свойствами антидотов, должны быть представлены материалы доклинических исследований, характеризующие их эффективность и безопасность.

Эффективность антидотов анализируют по их защитным свойствам, проявлениям специфического или группового антагонизма по отношению к различным токсическим агентам, времени наступления защитного эффекта и его продолжительности, а также по способности предупреждать структурно-функциональные изменения, возникающие во время интоксикации (полнота защитного действия).

Безопасность применения антидотов оценивают исходя из необходимости их однократного применения по жизненным показаниям, что разрешает исследования подострой токсичности соединений на протяжении 5–7 сут при ежедневном однократном введении исследуемого антидота.

Продолжительность наблюдения за животными в исследованиях по изучению эффективности и безопасности ЛС должна составлять не менее 28 сут, что позволяет оценивать полноту защитного действия противоядий и выявляет отдаленные эффекты их применения. Применение противоядий повторно или в течение нескольких дней определяет необходимость увеличения продолжительности оценки их подострой токсичности в соответствии с общими требованиями к доклиническому изучению фармакологических препаратов.

При исследовании эффективности антидотов обязательно использование групп негативного и позитивного контроля. В качестве позитивного контроля используют интактных животных, а в качестве негативного контроля — группу животных, получавших препарат сравнения. В числе препаратов сравнения применяют известные противоядия, если таковые описаны. Показатели эффективности заявляемого нового антидота должны превышать показатели эффективности препарата сравнения, а показатели жизненно важных функций животных получающей исследуемое вещество группы должны приближаться к уровню интактных животных. При отсутствии препарата сравнения регистрируемые показатели в получающей исследуемое вещество группе животных должны достоверно отличаться от таковых для группы особей, не получавших антидотной профилактики/лечения.

При предоставлении материалов доклинических исследований о специфической активности антидотов обязательным является доказательство наличия антагонистического взаимодействия предполагаемого антидота с токсическим агентом. Отсутствие специфического антагонизма не позволяет относить фармакологический препарат к антидотам, а его оценку проводят в соответствии с требованиями к средствам патогенетической терапии с определенной фармакологической активностью (противосудорожной, антиаритмической, противорвотной и т.д.).

2. Характеристика эффективности антидотов

2.1. Показатели эффективности антидотов

Эффективность антидотов оценивают по четырем показателям, определение которых обязательно для любого оцениваемого антидота.

2.1.1. Защитная эффективность — наиболее важная характеристика для оценки специфической активности антидотов. Исследования по описанию защитной эффективности антидотов проводят *in vivo* и *in vitro*.

В исследованиях *in vivo* защитная эффективность предлагаемых средств характеризуется следующими величинами:

— выживаемость получающих исследуемое вещество животных при отравлении ядом в смертельных (LD_{50} и LD_{99}) дозах, динамика проявления симптомов интоксикации у животных с применением антидотов и особей контрольных групп. Степень выраженности симптомов интоксикации у животных при применении антидотов и у животных контрольных групп оценивают с использованием лабораторно-инструментальных методов, набор которых определяют исходя из специфической активности яда и антидота;

— коэффициент (индекс) защиты — частное от деления среднесмертельной/среднеэффективной по определяющему эффекту дозы/токсодозы яда на фоне применения

антидота к аналогичному показателю в группе без использования защитного средства. Коэффициент (индекс) защиты характеризует кратность изменения дозы яда для достижения эквивалентного (50% по частоте) эффекта под влиянием антидота. Выбор среднесмертельных/среднеэффективных доз для расчета коэффициента основан на простоте, информативности и наименьшей ошибке их определения;

— антидотная мощность — количество абсолютно смертельных/абсолютно эффективных по определяющему эффекту доз/токсодоз яда, при введении которых на фоне профилактического или лечебного применения антидота регистрируют гибель 50% животных. Антидотную мощность рассчитывают как частное от деления абсолютно смертельной/абсолютно эффективной (воспроизводящейся с 99% частотой) дозы/токсодозы яда без применения антидота к среднесмертельной/среднеэффективной по определяющему эффекту дозе/токсодозе яда на фоне применения антидота. Рассматриваемый относительный показатель характеризует способность антидота переводить абсолютный эффект яда в 50% по частоте проявления. Применение этого показателя оправдано в случае, когда при применении антидота происходит не только смещение кривой летальности, но и существенно изменяется ее наклон. Антидотную мощность часто применяют для описания эффективности антидотов в исследованиях на крупных животных, а также в исследованиях на мелких лабораторных животных в случае малого тангенса угла наклона кривой летальности;

— коэффициент (индекс) гарантированной защиты — количество абсолютно смертельных/абсолютно эффективных по определяющему эффекту доз/токсодоз яда, при введении которых на фоне профилактического или лечебного применения антидота наблюдают гибель 10% животных. Индекс рассчитывают как частное от деления абсолютно смертельной/абсолютно эффективной (воспроизводимой с 99% частотой) дозы/концентрации яда без применения антидота к LD_{10}/ED_{10} по определяющему эффекту на фоне применения антидота. Коэффициент (индекс) гарантированной защиты характеризует способность антидота переводить абсолютный (воспроизводимый с 99% частотой) эффект яда в 10% по частоте проявления и отражает диапазон эффективности антидота. Допустимо рассчитывать индекс по отношению к дозам, вызывающим эффект в 16% случаев с указанием в описании методов определения.

Графическое изображение показателей эффективности антидотов приведено на рисунке 1.

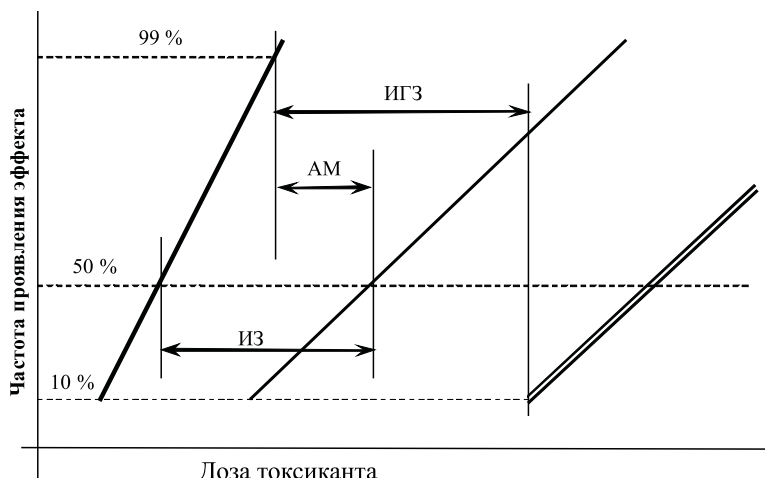


Рисунок 1. Графическое изображение показателей эффективности антидотов
 На рисунке жирным выделена зависимость частоты проявления эффекта от дозы яда без применения антидота, простой и двойной линией изображены зависимости «доза–эффект» при применении антидотов и обозначены значения, используемые для определения относительных характеристик антидота. ИЗ — индекс защиты, АМ — антидотная мощность, ИГЗ — индекс гарантированной защиты

В ряде случаев в исследованиях на животных необходимо оценивать способность антидотов ускорять элиминацию яда из организма. Для характеристики такого проявления антагонизма исследуют показатели концентрации яда в крови и моче.

2.1.2. Спектр антидотной эффективности (универсальность) — характеристика эффективности антидота, отражающая его групповую специфичность. Количественно ее определяют показателями эффективности антидота при отравлениях различными ядами одной группы и/или количеством ядов из разных групп, при отравлениях которыми антидот эффективен.

2.1.3. Время наступления защитного эффекта и его продолжительность — показатели, косвенно характеризующие фармакокинетику антидотов, получили широкое распространение при исследованиях эффективности как лечебных, так и профилактических антидотов. Для количественной оценки времени наступления и продолжительности защитного эффекта регистрируют следующие величины:

— продолжительность времени от момента введения лечебного антидота до прекращения симптоматики интоксикации и длительность временного интервала отсутствия симптомов действия токсиканта, оцениваемые как визуально, так и с применением лабораторно-инструментальных методов.

— продолжительность временного периода, в течение которого антидот при профилактическом применении до отравления будет сохранять заданную эффективность. Такой подход также позволяет характеризовать скорость наступления защитного эффекта профилактических антидотов.

2.1.4. Полнота защитного действия — характеристика способности антидота не только сохранять жизнь отравленных особей, но и купировать максимальное количество морфофункциональных изменений при интоксикациях. Для оценки полноты защитного действия антидотов применяют морфологические, биохимические и другие специальные методы исследования. В последнее время изучению этого показателя придается большое значение, что обусловлено необходимостью решения задач лекарственной токсикологии.

2.2. Методы исследования фармакологического взаимодействия яда и антидота в опытах *in vitro*

2.2.1. Исследование специфического взаимодействия яда и антидота

Антагонизм антидота по отношению к яду выявляют в том числе и по способности антидота вступать в прямое взаимодействие с ядом с образованием малотоксичного соединения. Возможность реализации такого взаимодействия оценивают *in vitro*. Для моделирования различных условий взаимодействия применяют максимально адекватные живым системам условия и среды. Большинство исследований выполняют в различных растворах электролитов (Рингера-Локка, Рингера, 0,9% растворе хлорида натрия и т.д.). Вместе с тем в ряде случаев, в частности при исследованиях антител к ядам, в качестве сред применяют плазму крови лабораторных животных и человека, гомогенаты органов или взвеси клеточных элементов тканей, а также различные гели, моделирующие состав биосред организма. В некоторых случаях для моделирования биологических барьеров применяют диализные системы, в которых градиент концентрации яда поддерживается его убылью при взаимодействии с антидотом.

Регистрируемыми показателями в этих исследованиях являются концентрация свободного яда в системе и концентрация продукта взаимодействия яда с антидотом. Оценка изменений этих показателей во времени дает возможность рассчитать клиренс яда и время, необходимое для достижения его безопасной концентрации в биологической системе.

В опытах *in vitro* эффективность антидотов характеризуется следующими величинами:

- клиренс свободного яда в присутствии антидота — показатель, используемый для характеристики активности антидотов, нейтрализующих яд до его взаимодействия с биологическими мишенями. Часто для увеличения точности оценки скорости взаимодействия яда и противоядия, а также для моделирования биологических барьеров и систем с разделом фаз применяют методы диализа. Для доказательства специфичности взаимодействия сравнивают результаты опытов с несколькими концентрациями яда и несколькими концентрациями противоядия, что позволяет выявить вариант дозовой зависимости;
- среднеэффективные концентрации яда по воздействию на определенную метаболическую систему при применении антидота и без него, а также изменение скоростей связывания яда с ферментами и рецепторами или изменение его сродства к биосубстратам при применении антидотов — показатели, применяемые для характеристики активности антидотов, нейтрализующих эффекты взаимодействия яда с биологическими мишенями.

2.2.2. Исследования физиологического антагонизма яда и антидота при взаимодействии с биологическими субстратами

Антагонизм антидота по отношению к яду на уровне функционирования физиологических систем может быть основан на:

- взаимодействию с одинаковыми биологическими мишенями (ферментами или рецепторами);
- блокировании эффектов избытка накапливающихся/высвобождающихся биологически активных веществ;
- компенсации дефицита несинтезируемых/элиминируемых биологически активных веществ;
- активации ферментов метаболизма ядов.

В ходе доклинического исследования устанавливают вариант реализации антагонизма, позволяющего отнести фармакологический препарат к антидотам определенного яда или группы ядов. Параметры антагонистического взаимодействия оценивают количественно при помощи стандартных подходов к анализу кинетики ферментативных реакций (рецепторного связывания), основанных на модели Михаэлиса-Ментен. В общем случае применение указанного подхода дает возможность количественно оценить влияние эффектора (активатора или ингибитора) на кинетику ферментативной реакции или связывания лигандов с рецептором.

Оценку проводят на гомогенатах тканей, переживающих срезах и культурах органов, изолированных переживающих клетках, переживающих и перевиваемых клеточных культурах и других биообъектах, доступных для исследования *in vitro*.

В качестве наиболее просто определяемой величины, характеризующей степень влияния ингибитора или активатора ферментов (агониста или антагониста рецептора) на биомакромолекулу (надмолекулярный рецепторный комплекс), используют концентрацию вещества-эффектора, вызывающую половинное изменение активности биологической системы ($[I]_{50}$, $[A]_{50}$).

Особое значение имеют некоторые частные случаи решения уравнения Михаэлиса-Ментен, которые широко применяют для описания кинетики ферментативных процессов. К их числу относятся варианты полного конкурентного ингибирования, полного неконкурентного ингибирования, бесконкурентного ингибирования, простой активации и некоторые типы смешанного ингибирования и активирования. Вариант воздействия антидота на функции связанных с ядом макромолекул можно оценивать графически в системе координат Лайнуивера-Берка или Диксона. При помощи разработанных стандартных математических моделей определяют константы сродства эффектора к ферменту или рецептору, а также константы скорости реакций, вычисление которых необходимо для характеристики защитной эффективности антидотов.

2.3. Исследования защитной эффективности антидотов на моделях интоксикаций млекопитающих при различных путях поступления яда в организм

2.3.1. Общие требования к тест-системам для проверки эффективности антидотов

Для исследования используются белые крысы с исходной массой тела 180–220 г, белые мыши (18–22 г), морские свинки (200–300 г), кролики породы «шиншилла» или альбиносы (2–4 кг), кошки (2–4 кг), собаки (10–20 кг). Среди животных одной группы максимальная разница в массе тела не должна составлять более 10%.

Животных содержат в условиях вивария на стандартном пищевом рационе. За 1 сут до проведения исследования в зависимости от его условий животные могут быть лишены пищи.

Исследование выполняют на трех наиболее адекватных условиях исследования видах животных (один вид — не грызуны и не зайцеобразные).

Выбор количества особей для проведения исследования обусловлен способом определения среднесмертельной/среднеэффективной дозы яда в условиях применения антидота и без него. Для сильнодействующих ядов смертельного действия расчет среднесмертельной дозы допустимо выполнять экспресс-методом В.Б. Прозоровского. Использование этого метода позволяет определить среднесмертельную/среднеэффективную дозу на восьми животных (не менее двух на исследование одной дозы яда). В то же время при малом тангенсе угла наклона кривой летальности результаты оценки экспресс-методами можно рассматривать только как предварительные, а большую точность обеспечивают методы пробит-анализа, в частности по Финни. Применение пробит-анализа позволяет рассчитать граничные дозы линейного участка кривой летальности, отстоящие от среднесмертельной/среднеэффективной дозы на одно среднеквадратическое отклонение — LD_{16}/ED_{16} и LD_{84}/ED_{84} . Для вычисления эффективных доз методом пробит-анализа необходимо не менее 6 животных на одну дозовую точку и не менее 4 дозовых диапазонов, выбранных таким образом, чтобы обеспечить вариацию эффектов.

При проведении исследований на крупных животных (собаки, кошки, свиньи и др.) допустимо определять только изменения среднелетальной дозы (с вычислением индекса защиты), рассчитываемой экспресс-методами.

2.3.2. Оценка антидотной активности при внутривенной, внутримышечной, подкожной и накожной аппликации токсиканта

Парентеральные пути введения яда позволяют осуществить точное дозирование токсиканта, вследствие чего их часто используют при изучении патогенеза отравлений и анализа механизма антидотного действия.

В зависимости от требуемой скорости развития симптомов интоксикации применяют внутривенное, внутримышечное, подкожное и внутрикожное введение яда. В качестве пути введения антидота обычно выбирают тот, который предусмотрен для применения в клинических условиях.

При внутримышечной аппликации яда грызунам и крупным лабораторным животным инъекцию производят в мышцы правого бедра, введение лечебного антидота выполняют в контралатеральную конечность. При внутривенном введении грызунам (мыши и крысы) токсический агент вводят в хвостовую вену, кроликам — в ушную вену, кошкам и собакам — в скаковую вену. Для внутривенного введения крысам, кошкам и собакам в ряде случаев при адекватном обезболивании препарируют бедренную вену. При подкожной аппликации яд вводят под кожу правого бедра, а при накожной аппликации — на выстриженный участок кожи спины.

Регистрацию эффекта яда в группе животных, которым применяли антидот, и в контрольной группе выполняют на протяжении 14 суток. При оценке эффективности противоядий токсикантов смертельного действия допустима регистрация показателей через

1 сут после отравления при разрешившемся исходе интоксикации. Несмотря на это всех животных содержат под наблюдением на протяжении двух недель.

Для приготовления рабочих растворов используют растворители, указанные в паспорте препаратов. При использовании специальных растворителей необходимо дополнительно выполнить исследования по оценке их токсичности и степени взаимодействия с антидотом. Максимально вводимый объем жидкости за один раз составляет при парентеральном введении для мышей 0,5 мл, для крыс — до 5 мл, для собак — до 10–12 мл жидкости.

Для соблюдения одинакового относительного объема введения фармакологических препаратов принято вводить установленную дозу препарата:

— мышам — из расчета 0,1 мл на 10 г массы тела (исследуемая доза на 1 кг массы тела содержится в 10 мл раствора/суспензии);

— крысам, кроликам и морским свинкам, собакам и кошкам — из расчета 0,1 мл на 100 г массы тела (исследуемая доза на 1 кг массы тела содержится в 1 мл раствора/суспензии).

В исключительных случаях для сильнодействующих средств исследуемую дозу вводят в половинном объеме.

В ходе исследований оценивают стандартные показатели, описанные в разделе 2.1.

2.3.3. Особенности оценки эффективности антидота при ингаляционном воздействии токсиканта

В условиях доклинических исследований ингаляционный путь введения ядов наиболее сложен с технической точки зрения. Это также сопряжено с трудностями в определении реально поглощенной дозы яда из-за сорбционных потерь и неравномерности дыхания получающих исследуемое вещество животных, в особенности при реализации специфических эффектов токсического агента.

Моделирование ингаляционных отравлений осуществляют в статическом, динамическом и статико-динамическом режимах, когда используют камеры малого объема, а для обеспечения стандартных условий генерации пара или аэрозоля применяют метод принудительного газообмена.

Мелких лабораторных животных и кошек подвергают ингаляционному воздействию непосредственно в ингаляционной камере, объемы которой должны быть достаточны для равномерного распределения токсического агента. При этом объем воздуха на одно животное рассчитывают таким образом, чтобы колебания концентрации кислорода в камере на протяжении исследования не менялись более чем на 5%. Пары, газы или аэрозоли нагнетаются в объем камеры для создания необходимой концентрации с учетом потерь на оседание и адгезию, которые составляют не менее 35%.

В предварительных исследованиях концентрацию яда определяют по отношению массы нагнетенного вещества к объему ингаляционной камеры. Условно поглощенную дозу (токсодозу) определяют умножением концентрации на время воздействия и средний объем легочной вентиляции, который для крыс составляет 0,1 л/мин. Разделив полученный результат на среднюю массу животных, получают сопоставляемую с другими путями введения дозу яда.

При определении токсикодинамических параметров необходимо учитывать, что рассчитанная таким способом (модификация формулы Габера) поглощенная доза справедлива только для так называемых «хроноконцентрационных ядов», для которых в ограниченном интервале времени и концентраций справедлива линейная зависимость «доза–эффект».

Для более точного контроля концентрации токсического агента в камере устанавливают специальные пробоотборники, количество которых должно обеспечивать количественный контроль распределения яда в камере. В отдельных случаях в предварительных исследованиях применяют гравиметрические методы определения количества

токсического агента в ингаляционной камере, однако погрешность такого определения чрезвычайно высока. Экспозицию токсического воздействия определяют исходя из конкретных условий моделирования и возможности достижения заданной токсодозы.

В ходе предварительных исследований оценивают изменения паттерна дыхания животных. Учащение дыхания со снижением его глубины, снижение частоты дыхания, развитие бронхоспастических состояний и иных нарушений функций внешнего дыхания существенным образом влияют на величину объема легочной вентиляции и должны быть учтены при проведении исследований.

Для моделирования ингаляционного воздействия на собаках можно применять специальные маски, с помощью которых животное осуществляет ингаляцию из камеры с равномерным распределением пара/аэрозоля токсичного вещества. В непосредственной близости от ноздрей животного монтируют пробоотборники для уточнения концентрации действующего начала токсичного агента во вдыхаемом воздухе.

Моделирование динамического воздействия отравляющих веществ осуществляют в специальных камерах, в которых создают постоянный по свойствам поток токсичного агента в виде пара, аэрозоля или пыли. В формировании этого потока важны как характеристики генерирующего устройства, так и системы элиминации/рециркуляции яда. В камеру помещают только голову животного, тело которого размещают в специальном подсадном устройстве (для крыс — в пенале). Сорбционные потери при непрерывном перемешивании воздуха вентилятором обычно не превышают 25%. В предварительных исследованиях концентрацию яда определяют по отношению массы яда, нагнетенного за определенное время в камеру, к величине ее объема и кратности воздухообмена. Обычно интенсивность воздухообмена для камеры объемом 100 л составляет 20 л/мин. Для сильнодействующих веществ концентрацию контролируют в динамике, последовательно проводя отборы проб воздуха.

Отбор проб осуществляют в пробоотборники-поглотители. Содержание действующего начала определяют с помощью метрологически аттестованных методов физико-химического анализа (титрование, ИК-спектроскопия с Фурье-преобразованием, газовая хроматография). Возможно применение и других способов определения концентраций токсических веществ в ингаляционных камерах, например с помощью ионизационных и ферментных датчиков, иммуноферментного анализа и др.

Расчет характеристик эффективности антидотов осуществляют в соответствии с определениями раздела 2.1. Оценка эффективности антидотов должна производиться в условиях одновременного ингаляционного воздействия яда на контрольных и получающих исследуемое вещество животных.

2.3.4. Оценка антидотной активности при поступлении токсиканта через кожу

Алгоритм оценки эффективности антидотов при поступлении ядов через кожу в целом существенно не отличается от представленных выше вариантов проверки защитных свойств противоядий при других парентеральных путях поступления яда. Используют стандартные критерии, позволяющие количественно охарактеризовать эффективность антидотов.

При поступлении яда в организм через кожу эффективные дозы токсиканта могут быть выражены как в отношении к массе тела (например, мг/кг), так и по отношению к поверхности покрова (например, мг/см²).

Исследования проводят не менее чем на двух видах животных, один из которых не относится к грызунам и зайцеобразным. Количество животных в группе грызунов — не менее 10 особей, кошек и собак — 2–4 особи.

Для проведения исследований, в особенности с сильнодействующими токсикантами, исследование токсичности которых требует последующей дегазации животных, биообъекты фиксируют в специальных станках или пеналах. Фиксация должна осуществляться

наиболее физиологичным методом. Для исключения слизывания яда с кожи для кроликов применяют специальные станки или полужесткие воротники (из резины, пластика или линолеума). Морских свинок помещают в индивидуальные домики.

Участок аппликации должен составлять не более 5% общей поверхности кожи животных, что соответствует $\frac{2}{3}$ поверхности хвоста крыс и мышей или площади участка кожи на спине мышей — 1,5×2 см, крыс — 4×4 см; кроликов — 7×8 см, морских свинок — 5×5 см. При моделировании интоксикации сильнодействующими средствами нанесение их на кожу хвоста грызунов без его должной фиксации запрещено. Более точно общая поверхность тела животного и, соответственно, площадь участка аппликации могут быть рассчитаны, исходя из массы его тела по общепринятым формулам.

За 1–2 дня до исследования тщательно выстригают шерсть на участке аппликации. Применение депилятора или выполнение этой процедуры в день проведения исследований недопустимо. В исследование пригодны животные с чистой здоровой кожей без механических повреждений. В зависимости от условий моделирования или при исследовании средств защиты кожи шерсть можно выстригать на симметричных участках спины по обе стороны позвоночника, оставляя шерстный покров между ними в 2 см. Правый бок служит для аппликации изучаемого вещества, левый — для контроля. При моделировании интоксикации ядами резорбтивного действия подготавливают один участок для аппликации яда.

Время экспозиции яда и время применения антидота определяют с учетом условий исследования. Продолжительность наблюдения за отравленными животными контрольных и получивших антидот групп осуществляют до разрешившегося исхода интоксикации. Выживших животных наблюдают не менее 14 сут в соответствии с правилами оценки острой токсичности фармакологических средств.

Как правило, изучаемые соединения наносят на кожу в нативном виде. В случае невозможности нанесения вещества в чистом виде или при наличии выраженного раздражающего действия применяют разведение химического вещества. В качестве растворителя и разбавителя следует использовать дистиллированную воду или модельную среду, имитирующую потовую жидкость. При невозможности разведения вещества в перечисленных выше растворителях допустимо применение растительного и вазелинового масла, этилового спирта или ацетона. Для усиления резорбтивного эффекта летучих веществ (температура кипения до 160 °С) возможно применение компрессионного метода Ведрова и Долгова, специальных колпачков (капсул, часовых стекол и др.) для дополнительного воздействия ядом в паровой фазе. Нанесение вещества осуществляют при температуре окружающей среды 18–24 °С.

На контрольный участок кожи животного при исследовании средств защиты кожи наносят растворитель или разбавитель, используемый в исследовании. При исследовании антидотов против веществ резорбтивного действия выделяют отдельную контрольную группу.

После окончания экспозиции остатки продукта удаляют теплой водой с мылом. При необходимости применяют средства специфической дегазации. Необходимо избегать грубых манипуляций, способных вызвать изменения кожи.

Оценку эффективности антидотов проводят стандартным способом.

2.3.5. Оценка эффективности антидотов при пероральном поступлении токсиканта

Введение токсиканта в желудок лабораторных животных осуществляется естественным путем (с пищей, питьевой водой) или принудительно (с применением зондов) в чистом виде, или в виде растворов, эмульсий, взвесей и т.д.

Использование естественного пути введения токсиканта и антидота допустимо только для собак, которым после пищевой депривации скармливают предварительно капсулированные исследуемые препараты с мясом. В исследованиях на грызунах естественный путь введения применим только для моделирования хронической интоксикации.

В большинстве случаев препараты вводят внутривентриально металлическим или резиновым (для крупных животных) зондом, убедившись в том, что он не расположен в просвете воздухоносных путей. Внутривентриальное введение токсиканта осуществляют животным натощак (не менее чем через 4 ч после последнего кормления). Кормление отравленных животных производят не ранее чем через 3–4 ч после введения исследуемых препаратов.

Выбор вида лабораторных животных и требуемое количество животных для формирования дозовых групп определяют стандартным образом. В таблице 1 приведены максимально допустимые объемы вводимой в желудок жидкости для ряда видов лабораторных животных. Токсиканты вводят в минимально возможных объемах. При установлении диапазона смертельных или среднеэффективных по определяющему эффекту доз растворы вещества следует вводить, варьируя объемом, но не концентрацией во избежание изменения токсикокинетики исследуемого агента. Длительность наблюдения за животными зависит от скорости наступления исхода интоксикации, у выживших животных она составляет 14 сут.

Жидкие токсические вещества вводят в чистом виде либо, если их токсичность чрезвычайно высока или доза не соответствует задачам моделирования тяжелой интоксикации, используют растворы и эмульсии яда. В качестве растворителей наиболее часто используют дистиллированную воду, этиловый спирт, растительные масла, твины различных марок. Животным контрольной группы вводят соответствующий растворитель или инертное вещество.

Предлагаемый антидот вводят путем, рекомендуемым для клинического применения, а также дополнительным реально возможным способом при его наличии, в сроки, установленные показаниями к применению антидота. Оценка эффективности антидотов производят стандартным способом (п. 2.1).

Таблица 1

Максимальные объемы введения растворов фармакологических препаратов в желудок при исследовании эффективности и безвредности антидотов

Вид животных	Масса (г)	Объем жидкости (мл)
Мышь	20–24	0,5
	25–30	0,8
	>30	1,0
Крыса	100–190	3,0
	200–240	4,0–5,0
	250–300	6,0
	>300	8,0
Морская свинка	250–300	4,0–5,0
	>300	6,0
Кролик	2000–2400	100,0
	2500–3000	150,0
	>3000	200,0

3. Определение острой токсичности антидотов

Установление параметров острой токсичности проводится на грызунах (мыши, крысы), зайцеобразных (кроликах) и негрызунах (собаки).

3.1. Исследования на грызунах и кроликах

Животные: не менее двух видов животных из отрядов грызунов и/или зайцеобразных, половозрелые, обоего пола.

Число животных: в группе не менее 6 особей.

Путь введения: рекомендованный для клинического применения и дополнительный, в случае возможности применения.

Дозы: 4–5 уровней доз, достаточных для расчета основных токсикометрических параметров (LD_{50} , LD_{16} , LD_{84}).

Частота введения: однократно.

Период наблюдения: 14 дней.

Регистрируемые показатели: ежедневное наблюдение общего состояния, взвешивание животных 3 раза в течение периода (до начала исследования, через 7 и 14 дней), вскрытие павших животных и всех выживших в конце исследования, макроскопическое описание изменений внутренних органов, определение относительной массы органов и степени их влагонасыщения, а также изучение гистологической структуры органов с выраженными макроскопическими изменениями.

Расчетные показатели: широта терапевтического действия (ШТД) — отношение LD_{50} антидота к его $ЭД_{50}$; индекс Брокка-Шнайдера — отношение LD_{10} антидота к его $ЭД_{90}$.

3.2. Исследования на негрызунах

Животные: собаки, половозрелые, обоего пола.

Число животных: в группе не менее 3 животных.

Путь введения: рекомендованный для клинического применения.

Дозы: 3–4 дозы для ориентировочного определения летальной дозы. Уровни доз определяют из необходимости получения вариации эффектов.

Частота введения: однократно.

Длительность наблюдения: 14 дней.

Регистрируемые показатели: ежедневное наблюдение за общим состоянием, взвешивание не менее 3 раз за период наблюдения; в конце периода наблюдения или после гибели всех животных подвергают аутопсии, проводят макроскопическое описание изменений внутренних органов, органы взвешивают, оценивают их относительную массу и степень влагонасыщения, ткани с макроскопическими изменениями подвергают гистологическому исследованию.

Расчетные показатели: широта терапевтического действия (ШТД) — отношение LD_{50} антидота к его $ЭД_{50}$; индекс Брокка-Шнайдера — отношение LD_{10} антидота к его $ЭД_{90}$.

Данные по токсичности нового антидота, значению терапевтического индекса и побочным эффектам сопоставляют с результатами исследований препаратов сравнения.

4. Исследование подострой токсичности антидотов

4.1. Исследования на грызунах и кроликах

Животные: не менее двух видов животных из отрядов грызунов и/или зайцеобразных, половозрелые, обоего пола.

Число животных: в группе не менее 6 особей.

Путь введения: рекомендованный для клинического применения и дополнительный, в случае возможности применения.

Дозы: три уровня доз, определяемых как эффективная, максимальная суточная (в среднем три эффективных) и максимально переносимая (около десяти эффективных доз).

Частота введения: ежедневно в одинаковое время. Антидот вводят на протяжении срока, достаточного для оценки его токсичности для человека при соответствующей продолжительности применения. Для препаратов, используемых по жизненным показаниям, допустимо исследование подострой токсичности на протяжении 5 сут.

Период наблюдения: 28 суток. Животных подвергают комплексному обследованию до начала исследования, после окончания введения исследуемого препарата и по прошествии восстановительного периода.

Регистрируемые показатели: ежедневное наблюдение общего состояния, взвешивание животных, определение водопотребления 3 раза в течение периода (до начала исследования, на пике проявления токсических эффектов, после окончания периода восстановления), не менее чем трехкратное определение времени свертывания крови, содержания гемоглобина в крови, содержания эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и их популяций, скорости оседания эритроцитов, содержания билирубина, креатинина, мочевины, натрия, калия, активности аланинаминотрансферазы плазмы крови, оценка изменений поведения животных в открытом поле и физической работоспособности в камере Махта, оценка краткосрочной памяти в челночной камере, гексеналовый тест, клинический анализ мочи, вскрытие павших животных и всех выживших в конце исследования, макроскопическое описание изменений внутренних органов, определение относительной массы органов и степени их влагонасыщения, а также изучение гистологической структуры органов с выраженными макроскопическими изменениями.

Расчетные показатели: индекс кумуляции — отношение LD_{50} при однократном введении к LD_{50} при повторных введениях (определяется по мере возможности).

4.2. Исследования на негрызунах

Животные: собаки, половозрелые, обоего пола.

Число животных: в группе не менее 3 животных.

Путь введения: рекомендованный для клинического применения и дополнительный, в случае возможности применения.

Дозы: три уровня доз, определяемых как эффективная, максимальная суточная (в среднем три эффективных) и максимально переносимая (около десяти эффективных доз).

Частота введения: ежедневно в одинаковое время. Антитод вводят на протяжении срока, достаточного для оценки его токсичности для человека при соответствующей продолжительности применения. Для препаратов, используемых по жизненным показаниям, допустимо исследование подострой токсичности на протяжении 5 суток.

Период наблюдения: 28 суток. Животных подвергают комплексному обследованию до начала исследования, после окончания введения исследуемого препарата и по прошествии восстановительного периода.

Регистрируемые показатели: ежедневное наблюдение общего состояния, взвешивание животных, определение водопотребления 3 раза в течение периода (до начала исследования, на пике проявления токсических эффектов, после окончания периода восстановления), не менее чем трехкратное определение времени свертывания крови, содержания гемоглобина в крови, содержания эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов и их популяций, скорости оседания эритроцитов, содержания билирубина, креатинина, мочевины, натрия, калия, активности аланинаминотрансферазы плазмы крови, оценка изменений поведения животных в тесте Бериташвили, физическая выносливость, клинический анализ мочи, вскрытие павших животных и всех выживших в конце исследования, макроскопическое описание изменений внутренних органов, определение относительной массы органов и степени их влагонасыщения, а также изучение гистологической структуры органов с выраженными макроскопическими изменениями.

Расчетные показатели: индекс кумуляции — отношение LD_{50} при однократном введении к LD_{50} при повторных введениях (определяется по мере возможности).

Данные по токсичности нового антитода, значению терапевтического индекса и по побочным эффектам сопоставляют с данными, полученными для эталонных препаратов.

5. Изучение фармакокинетики антитода

Исследование фармакокинетики антитода проводят как с целью прогнозирования и планирования сроков его введения, так и для прогноза последствий его влияния на организм.

Фармакокинетику антитодов оценивают на собаках, половозрелых особях массой тела 15–20 кг. В исследование включают не менее 4 животных каждого пола. Введение антитода осуществляют однократно способом, рекомендованным для клинического применения.

Для исследования фармакокинетики антитод вводят в эффективной дозе, в максимальной суточной дозе, в предельной дозе, не вызывающей токсических эффектов. В случае если антитод состоит из нескольких компонентов предусматривают проведение дополнительной оценки фармакокинетики каждого из компонентов при их введении в эквивалентных дозах.

Время регистрации концентрации препарата в крови зависит от особенностей его фармакокинетики. Сроки отбора проб должны быть выбраны таким образом, чтобы не менее трех точек приходилось на фазу нарастания концентрации, не менее трех точек характеризовали ее вершину, не менее пяти точек характеризовали фазу снижения концентрации вплоть до регистрации следовых количеств препарата в плазме крови.

Определение фармакокинетических показателей проводят двумя методами: модельно-зависимым с привлечением стандартных фармакокинетических моделей и методом интегральных моментов, являющимся модельно независимым. Использование двух методов необходимо для проверки адекватности полученной фармакокинетической модели. При проведении хроматографического определения концентраций физиологически активных веществ используют валидизированные системы, позволяющие достоверно разделить характеристические признаки присутствия в средах действующего вещества и сходных с ним продуктов его метаболизма. Для характеристики фармакокинетики препарата рассчитывают следующие показатели:

b — постоянная убывания на хвосте распределения (мин);

C_{\max} — максимальная концентрация (мкг/мл);

AUC — полная площадь под кривой (мин мкг/мл);

C_{\max}/AUC — скорость всасывания (мин⁻¹);

MRT — среднее время удерживания (мин);

V_o — центральный объем распределения (мл/кг);

Cl — общий клиренс (мл/мин/кг);

V — стационарный объем распределения (мл/кг);

$T_{\text{эфф}}$ — эффективная длительность процесса (мин).

В некоторых случаях для оценки фармакокинетических показателей можно использовать альтернативные методы. Примером этого могут служить ингибиторы холинэстеразы (ХЭ), основные фармакокинетические параметры которого могут быть получены по данным динамики ингибирования активности ХЭ. Также возможна регистрация динамики изменения характерного для исследуемого антитода фармакологического эффекта.

В случае если в состав антитода входят «пролекарства», необходима оценка фармакокинетики активного метаболита.

Для антитодов, воздействующих на рецепторные или ферментативные системы, данные прямого определения антитодов или их компонентов в биосредах могут быть дополнены оценкой динамики активности соответствующих биологических систем.

Заключение

Применение данных методических рекомендаций при поиске и отборе новых фармакологических веществ, обладающих антитодной активностью, позволит при проведении доклинических исследований объективно оценить их специфическое фармакологическое действие с целью решения вопроса о целесообразности и возможности проведения КИ.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необхо-

димо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Акерман Ю. Биофизика. — М.: Изд-во «Мир», 1987. — 671 с.
2. Бейли Н. Математика в биологии и медицине: Пер. с англ. — М.: Мир, 1970. — 326 с.
3. Военная токсикология, радиология и медицинская защита / Под ред. С.А. Куценко. — СПб.: Фолиант, 2004. — 528 с.
4. Гуськова Т.А. Токсикология лекарственных средств. — М.: Издательский дом «Русский врач», 2003. — 154 с.
5. Даренская Н.Г., Ушаков И.Б., Иванов И.В., Насонова Т.А., Есауленко И.Э., Попов В.И. Экстраполяция экспериментальных данных на человека: принцип, подходы, обоснование методов и их использование в физиологии и радиобиологии. — М.-Воронеж: Истоки, 2004. — 232 с.
6. Куценко С.А. Основы токсикологии. — СПб.: Фолиант, 2004. — 720 с.
7. Методы определения токсичности и опасности химических веществ (токсикометрии) / Под ред. И.В. Саноцкого. — М.: Медицина, 1970. — 343 с.
8. Оценка воздействия вредных химических соединений на кожные покровы и обоснование предельно-допустимых уровней загрязнения кожи: Методические указания № 2102-79. — М., Минздрав СССР, 1980. — 23 с.
9. Пиотровский В.К. Метод статистических моментов и интегральные модельно-независимые параметры фармакокинетики // Фармакол. и токсикол., 1986. — № 5. — С. 118–127.
10. Прозоровский В.Б. Практическое пособие по ускоренному определению средних эффективных доз и концентраций биологически активных веществ. — Байкальск, 1994. — 46 с.
11. Прозоровский В.Б. Индекс гарантированной защиты — новый показатель эффективности антитодов // Токсикол. вестник., 1999. — № 4. — С. 10–14.
12. Руководство по контролю за ядами / Всемирная организация здравоохранения. — М.: Медицина, 1998. — 113 с.
13. Соловьев В.И., Фарсов А.А., Филев В.А. Фармакокинетика. — М.: Медицина, 1980. — 423 с.
14. Токсикометрия химических веществ, загрязняющих окружающую среду / Под ред. А.А. Каспарова, И.В. Саноцкого. — М.: Центр международных проектов ГКНТ, 1986. — 426 с.
15. Трахтенберг И.М., Сова Р.Е., Шефтель В.О. и др. Проблема нормы в токсикологии. — М.: Медицина, 1991. — 208 с.
16. Уланова И.П., Сидоров К.К., Халепо А.И. К вопросу об учете поверхности тела экспериментальных животных при токсикологическом исследовании // Токсикология новых промышленных веществ. — Вып. 10. — Л.: Медицина, 1968. — С. 18–25.

ГЛАВА 54

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ – ПЕРЕНОСЧИКОВ КИСЛОРОДА

*Составители: д. м. н., проф. Н.С. Сметанина; д. м. н. А.Н. Богданов;
академик РАМН Г.А. Софронов; к. б. н. Н.Н. Пшенкина; к. фарм. н. Д.В. Сомов;
д. м. н. О.Л. Верстакова*

Введение

В данных рекомендациях рассматриваются подходы к методикам доклинической оценки сравнительно нового класса кровезаменителей — модифицированных растворов гемоглобина и фторорганических (перфторуглеродных) эмульсий.

Официального документа, посвященного данной проблеме, до настоящего времени в Российской Федерации не существовало. Вместе с тем в мировой практике известен документ «Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitutes», которому на настоящий момент FDA присвоило статус официального проекта (draft guidance). Основными положениями данного документа рекомендовано пользоваться разработчикам и производителям кровезаменителей подобного типа при проведении доклинической оценки как уже известных, так и вновь создаваемых препаратов. Следует отметить, что кровезаменители данного класса в настоящее время приобретают все большую важность в мировой практике и исследования в этом направлении ведутся достаточно широко. Данные препараты нашли применение в реаниматологии, кардиохирургии, трансплантологии и других отраслях медицины.

При разработке представленного проекта методических рекомендаций был учтен мировой опыт использования кровезаменителей данного типа. Настоящий проект рекомендаций гармонизирован с вышеуказанным руководящим документом FDA в части IV. Recommendations — Preclinical evaluation, однако не является его аутентичным переводом. При разработке проекта настоящих методических рекомендаций были также учтены рекомендации отечественных методических документов, в том числе Методических рекомендаций по доклиническим исследованиям безопасности ЛС.

Методические рекомендации состоят из вводной части, в которой приведены краткие сведения о модифицированных растворах гемоглобина и фторорганических (перфторуглеродных) эмульсиях и основной части «Экспериментальное изучение кровезаменителей», разделенной на два подраздела: первый посвящен исследованиям *in vitro* (оценке физико-химических свойств данных препаратов), второй — исследованиям *in vivo*, проводимых на животных с целью определения эффективности и безопасности исследуемых препаратов.

1. Краткие сведения о кровезаменителях-переносчиках кислорода

Кровезаменители-переносчики кислорода (Oxygen therapeutics) — отдельный класс кровезаменителей, обеспечивающих одну из важнейших функций нативной крови — кислородтранспортную.

Используемые сегодня кровезаменители-переносчики кислорода относятся к двум основным классам: модифицированные растворы гемоглобина и фторорганические (перфторуглеродные) эмульсии. Современные препараты этих классов не обладают вы-

раженной токсичностью, отличаются достаточной кислородной емкостью и высокой способностью отдавать кислород в тканях. Реологические, осмотические и гемодинамические свойства современных препаратов приближаются к характеристикам нативной крови, что позволяет им в течение некоторого времени успешно заменять кровь при выполнении ее кислородтранспортной функции.

При этом искусственные препараты позволяют избежать различных проблем, связанных с использованием нативной крови, таких как серологическая совместимость, возможность инфицирования донорской крови, религиозные или национальные аспекты.

Модифицированные растворы гемоглобина производятся на основе стромсвободного гемоглобина (stroma-free hemoglobin (SFH), хроматографически очищенного человеческого или свиного гемоглобина или рекомбинантного гемоглобина. Полученные вещества обычно подвергаются дополнительной химической или биологической обработке с образованием кластеров или полимеров гемоглобиновых молекул, соединенных внутри- или межмолекулярными связями, гемоглобиновых молекул, закрепленных на небелковых носителях, или биологически стабилизированных гемоглобиновых молекул. Известны также технологии стабилизации гемоглобина внутри липосомальных частиц.

Фторорганические препараты созданы на основе насыщенных углеводородных соединений алифатического или циклического ряда, в которых атомы водорода полностью замещены на атомы фтора. В некоторых веществах также присутствуют другие элементы, например бром. В связи с нерастворимостью данных соединений в воде ЛП на их основе готовят в виде эмульсий в растворах электролитов, стабилизированных поверхностно-активными веществами. Фторорганические кровезаменители способны растворять большие количества кислорода без образования химической связи.

Результаты исследований показали, что перфторан оказывает различное влияние на фармакокинетику лекарственных веществ при их комплексном применении. В соответствии с характером модифицирующего действия кровезаменителя выделены 3 типа фармакокинетических реакций при совместном использовании с перфтораном: уменьшение, отсутствие изменений и увеличение концентраций ЛС в крови. Клиническое значение модифицирующего действия перфторана может быть двояким. С одной стороны, сорбция ЛС частицами эмульсии в дополнение к связыванию с белками крови увеличивает депонирование лекарственных веществ, то есть защищает их от разрушения и «утечки» в процессе транспортировки. Поскольку степень средства лекарственных веществ к частицам эмульсии гораздо ниже, чем к специфическим рецепторам, при достижении мишени лиганд будет предпочтительно вступать во взаимодействие с рецепторными структурами. Перфторан неконкурентоспособен по сравнению с рецепторами, но он может обеспечить более полную и адресную доставку лиганда к специфической мишени. С другой стороны, лекарственное вещество, находясь в комплексе с перфтораном, может более длительно циркулировать в крови, постепенно переходя в ткани, в результате чего достигается эффект, аналогичный тому, который имеет место при использовании пролонгированных лекарственных форм — более мягкое, но продолжительное действие. Особо следует подчеркнуть, что эмульсии перфторана, в том числе перфторан, в силу своей химической инертности не оказывают модифицирующего действия на химическую структуру лекарственных веществ и не изменяют их специфического фармакологического действия. Модифицирующий эффект перфторана касается лишь изменения действующих концентраций и времени циркуляции в крови.

2. Экспериментальное изучение кровезаменителей-переносчиков кислорода

При проведении доклинического изучения кровезаменителей-переносчиков кислорода необходимо обращать особое внимание на тщательное исследование свойств самого продукта и на оценку его безопасности в исследованиях на животных.

2.2. Изучение физико-химических свойств кровезаменителей

Исследование должно включать нижеприведенные тесты, но не обязательно ограничиваться ими.

2.2.1. Кислородная емкость:

- а) сродство к кислороду (р50);
- б) расчет коэффициента Хилла;
- в) проверка выполняемости эффекта Бора;
- г) хлоридный и углекислый эффекты.

Следует составить кривую зависимости концентрации связанного кислорода от парциального давления кислорода, по крайней мере в зоне физиологически важного давления (от 40 до 120 мм. рт. ст.).

2.2.2. Оптический спектр.

2.2.3. Методы качественного и количественного определения препарата в физиологических жидкостях (возможно использование ВЭЖХ, гель-электрофореза, изоэлектрического фокусирования и других аналитических методов).

2.2.4. Методы качественного и количественного определения липидов и фосфолипидов в препарате.

2.2.5. Содержание бактериальных эндотоксинов.

2.2.6. Содержание ионов железа.

2.2.7. Содержание метгемоглобина, сульфогемоглобина, карбонмонооксигемоглобина.

2.2.8. Осмотическое давление и вязкость раствора препарата при различных температурах (необходимо для оценки возможности использования препарата при гипотермии).

2.2.9. Уровень рН.

2.2.10. Методы качественного и количественного определения примесных катионов и анионов.

Также следует провести серию биологических исследований *in vitro* с использованием адекватных тест-систем для оценки следующих возможных реакций:

2.2.11. Активации реакции образования свободных радикалов.

2.2.12. Активации каскадных ферментативных и клеточных реакций, в том числе реакции активации комплемента, каскада реакций свертывания крови, кининовых реакций, активации тромбоцитов, макрофагов, нейтрофилов, реакций выброса нейрогуморальных медиаторов, например, гистамина, производных тромбоксана, лейкотриенов, интерлейкинов.

Исследования, проводимые на этой стадии, не обязательно должны включать анализ по всем вышеприведенным тестам на всех стадиях производства препарата, однако рекомендуется провести статистически обоснованное выборочное исследование на различных сериях производства препарата, с тем чтобы подтвердить его безопасность и устойчивость данных характеристик.

Из вышеприведенных исследований должна быть сделана обоснованная выборка тестов, предназначенных для включения в посерийную спецификацию на продукт, а также выборка тестов, предназначенных для включения в протоколы исследования стабильности препарата при закладке на хранение и после определенных временных интервалов при исследовании стабильности в условиях ускоренного старения и при хранении в обычных условиях.

Для модифицированных растворов гемоглобина следует разработать метод оценки *in vitro* активности препарата, который позволит определять его биологическую активность. Этот метод должен быть адекватен для оценки данных, полученных в ходе КИ, и отражать как минимум способность препарата связывать, транспортировать и отдавать кислород.

2.3. Изучение свойств кровезаменителей-переносчиков кислорода в исследованиях на животных

Исследования рекомендуется проводить на нескольких видах животных, обязательно должны быть включены крупные животные, например, собаки или свиньи. Дизайн ис-

следований должен включать в себя введение животным дозы препарата, явно вызывающей токсические эффекты.

При проведении исследований кровезаменителей следует обязательно проводить оценку иммунореактивности препарата, например, по повышению уровней содержания иммуноглобулинов IgG или IgE при однократном введении продукта или по выявлению отдаленной гиперчувствительности при курсовом введении.

2.3.1. Использование животных моделей в исследовании токсичности

1. Основные исследования.

Изучение безопасности препаратов данной группы проводится в основном согласно рекомендациям соответствующих методических указаний по доклиническим исследованиям безопасности ЛС — Руководства по проведению доклинических исследований ЛС. Однако при изучении острой и хронической токсичности препаратов этой группы следует учитывать объемы вводимых жидкостей, концентрацию растворов, их вязкость и период полувыведения. Учитывая эти особенности, при планировании данных исследований следует руководствоваться критериями, приведенными в Методических рекомендациях по доклиническому изучению противошоковых (гемодинамических) кровезаменителей, и Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия ЛС.

2. Дополнительные исследования.

Следует принять во внимание, что исследования, включающие в себя объемные инфузии или частичные переливания больших объемов препаратов кровезаменителей, имеют ограниченную ценность при оценке токсичности данных препаратов. Необходимо учитывать, что исследования подобного дизайна могут помочь рассчитать соотношения доз препарата, вызывающих терапевтический и токсический эффекты, или послужить моделью для состояний, при которых показано назначение кровезаменителей, однако такие исследования не в полной мере отражают физиологическую картину реальных клинических состояний.

Некоторые аспекты безопасности данных препаратов могут быть изучены на здоровых животных, однако для адекватной всесторонней оценки безопасности кровезаменителей необходимо использование животных, у которых заранее смоделированы различные патологические состояния, отражающие нарушения, возникающие в организме человека при реальных клинических состояниях, например, модель травматической гиповолемии, модель ишемии при ангиопластике, модель септического шока при синдроме эндогенной интоксикации, модель экстракорпорального кровообращения для сердечно-сосудистой хирургии и т.д. При проведении исследования на таких моделях необходимо сочетанное назначение испытуемого препарата с комплексом других препаратов, назначаемых при данных вмешательствах, например, введение контрастных препаратов при исследовании на модели чрескожной коронарной ангиопластики. Препаратами сравнения при использовании таких моделей могут быть как одобренные кровезаменители-переносчики кислорода, так и препараты нативной плазмы.

Следует также провести исследование на модели реперфузионного повреждения. Такая модель позволит изучить действие препарата при патологических состояниях, имеющих ишемический компонент.

2.3.2. Использование животных моделей в исследовании специфической активности

Дизайн любого исследования должен включать в себя определение нижеприведенных параметров, но не обязательно ограничиваться ими.

1. Для модифицированных растворов гемоглобина — влияние на микроциркуляцию и эндотелий.

2. Нефротоксичность препарата. Следует учитывать, что оценки уровня креатинина плазмы и кровяного азота мочевины недостаточно для оценки нефротоксичности препара-

та. Всестороннюю оценку функции почек можно провести с использованием нескольких исследований, таких как: прямые исследования давления и кровяного потока в почечных артериях (оценка вазоконстрикции), тесты на скорость экскреции (например, инулиновый тест), гистологическое исследование гломерулярной функции и структуры. Вследствие различной скорости выведения креатинина у разных животных клиренс креатинина не может являться единственным достоверным показателем гломерулярной функции почек, и исследование нельзя ограничивать только оценкой клиренса креатинина.

3. Исследование клубочковой протеинурии и ферментурии для оценки клубочковой фильтрации и возможного поражения клубочков.

4. Биохимические исследования крови, включая анализы содержания аланинаминотрансферазы, аспаратаминотрансферазы, креатинфосфокиназы, тропонинов I и T, лактатдегидрогеназы, креатинина, азота мочевины и электролитов. При проведении данных исследований необходимо учитывать, что препараты гемоглобина могут давать ложные результаты при колориметрических методах исследования.

5. Гематологические исследования, включая гематокрит, содержание гемоглобина, лейкоцитарный состав, содержание тромбоцитов, протромбиновое время, анализ активированного частичного тромбопластинового времени, содержание продуктов деградации фибриногена/фибрина, содержание фактора свертывания крови VIII.

6. Визуальное и микроскопическое исследование всех жизненно важных органов после завершения исследования и эвтаназии животного.

Дополнительные исследования для модифицированных растворов гемоглобина.

7. Определение маркеров оксигенного повреждения тканей. Препараты, содержащие гемоглобин, должны быть проверены на оксидантный потенциал с помощью простых биохимических тестов. Данное исследование представляется важным в плане оценки возможного оксигенного повреждения тканей в ходе свободно-радикальных реакций, активированных гемом или ионами железа.

8. Определение кардиотоксичности препарата с использованием приматов в качестве модели животных. Модель должна быть достаточно чувствительной для определения дегенеративных изменений в кардиомиоцитах. Гистологическое исследование миокарда должно обязательно включать оценку состояния сосковидных мышц, межжелудочковой перегородки и проводящей системы.

9. Определение время- и дозозависимых эффектов препарата на нейроны. Исследования должны проводиться на модели инсульта или травматического повреждения головного мозга при условии проницаемости гематоэнцефалического барьера.

10. В препаратах, созданных на основе очищенного гемоглобина или химически модифицированного гемоглобина, должно быть оценено содержание остаточных эритроцитарных ферментов, которые могут влиять на транспортную или окислительно-восстановительную функции готового препарата.

Все используемые аналитические методы должны быть валидированы в соответствии с Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (2007). При этом особое внимание следует уделить оценке специфичности аналитических методик, учитывая, что при использовании колориметрических методов препараты модифицированного гемоглобина могут приводить к получению ложных результатов. Разработчикам и производителям кровезаменителей-переносчиков кислорода следует уделять особое внимание и поддерживать работы по разработке новых аналитических методов оценки препаратов данного типа.

Дополнительные исследования для фторорганических (перфторуглеродных) эмульсий.

11. Определение степени воздействия на тромбоциты, в частности на время циркуляции тромбоцита в кровеносном русле, и определение маркеров тромбоцитарной функции.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении

правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Criteria for Safety and Efficacy Evaluation of Oxygen Therapeutics as Red Blood Cell Substitutes – draft guidance – U.S. Department of Health and Human Services, Food and Drug Administration, Center for Biologics Evaluation and Research, October 2004.
2. Рагимов АА., Еременко АА., Никифоров ЮВ., Трансфузиология в реаниматологии – М.: МИА, 2005.
3. Blood Substitutes and Oxygen Carriers, ed. by T.M.S.Chang – Informa Health Care, 1992.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / 2-е изд., перераб. и доп. – М.: Медицина, 2005.
5. Методические рекомендации по оптимизации схем сочетанного применения перфторана и лекарственных средств в клинической практике // М.: Министерство обороны Российской Федерации. Главное военно-медицинское управление, 2010. – 32 с.
6. Селиванов Е.А., Пшенкина Н.Н., Мурзина Е.В., Софронов Г.А., Ханевич М.Д., Сарычев В.А. Состояние разработки и внедрения кровезаменителей на основе гемоглобина // Медицинский академический журнал, 2011. – Т. 11, № 2. – С. 40–60.

ГЛАВА 55

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ПРОТИВОШОКОВЫХ (ГЕМОДИНАМИЧЕСКИХ) КРОВЕЗАМЕНИТЕЛЕЙ НАПРАВЛЕННОГО И ПОЛИФУНКЦИОНАЛЬНОГО ДЕЙСТВИЯ

*Составители: к. б. н. А.С. Насонов, к. б. н. Н.Н. Пшенкина;
академик РАМН Г.А. Софронов; к. фарм. н. Д.В. Сомов; д. м. н. О.Л. Верстакова*

Введение

Кровезаменители — ЛП, которые при внутривенном введении могут заменять лечебное действие крови или отдельных ее компонентов.

Гемодинамические (противошоковые, плазмозамещающие) кровезаменители — группа препаратов, предназначенных для заполнения кровяного русла и восстановления гемодинамики.

Основным показанием к применению гемодинамических кровезаменителей является гиповолемический шок — патологическое состояние, обусловленное снижением объема циркулирующей крови (ОЦК) вследствие кровопотери (геморрагический или травматический шок) или дегидратации (ожоговый шок или шок, вызванный потерей жидкости при патологической рвоте или диарее).

Решающим звеном патогенеза при гиповолемическом шоке является нарушение гемодинамики. С целью поддержания артериального давления в жизненных пределах происходит вазоконстрикция и ограничение перфузии периферических органов и тканей, в которых развивается гипоксия, нарушается обмен веществ, включаются процессы анаэробного метаболизма, развивается молочнокислый ацидоз, появляются признаки полиорганной недостаточности и т.д. Защитная реакция организма, связанная с развитием гиперкоагуляции, может при вести к тяжелой патологии (ДВС-синдрому).

Полноценная, своевременная и адекватная инфузионная терапия, в значительной мере определяющая успех всего комплекса противошоковых мероприятий, базируется на поэтапном использовании кровезаменителей различного действия, а также донорской крови и ее компонентов. Необходимо отметить, что в последнее время искусственные кровезаменители активно вытесняют препараты нативной крови по экономическим, религиозным, инфекционным и прочим соображениям.

Конечной целью инфузионной терапии является восстановление нарушенных функций организма, в первую очередь кровообращения, газообмена, водно-солевого обмена, кислотно-щелочного баланса, нейтрализация и выведение токсических продуктов.

Золотым стандартом для гемодинамических кровезаменителей можно считать природный коллоидный раствор белка альбумина.

1. Гемодинамические кровезаменители

Сегодня в мировой практике используются препараты следующих групп:

- препараты на основе желатина,
- препараты на основе декстрана,
- препараты на основе полиэтиленгликоля,

— препараты на основе гидроксиэтилкрахмала.

Ни один из используемых в настоящее время препаратов не признан идеальным, поэтому поиск новых средств данной группы является актуальной задачей.

Все вновь разрабатываемые препараты по своей лечебной эффективности должны превосходить кровезаменители, применяющиеся в лечебной практике, или должны обладать дополнительными положительными свойствами.

Противошоковые кровезаменители должны:

— быстро восстанавливать артериальное давление, объем циркулирующей крови, минутный объем кровообращения и другие гемодинамические показатели;

— восстанавливать кровообращение в микроциркуляторном сосудистом русле, устранять тканевую гипоксию;

— иметь достаточно длительное время полувыведения из сосудистого русла (не менее 6–12 ч);

— улучшать реологические показатели крови;

— улучшать доставку кислорода и других компонентов;

— легко метаболизироваться, не накапливаться в тканях, легко выводиться из организма;

— оказывать минимальное активирующее воздействие на иммунную систему;

— препарат должен быть стерильным, апиrogenным, нетоксичным, содержать допустимый уровень бактериальных эндотоксинов;

— препарат должен выдерживать критические воздействия окружающей среды.

Разработка новых противошоковых препаратов включает большой комплекс различных исследований: литературный и патентный поиск; разработку технологии получения основного химического соединения, предназначенного для получения на его основе кровезаменителя; изучение физико-химических свойств соединения; биологический скрининг с целью выбора оптимального по свойствам соединения и установление допустимых отклонений в физико-химических параметрах; разработку и валидацию метода получения лекарственной формы, обеспечивающего получение стабильного стандартного препарата; изучение физико-химических показателей лекарственной формы; разработку и валидацию методов контроля качества препарата, углубленное экспериментальное изучение препарата (фармакодинамика, фармакокинетика, токсичность).

Настоящие методические рекомендации подготовлены с учетом Методических указаний по экспериментальному изучению противошоковых кровезаменителей направленного и полифункционального действия Минздрава СССР 1984 г. [5].

2. Экспериментальное изучение гемодинамических (противошоковых, плазмозамещающих) кровезаменителей

2.1. Общие положения

По сравнению с другими ЛС, применяемыми внутривенно, кровезаменители обладают рядом специфических свойств, которые обуславливают особенности доклинического экспериментального изучения препаратов этой группы.

Основное назначение кровезаменителей — восстановление объема утраченной плазмы крови, в связи с чем физико-химические параметры препарата должны быть близки плазме крови по вязкости, изотоничности, коллоидно-осмотическому давлению и т.д. Кроме того, волеическое действие, а следовательно, и время циркуляции препарата в сосудистом русле должно быть достаточно длительным (не менее 6–12 ч), чтобы обеспечить функцию плазмы по поддержанию коллоидно-осмотического давления в самый опасный период после кровопотери. Учитывая эти требования, кровезаменители имеют следующие специфические особенности, не свойственные другим препаратам:

— вводятся внутривенно и внутриартериально, капельно или струйно;

- вводятся в больших объемах (400 мл–2000 мл), что значительно превышает дозы других ЛС;
 - достаточно длительно циркулируют в кровеносной системе (50% от введенной дозы должно удерживаться в циркуляции около 6–12 ч);
 - обладают способностью к удержанию воды в сосудистом русле (20–25 мл/г вещества и более);
 - имеют достаточно широкое молекулярно-массовое распределение и высокую среднюю молекулярную массу;
 - используются в виде коллоидных растворов.
- Экспериментальное изучение новых кровезаменителей включает:
- доказательства преимуществ нового препарата перед известными кровезаменителями при лечении острой кровопотери и шока в модельных исследованиях на собаках;
 - изучение фармакокинетики;
 - анализ безвредности (острая и хроническая токсичность, влияние на свертывающую систему крови и иммунную систему, местное раздражающее действие, выявление специфических видов токсичности).

2.2. Изучение специфической активности (эффективности) гемодинамических (противошоковых, плазмозамещающих) кровезаменителей

С целью выявления особенностей и преимуществ предлагаемого препарата в сравнении с известными и хорошо изученными препаратами аналогичного действия, применяемыми в медицинской практике, проводятся доклинические исследования кровезаменителей на животных.

Кровезаменители должны обеспечить выживание пострадавших (тяжелых больных после массивной кровопотери и в шоковом состоянии), поэтому доклиническое изучение препаратов этой группы проводится в условиях, максимально приближенных к реальной обстановке на моделях шокового синдрома у собак (обязательно) и других видах животных (кошки, кролики). Контрольные животные (без лечения) после моделирования шока или острой смертельной кровопотери как правило погибают.

Во всех исследованиях по моделированию шока на животных применяют методы обезболивания (нембутал внутримышечно), эвтаназия животных проводится передозировкой наркотика в соответствии с приложением 3 и 4 к Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных (приказ МЗ СССР № 755 от 12.08.77 г.). В соответствии с этим приказом «все эксперименты с нанесением животному болезненных ощущений, включая эксперименты по изучению шока, должны проводиться с отключением сознания у животных».

Следует отметить, что наркотизирование животных отключает сознание, но не препятствует развитию тяжелых гемодинамических нарушений, характерных для шока и острой кровопотери, и на купирование которых направлено применение кровезаменителей. О глубине шока судят на основании ряда объективных физиологических тестов, описанных ниже.

Наблюдения над животными после проведения лечения следует проводить не менее чем 24 ч, при этом необходимо регистрировать количество погибших и выживших животных и сроки их гибели. Общее число животных в каждой серии (без лечения, лечение контрольным препаратом, лечение испытываемым препаратом) должно быть не менее 10 для получения статистически достоверных результатов (для собак — не менее 5).

2.2.1. Изучение специфической активности на модели острой кровопотери

Острая кровопотеря вызывает необратимые гемодинамические нарушения, степень тяжести которых зависит от скорости кровотока и величины кровопотери. Наиболее точными показателями глубины нарушений гемодинамики при острой кровопотере является ОЦК и центральное венозное давление.

Исследования выполняются на собаках в максимально жестких условиях. У животных производят эксфузию крови из бедренной артерии в объеме не менее 50 мл/кг в течение 10–20 мин. Кровотечение прекращают после того, как артериальное давление падает до нуля, кровь из бедренной артерии не поступает или поступает каплями, возникают резкие нарушения электрокардиограммы, выраженные расстройства ритма дыхания. К лечению приступают сразу после эксфузии крови. Исследуемый препарат (или контрольный) вводят в бедренную вену в объеме, равном количеству изъятой крови, причем первую треть объема вводят струйно, а остальное количество — капельно.

Эффективность восстановления кровообращения под влиянием противошоковой терапии контролируется путем регистрации следующих основных показателей:

- системное артериальное давление (измеряется в аорте, в общей сонной или бедренной артерии ртутным манометром или калиброванным электроманометром);
- центральное венозное давление (регистрируется в правом предсердии водно-солевым манометром или калиброванным электроманометром низкого давления);
- объем циркулирующей крови, плазмы, эритроцитов (определяется методом разведения красителя Т-1824 или с помощью радиоактивных индикаторов — альбумина 1131 и др.);
- минутный объем кровообращения (определяется методом разведения индикаторов или термодилуции или прямым методом Фика);
- электрокардиограмма (с помощью электрокардиографа любого типа, учитываются особенности расшифровки кардиограммы у животных);
- частота сердечных сокращений (подсчитывается путем анализа электрокардиограммы);
- ударный объем сердца (рассчитывается на основе показателей минутного объема и частоты сердечных сокращений);
- общее периферическое сопротивление (рассчитывается на основе показателей системного артериального давления и минутного объема кровообращения);
- регионарный кровоток (определяют кровоток в почках, печени и коже);
- микроциркуляция (биомикроскопическое исследование кровотока в микрососудах одного или нескольких сосудистых регионах: бульбарной конъюнктиве, брыжейке кишечника, слизистой защечного мешка, оценивается общий уровень перфузии микрососудов, характер кровотока, наличие и степень внутрисосудистой агрегации эритроцитов);
- реологические свойства крови (относительная вязкость, зависимость вязкости от скорости сдвига, предел текучести крови, показатель агрегации эритроцитов);
- система свертывания крови;
- кислотно-щелочное состояние (актуальный рН артериальной и венозной крови, парциальное давление углекислого газа, стандартный бикарбонат, сумма буферных оснований, избыток или дефицит оснований).

Инфузия противошокового кровезаменителя должна обеспечивать восстановление нарушенных показателей системной гемодинамики, регионарного кровотока, микроциркуляции, кислотно-щелочного состояния до исходного уровня или близких к нему величин. Длительность устойчивого поддержания физиологических показателей после проведенного лечения должна составлять не менее 24 ч.

2.2.2. Изучение специфической активности на модели геморрагического шока

Пролонгированную постгеморрагическую гипотензию, характеризующуюся комплексом глубоких нарушений гемодинамики и микроциркуляции, принято трактовать как геморрагический шок. Модель такого шока на животных разработана Уиггерсом (Wiggers, 1950).

Пролонгированная постгеморрагическая гипотензия по Уиггерсу достигается путем эксфузии крови. Первоначально кровотечение осуществляют струйно — до снижения ар-

териального давления (АД) до 40 мм рт. ст. Этот уровень АД поддерживают в течение 1,5–3,0 ч за счет дополнительных дробных кровопусканий (по 10–30 мм). В процессе исследования прослеживается ряд периодов: относительной компенсации, нарушенной компенсации, декомпенсации.

К лечению шока внутривенным введением испытуемого кровезаменителя (или контрольного препарата) приступают, когда АД спонтанно снижается ниже 30 мм рт. ст. При лечении объем введенного препарата должен быть равен объему изъятной крови, причем первая треть объема вводится струйно, остальное — капельно. Регистрируются показатели гемодинамики, микроциркуляции, кислотно-щелочного баланса др. в соответствии с требованиями, указанными выше.

2.2.3. Изучение специфической активности на модели травматического шока

Моделирование шока осуществляют путем травмирования мягких тканей бедра по методу Кеннона (Cannon, 1923). Предварительно животных сенсibilизируют к травме кровопусканием в объеме 1% от массы тела. Затем проводят серию сильных тупых ударов по мягким частям бедра. Травму прекращают после снижения уровня артериального давления до 55–60 мм рт. ст. В этих условиях развивается шок III степени. К лечению приступают в торпидной фазе шока после окончания периода стабилизации. Лечение шока проводят так же, как лечение острой кровопотери. Регистрируются аналогичные показатели гемодинамики, микроциркуляции и др.

2.2.4. Изучение специфической активности на модели ожогового шока

Моделирование ожогового шока проводят путем нанесения термической травмы на кожу спины или задних конечностей. Применяют ожог пламенем горящего спирта, кипящей воды или нагревательными приборами. Температура под кожей в момент нанесения травмы должна достигать 55–60°С. Глубина поражения — IIIа–IIIб степени.

Площадь ожогового поражения — 30–40% общей поверхности тела.

В этих условиях развивается тяжелый ожоговый шок, характеризующийся уменьшением объема циркулирующей крови, снижением минутного объема кровообращения, нарушением органного кровотока, микроциркуляции, водного и электролитного обмена и кислотно-щелочного состояния. АД при ожоговом шоке снижается незначительно. К лечению ожогового шока внутривенным введением испытуемого (или контрольного) препарата приступают через два часа после ожоговой травмы. Лечение проводится аналогично терапии геморрагического шока и острой кровопотери. Оценка лечебного действия проводится по параметрам, описанным выше.

Следует подчеркнуть, что при проведении модельных исследований на собаках обязательной является регистрация выживаемости животных после лечения испытуемым и контрольным препаратом в сравнении с выживаемостью без лечения.

Целесообразно в этом разделе исследований предусмотреть проведение серии исследований по анализу совместимости нового кровезаменителя с другими ЛС, обычно применяемыми при лечении шока.

2.3. Изучение токсичности гемодинамических (противошоковых, плазмозамещающих) кровезаменителей

Изучение безопасности препаратов данной группы проводится в основном согласно рекомендациям соответствующих методических указаний по доклиническим исследованиям безопасности ЛС настоящего Руководства. Однако, при изучении острой и хронической токсичности препаратов этой группы следует учитывать объемы вводимых жидкостей, концентрацию растворов, их вязкость и период полувыведения. Учитывая эти особенности кровезаменителей, разработаны специальные схемы изучения острой и хронической токсичности препаратов этой группы.

2.3.1. Изучение острой токсичности

При определении средней смертельной дозы (LD_{50}) следует учитывать высокую вязкость кровезаменителей, большие объемы терапевтических доз (до 2 л) и исключительно внутривенный способ введения препаратов этой группы.

Поскольку кровезаменители, как правило, обладают высокой вязкостью (соответствующей вязкости крови), при определении LD_{50} целесообразно применять растворы, в которых содержание вещества не более чем в два раза превышает концентрацию его в лекарственной форме. При инфузии более концентрированных растворов (например, 20%) гибель животных наступает не из-за токсичности вещества, а из-за тромбозов кровеносных сосудов вязкими растворами. Объем раствора, как правило, не должен превышать 1 мл для мышей массой 18–22 г, 3 мл — для крыс массой 150–200 г, 50 мл — для кроликов массой 1,5–2,5 кг. Расчет LD_{50} следует проводить по общепринятым методам.

2.3.2. Изучение хронической токсичности

Противошоковые кровезаменители предназначены для возмещения дефицита объема циркулирующей крови, утраченной при шоке и кровопотере, объемы препаратов этой группы, как правило, очень большие (до 2 л) вводятся однократно и длительно удерживаются в циркуляции благодаря высокой молекулярной массе (через сутки в крови содержится до 30% от введенного количества препарата). Исходя из этих особенностей кровезаменителей, для предотвращения волемиического шока при изучении хронической токсичности кровезаменителей их целесообразно вводить не каждый день, а с интервалом 48 ч в течение 2-х недель.

Примерные дозы для изучения хронической токсичности кровезаменителей: минимальная — 5–10 мл/кг, промежуточная — 20–30 мл/кг, высшая — учитывающая возможность развития токсических эффектов — 50 мл/кг. Эти дозы соответствуют минимальной и максимальной терапевтическим дозам кровезаменителей (400 мл–2000 мл), а также учитывают влияние на организм избыточной дозы (3,5–4,0 л).

В исследование включается контрольная группа животных которым вводится известное ЛС, группа интактных животных (для контроля скрытой патологии), а также отставленная группа животных (подвергается эвтаназии через месяц после курса введенной избыточной дозы — 50 мл/кг — для контроля отдаленных последствий передозировки препарата).

При изучении хронической токсичности у животных регистрируется функциональное состояние внутренних органов в соответствии с Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия ЛС. При этом, учитывая данные фармакологических исследований, особое внимание следует уделять микроскопическому исследованию внутренних органов, в которых депонируется определенное количество препарата (печень, селезенка, лимфатические узлы, почки, легкие). Изменения в данных органах после введения кровезаменителей носят, как правило, специфический характер, в связи с чем микроскопическое изучение этих органов рекомендуется проводить по единой схеме, обращая внимание на следующие детали.

Печень:

- состояние цитоархитектоники долек: отсутствие или наличие признаков дисконфлексии печеночных балок;
- степень кровенаполнения сосудов, синусоидных капилляров, размеры пространства Диссе;
- характеристика гепатоцитов: размеры клеток и ядер, наличие двуядерных клеток, степень дистрофии, наличие гликогена, жира, гемосидерина, липофуцина;
- характеристика звездчатых эндотелиоцитов (клеток Купфера): размеры, отсутствие или наличие включений;
- состояние порталных трактов: размеры, инфильтрация клеточными элементами.

Почки:

— характеристика клубочков: размеры, кровенаполнение капилляров, размеры просвета капсулы, отсутствие или наличие в просвете эритроцитов, масс белка, толщина капсулы Боумена;

— характеристика канальцев проксимального и дистального отделов, петли Генле, собирательных канальцев: состояние эпителия, отсутствие или наличие в просвет канальцев клеток, масс белка;

— состояние стромы, степень кровенаполнения сосудов.

Селезенка:

— характеристика лимфатических фолликулов: количество, размеры, отсутствие или наличие герминативных центров, степень выраженности маргинальной зоны и короны, их клеточный состав;

— характеристика красной пульпы: кровенаполнение сосудов, клеточность пульпарных тяжей, состав клеток, содержание макрофагов, иммунобластов, плазматических клеток, пигмента;

— состояние капсулы, трабекул, фолликулярной артерии.

Лимфатические узлы:

— характеристика лимфатической ткани коркового и мозгового слоев: клеточность, состояние фолликулов коркового слоя, содержание макрофагов, иммунобластов, плазматических клеток;

— состояние краевого, межуточного и мозгового синусов: размеры просвета, степень гиперплазии и сдувания эпителия синусов;

— степень кровенаполнения сосудов;

— состояние капсулы, трабекул, стенок сосудов и посткапиллярных венул.

Легкие:

— степень кровенаполнения и состояние сосудистой стенки;

— состояние бронхов и бронхиол;

— состояние стенок альвеол, наличие участков эмфиземы и ателектазов, степень сдувания альвеолоцитов;

— размеры перибронхиальных скоплений, наличие периваскулярных муфт.

Проводится также детальное описание микроскопической картины препаратов следующих внутренних органов животных: сердце, желудок, кишечник, костный мозг, гонады, поджелудочная железа.

2.3.3. Местнораздражающее действие

При исследовании токсичности нового кровезаменителя следует изучить его местное действие на стенку вены и на подкожную клетчатку. Проводится на кроликах. Животным (не менее 5) однократно внутривенно вводят терапевтическую дозу кровезаменителя (10 мл/кг). Сроки эвтаназии: через 24 ч, на 3–5 день, через 20–30 дней. Место введения исследуется с помощью гистологических методов.

2.3.4. Изучение влияния кровезаменителей на систему свертывания крови

Все препараты этой группы оказывают определенное влияние на систему свертывания крови, так как при введении больших объемов кровезаменителя происходит гемолиз, снижается содержание фибриногена и других факторов свертывания крови, а также числа тромбоцитов. Изучение целесообразно проводить как *in vitro* с донорской кровью, так и *in vivo* — в исследованиях на животных.

В опытах *in vitro* донорскую кровь смешивают с разными объемами испытуемого или контрольного препарата и анализируют изменение ряда параметров, характеризующих различные этапы процесса свертывания крови (общее время свертывания крови, время рекальцификации плазмы, тромбопластиновое время, содержание растворимого фибрина, активность XII фактора, концентрация фибриногена, фибринолитическая активность, содержание антиплазминов и др.).

Вместо этих тестов допускается проведение тромбопластографического исследования.

В исследованиях *in vivo* кровезаменитель вводят однократно в максимальной дозе — 50 мл/кг для кроликов, 3 мл — на крысу массой 150–200 г. Пробы крови анализируют в разные сроки после введения испытуемого или контрольного препарата (1 ч, 2, 3, 4 ч, 24, 48 ч и далее до нормализации тестируемых показателей). Анализируются те же показатели, что и в опытах *in vitro*.

2.3.5. Изучение специфических видов токсичности: канцерогенного и мутагенного действия, эмбриотоксичности, аллергизирующего действия и влияния на иммунитет

Проводится в соответствии с методическими рекомендациями настоящего Руководства.

2.4. Изучение фармакокинетики гемодинамических (противошоковых, плазмозамещающих) кровезаменителей

Лечебная эффективность и токсичность кровезаменителей в значительной степени определяется фармакокинетическими параметрами, включающими всасывание, распределение в тканях и жидкостях организма, биотрансформацию и выделение.

Лечебная эффективность противошоковых кровезаменителей в определенной степени зависит от длительности циркуляции в кровеносном русле. Это время должно быть достаточным для восстановления компенсаторных механизмов организма. Постепенно препарат выводится из сосудистого русла, и часть его покидает организм, а некоторое количество откладывается в депонирующих органах, где постепенно метаболизируется внутриклеточными ферментами.

В связи с этим при доклиническом изучении кровезаменителей обязательным является изучение периода полувыведения препарата из сосудистого русла, определение путей и скорости выведения препарата из организма, анализ локализации препарата в тканях, выявление мест кумуляции, изучение динамики перераспределения и удаления из тканей, а также способности метаболизироваться ферментными системами организма.

Для проведения этих исследований необходима разработка метода количественного определения ЛП, его ингредиентов в крови, моче, в тканях. Методы должны быть валидированы в соответствии с Руководством по валидации методик анализа лекарственных средств (2007).

При изучении фармакокинетики кровезаменитель вводится животным однократно внутривенно в предполагаемой терапевтической дозе (10–20 мл/кг).

После распределения препарата по кровеносной системе (4–5 мин) определяется его концентрация в крови. Образцы крови для анализа берутся через 1, 3, 5, 24 ч и затем ежедневно до полного исчезновения препарата из крови. Рассчитывается абсолютное содержание кровезаменителя в крови в разные сроки после его введения и относительное содержание в процентах по отношению к введенному. Результаты представляются в виде таблиц и графиков.

Главный путь выведения кровезаменителя, как правило, почки. Скорость почечной экскреции оценивают по содержанию препарата в суточной моче животных, получавших препарат. Целесообразно также оценивать выведение препарата через пищеварительный тракт и с выдыхаемым воздухом.

Введенный препарат и его метаболиты распределяются в организме в зависимости от его способности проникать через мембраны, связываться с белками и другими макромолекулами, а также от возможности их депонирования в тканях. Эти исследования целесообразно проводить с помощью гистохимических методов, позволяющих выявлять введенное вещество на клеточном уровне. Методы разрабатываются применительно к изучаемым препаратам.

Обязательным является исследование, устанавливающее возможность расщепления препарата ферментными системами организма. В том случае, если основой ЛС является

полимер природного происхождения, следует определить наличие в организме ферментов способных метаболизировать препарат. Эти исследования целесообразно начать с опытов *in vitro* с использованием очищенных ферментов или ферментов, приготовленных из гомогенатов тканей животных. Изучение продуктов реакции ферментативного гидролиза препарата дают возможность судить об участии введенных веществ в общем метаболизме организма. Если основой препарата является синтетический полимер, чуждый организму, то изучение его судьбы в организме следует проводить путем выделения полимера из крови, мочи и тканей и сравнительной оценки свойств введенного и выделенного продукта. На основании этих данных оценивается способность препарата к обменным реакциям и возможность удаления из организма.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Барышев Б.А. Кровезаменители: Справочник для врачей. — СПб.: Человек, 2001.
2. Carl J. Wiggers, M.D. Physiology of Shock. — The Commonwealth Fund. — New York, 1950.
3. Рагимов АА., Еременко АА., Никифоров ЮВ. Трансфузиология в реаниматологии — М.: МИА, 2005.
4. Братусь ВД., Шерман ДМ. Геморрагический шок. Патофизиологические и клинические аспекты. — К.: Наукова думка, 1989.
5. Методические указания по экспериментальному изучению противошоковых кровезаменителей направленного и полифункционального действия Минздрава СССР 1984 г. / Составители: Полушина Т.В., Хохлова М.П., Пушкарь Л.Н., Простакова Т.М., Матвиенко В.П., Гласко Е.Н., Садовникова С.Ф.

ГЛАВА 56

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ДОКЛИНИЧЕСКОМУ ИЗУЧЕНИЮ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ, РАЗРАБАТЫВАЕМЫХ НА ОСНОВЕ ПРИРОДНОГО СЫРЬЯ

*Составители: академик РАМН, проф. В.Г. Кукес; д. м. н. В.К. Колхир;
д. фарм. н., проф. Т.А. Сокольская; д. фарм. н., проф. В.Л. Багирова;
д. б. н., проф. С.А. Вишканова; д. м. н., проф. В.М. Булаев; д. м. н., проф. Е.Е. Лесиовская;
д. фарм. н., член-корр. РАМН, проф. И.А. Самылина; к. б. н. Л.В. Крепкова,
к. б. н. В.В. Бортникова; к. м. н. А.И. Мартынов; к. б. н. Н.М. Крутикова;
д. м. н., проф. Е.В. Ших; к. б. н. О.Е. Пасхина; д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев;
д. фарм. н., проф. Н.Д. Бунятян; Н.Г. Оленина*

Введение

Настоящие методические рекомендации содержат требования по объему доклинического изучения ЛС, разрабатываемых на основе растительного и животного сырья, продуктов пчеловодства, морепродуктов и других источников природного происхождения. Они являются частью общей программы доклинических фармакологических и токсикологических исследований, обязательных при разработке новых ЛС в Российской Федерации. Задачей данных методических рекомендаций является изложение принципов и объема доклинического изучения ЛС природного происхождения (ЛСПП). Рекомендации предназначены для специалистов различного профиля, занимающихся разработкой новых ЛС на основе сырья природного происхождения.

Существующий в мире высокий интерес к ЛСПП сопровождается повышением требований к их эффективности и безопасности, методам контроля их качества. По сравнению с синтетическими препаратами ЛСПП обладают рядом отличительных особенностей: они содержат, как правило, несколько биологически активных веществ, которые определяют основное фармакологическое действие препаратов; обладают широким спектром фармакологического действия; качество и эффективность ЛСПП во многом зависит от технологии их получения и т.д. Указанные особенности ЛСПП предъявляют повышенные требования к их стандартизации, при строгом соблюдении которых может быть гарантирована воспроизводимость заявляемых фармакологических эффектов и уровня безопасности ЛСПП.

Общие положения

Настоящие методические рекомендации являются описанием комплекса процедур, гарантирующих всестороннее изучение нового ЛСПП (определение фармакологической активности и необходимого объема токсикологических исследований) в соответствии с современными требованиями. Основой изучения являются стандартные операционные процедуры, соответствующие принципам Good Laboratory Practice (GLP). В данных методических рекомендациях введены требования по стандартизации фармакологически активных компонентов разрабатываемого ЛС и его фармакологическому исследованию в сравнении с уже зарегистрированным препаратом (стандартом) той же фармакологической группы в аналогичной лекарственной форме. Указанные требования позволяют отбирать новые ЛС природного происхождения, не уступающие по эффективности и безопасности уже разрешенным для медицинского применения.

При проведении доклинического изучения фармакологической активности и безопасности новых ЛСПП должно использоваться специализированное отечественное и зарубежное оборудование, сертифицированное в установленном порядке Минздравсоцразвития России. При фармакологическом изучении нового ЛСПП в качестве препаратов сравнения необходимо использовать только ЛС, зарегистрированные в установленном порядке в Минздравсоцразвития России.

Доклиническое изучение фармакологической активности и безопасности новых ЛСПП должно начинаться после решения всех вопросов, связанных со стандартизацией исходного сырья, субстанции и разработки готовой лекарственной формы. Необходимые показатели стандартизации должны быть зафиксированы в нормативных документах, включающих методы качественной и количественной оценки исходного сырья, субстанции и лекарственной формы. Образцы для доклинического изучения должны быть подготовлены по утвержденному регламенту.

Рекомендуемые тесты

Объем доклинического изучения фармакологической активности и токсикологического исследования ЛСПП может существенно отличаться для оригинальных препаратов (ранее не известных и не зарегистрированных в РФ) и препаратов, созданных по аналогии с известными ЛСПП и на основе уже разрешенного Минздравсоцразвития России лекарственного сырья.

Исходя из этих положений, ЛСПП, находящиеся на этапе доклинического изучения, можно разделить на следующие группы:

1. Оригинальные монокомпонентные ЛСПП, созданные на основе:

а) нового химического соединения, выделенного из разрешенных видов сырья природного происхождения;

б) нового (неофициального) вида сырья природного происхождения.

2. Оригинальные комплексные ЛСПП:

а) имеющие в своем составе не описанные ранее химические соединения, выделенные из природного сырья;

б) имеющие в своем составе неофициальные виды природного сырья или полученные на их основе субстанции;

в) имеющие в своем составе официальные виды природного сырья или содержащие разрешенные к медицинскому применению компоненты.

3. Известные моно- и комплексные ЛСПП:

а) заявленные по новым показаниям;

б) заявленные в новой лекарственной форме;

в) заявленные для применения в новой дозе или способах введения;

г) воспроизведенные ЛСПП.

В настоящее время доклиническое изучение нового ЛСПП включает проведение фармакологических и токсикологических исследований, объем которых определяется его происхождением, химическим составом, сведениями об эффективности и безопасности применения используемого природного сырья в отечественной и зарубежной медицине, видом заявляемой специфической активности и др.

1. Оценка фармакологической активности лекарственных средств природного происхождения

Фармакологическую активность (общую и специфическую) новых ЛСПП изучают в соответствии с действующими методическими рекомендациями для отдельных фармакотерапевтических групп. Исследования проводят на различных видах лабораторных животных с использованием моделей патологических состояний, а также в условиях эксперимента *in vitro*.

Изучение общей фармакологической и специфической активности в полном объеме проводят для:

- новых субстанций и ЛСПП, представляющих собой оригинальные монокомпонентные препараты на основе новых, ранее не применявшихся соединений природного происхождения;
- новых субстанций и ЛСПП на основе ранее не регистрировавшихся в Российской Федерации видов природного сырья;
- новых комплексных ЛСПП на основе ранее не регистрировавшихся в Российской Федерации субстанций и видов природного сырья.

Изучение фармакологической активности в ограниченном объеме с использованием основных методик, подтверждающих заявляемое фармакологическое действие препарата, проводят для:

- новых композиций, имеющих в своем составе зарегистрированные субстанции или официальные виды природного сырья;
- субстанций и ЛСПП на основе неофициального природного сырья, но широко используемого в народной медицине или пищевой промышленности;
- моно- и комплексных ЛСПП, заявляемых по новым показаниям;
- моно- и комплексных ЛСПП, заявляемых в новой лекарственной форме;
- моно- и комплексных ЛСПП, заявляемых для применения в новых дозировках;
- моно- и комплексных ЛСПП, заявляемых для применения при новом пути введения.

Для ЛСПП, представляющих собой индивидуальное соединение природного происхождения, проводят фармакокинетические исследования.

Для ЛСПП, содержащих новую, ранее не применявшуюся комбинацию субстанций или видов сырья, необходимо проводить доклиническое исследование, доказывающее оптимальность новой комбинации по сравнению с активностью ранее зарегистрированного состава.

При воспроизводстве известных, в том числе зарубежных ЛСПП должна быть документально подтверждена идентичность сырья, химического строения или химического состава и лекарственной формы воспроизводимого ЛСПП базовому препарату и представлена подробная литературная справка, отражающая все аспекты фармакологической активности базового препарата.

2. Токсикологические исследования лекарственных средств природного происхождения

а) Токсикологическое изучение оригинальных ЛСПП.

При оценке безопасности оригинальных ЛСПП, являющихся новыми биологически активными химическими соединениями (одно- или многокомпонентными), полученными из природного сырья, а также препаратов, полученных из неофициального вида природного сырья или их комбинации, токсикологическое изучение ЛСПП предусматривает проведение исследований в полном объеме, в соответствии с действующим законодательством и методическими рекомендациями. При этом проводится изучение общетоксического действия ЛСПП и лекарственной формы в условиях острых, подострых и хронических экспериментов на лабораторных животных, а также исследуются возможные мутагенные, аллергизирующие, иммунотоксические свойства, канцерогенность и репродуктивная токсичность.

б) Токсикологическое изучение ЛСПП из официальных видов природного сырья.

Для регистрации новых ЛСПП на основе разрешенных к медицинскому применению в РФ субстанций природного происхождения и официальных видов природного сырья допустим ограниченный объем токсикологических исследований при условии, что дозы основных действующих веществ, входящих в состав таких препаратов, не превышают доз, ранее разрешенных к медицинскому применению, и имеются данные научной

литературы об изучении специфических видов токсичности ЛСПП. Для таких ЛСПП необходимо выполнить следующий объем токсикологических исследований:

— изучение токсичности ЛСПП при однократном введении лабораторным животным (острая токсичность);

— изучение токсичности субстанции и лекарственных форм препаратов при длительном введении (хроническая токсичность);

— изучение аллергизирующих и местнораздражающих свойств (при необходимости — изучение на молодых развивающихся животных и исследование других видов специфической токсичности).

Обязательный объем исследований включает:

1. Определение острой токсичности ЛСПП, относящихся к перечисленным группам, в соответствии с Методическими рекомендациями по изучению общетоксического действия ЛС настоящего Руководства. Для сборов возможно ограничить проведение изучения токсичности при одном способе введения, который рекомендован для клинической практики.

2. Изучение хронической токсичности препаратов, относящихся к этим группам, в соответствии с упомянутыми выше Методическими рекомендациями. Для сборов можно ограничиться экспериментами на крысах при введении их в двух дозах в течение 1–6 месяцев (в зависимости от длительности применения данных ЛСПП у человека). Исследование новых лекарственных форм ЛСПП, которые не представляется возможным ввести крысам, проводится на кроликах или собаках.

3. Изучение аллергизирующих и местнораздражающих свойств препаратов этих групп в соответствии с действующими методическими рекомендациями. В ряде случаев (разработка детских лекарственных форм, назначение ЛСПП беременным) проводится изучение препаратов на молодых развивающихся животных и исследование их репродуктивной токсичности (эмбриотоксичность, тератогенность и собственно влияние на репродуктивную функцию).

Для ЛСПП, содержащих новую, ранее не применявшуюся комбинацию субстанций или видов сырья, необходимо выполнить следующий объем токсикологических исследований:

— изучение токсичности ЛСПП при однократном введении лабораторным животным (острая токсичность);

— изучение токсичности всего комплекса субстанций и лекарственных форм препаратов при длительном введении (хроническая токсичность);

— изучение аллергизирующих и местнораздражающих свойств;

— изучение репродуктивной токсичности.

Объем доклинических исследований разрабатываемых ЛСПП определяется сведениями об эффективности и безопасности применения данного природного сырья в отечественной и зарубежной медицине, в том числе наличием сведений об изучении специфических видов токсичности; химическим составом, видом заявляемой специфической активности. При изучении фармакологической активности и токсичности новых ЛСПП на доклиническом этапе исследования необходимо руководствоваться действующими методическими рекомендациями. Заявленная активность должна быть подтверждена в сравнении с известными ЛСПП из данной фармакологической группы, а если таковых нет — с эталонными по заявляемой активности препаратами, полученными путем синтеза (желательно также, чтобы препарат сравнения соответствовал исследуемому ЛСПП по лекарственной форме и способу введения).

Особое внимание следует уделить обоснованию эффективных доз новых ЛСПП по результатам экспериментальных исследований, в том числе с учетом литературных данных. Требуется также определить и обосновать курс лечения, обозначить максимально допустимые разовые и курсовые дозы, отразить вопросы, связанные с передозировкой и взаимодействием с другими ЛС.

Все исследования, предусмотренные настоящими Методическими рекомендациями, должны быть оформлены в виде научных протоколов (отчетов), обобщающих результаты фармакологических и токсикологических исследований.

В отчетах должны быть приведены конкретные данные результатов исследований, обработанные статистически и представленные в виде таблиц, графиков и др. Для используемых методик приводятся ссылки на опубликованные работы. Если исследование касается изучения противомикробных, противовирусных или противоопухолевых свойств ЛСПП, приводится подробная характеристика штаммов микроорганизмов и опухолей с указанием вида (на латинском языке), источник получения или паспорт и т.д. В конце отчета приводятся обсуждение результатов и выводы. Все отчеты должны быть утверждены руководителем научной организации, где проведены исследования, и заверены печатями этой организации.

Разработчик обязан также иметь необходимые нормативные документы на ЛСПП (ФСП на субстанцию, стандарт, лекарственную форму, сырье), научно обоснованный проект названия ЛСПП, проект протокола КИ, проект инструкции по медицинскому применению препарата, составленный в соответствии с требованиями Минздравсоцразвития России. Кроме того, авторы должны подготовить литературную справку, касающуюся данного ЛСПП и его состава, а также объяснительную записку, в которой излагается обоснование разрабатываемого ЛСПП, объем проведенных научных исследований и достигнутые результаты. Для проведения фармацевтической экспертизы разработчик должен иметь образцы ЛСПП (субстанция, лекарственные формы, стандарт — при необходимости) в требуемых для исследования количествах.

Представлять нормативную и другую документацию в Минздравсоцразвития России следует в соответствии с перечнем документов, необходимым для регистрации ЛС на территории Российской Федерации.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

ДОПОЛНЕНИЕ 1

РЕКОМЕНДУЕМЫЙ ОБЪЕМ ИЗУЧЕНИЯ ФАРМАКОЛОГИЧЕСКОЙ АКТИВНОСТИ И ТОКСИКОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ ПРИРОДНОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ИННОВАЦИОННОСТИ

*Составители: к. б. н. А.Н. Васильев; д. м. н. О.Л. Верстакова;
д. м. н., проф. Е.В. Арзамасцев; д. фарм. н., проф. Н.Д. Бунятян;
к. б. н. Н.М. Крутикова; к. б. н. Г.Н. Енгальчева; к. м. н. Р.Д. Сюбаев*

Введение

Важнейшими приоритетами, на которых основывается Стратегия развития фармацевтической промышленности Российской Федерации на период до 2020 года, являются приоритет инновационной модели развития отрасли и приоритет качества, эффективности и безопасности ЛС.

Понятия и термины

Инновационные лекарственные средства — ЛС, разработанные/производимые патентообладателем на данное ЛС, т.е. организацией, которая открыла данное фармакологически активное вещество либо его модификацию или создала новую лекарственную форму, на которую получила патент.

Фармакологические исследования ЛС включают изучение специфической активности (например, противовоспалительной, муколитической и др.) и общепармакологических свойств. При изучении общепармакологического действия необходимо оценить прежде всего влияние препарата на функции жизненно важных систем (дыхательную, ССС, ЦНС). В зависимости от имеющихся сведений о препарате изучают также его влияние на прочие системы организма (выделительную, пищеварительную и др.).

Токсикологические исследования ЛС включают изучение общетоксического действия при однократном введении (острая токсичность), изучение общетоксического действия при повторном введении (подострая и хроническая токсичность), изучение специфической токсичности (изучение мутагенности, канцерогенности, репродуктивной и онтогенетической токсичности, аллергенности, иммунотоксичности) и изучение метнораздражающего действия.

Общие положения

Оптимальная программа доклинических фармакологических и токсикологических исследований лекарственного средства и лекарственного средства сравнения должна быть научно обоснована. Целесообразно учитывать степень инновационности ЛП, а также другие его особенности. Так, по степени инновационности различают: оригинальные, воспроизведенные и прочие ЛП.

По цели экспертизы: КИ, регистрация, продление регистрации, внесение изменений в материалы регистрационного досье.

По регистрационному статусу: разрешенные к медицинскому применению в стране производителя и других странах, не разрешенные к медицинскому применению в стране производителя и других странах.

По степени клинической апробации: разрешенные к проведению КИ в других странах, не разрешенные к проведению КИ в других странах.

По происхождению: природного происхождения, полученные биотехнологическими методами, полученные нанотехнологическими методами.

По степени экспериментального изучения предлагаемого ЛС: фармакологическая активность и токсичность изучены полностью в соответствии с современными требованиями, изучены отдельные виды активности и токсичности, предлагаемое ЛС в экспериментальных исследованиях не изучалась.

По степени экспериментального изучения и наличия информации в открытой научной литературе: активные и вспомогательные компоненты изучены в соответствии с современными требованиями отечественными или зарубежными исследователями, в материалах регистрационного досье имеются ссылки на литературные источники; активные и вспомогательные компоненты лекарственной формы частично изучены в соответствии с современными требованиями отечественными или зарубежными исследователями; сведений не представлено.

По адекватности представления результатов экспериментальных исследований и научного анализа литературы в проекте инструкции и/или протоколе КИ: соответствует материалам регистрационного досье и данным научной литературы, не соответствует.

По наличию информации о наблюдении за побочными эффектами заявляемой лекарственной формы: имеется, нет.

Особенности разработки плана доклинических фармакологических и токсикологических исследований лекарственных препаратов природного происхождения

В таблице 1 представлен объем экспериментальных исследований, необходимый для рассмотрения вопроса о возможности проведения КИ лекарственных препаратов природного происхождения (ЛСПП) в зависимости от инновационности.

Таблица 1

Рекомендуемый объем изучения фармакологической активности и токсикологических свойств лекарственных средств природного происхождения в зависимости от инновационности

Группы лекарственных средств природного происхождения в зависимости от инновационности	Фармакологические исследования	Токсикологические исследования
Оригинальные лекарственные средства природного происхождения		
Новые субстанции и оригинальные монокомпонентные лекарственные средства на основе новых, ранее не применявшихся соединений природного происхождения. Новые субстанции и лекарственные средства на основе ранее не регистрировавшегося в РФ видов природного сырья	Изучение специфической фармакологической активности и общих фармакологических свойств в полном объеме. Для ЛПСП, представляющих собой индивидуальное соединение природного происхождения необходимо проведение фармакокинетического исследования при наличии методов исследования	Проведение исследований в полном объеме, в соответствии с действующим законодательством и методическими документами – изучение общетоксического действия ЛСПП и лекарственной формы в условиях острых, подострых и хронических экспериментов, а также исследование возможных мутагенных, аллергизирующих, иммунотоксических, канцерогенных свойств и репродуктивной и онтогенетической токсичности

Группы лекарственных средств природного происхождения в зависимости от инновационности	Фармакологические исследования	Токсикологические исследования
Новые комбинации лекарственных средств на основе ранее не регистрировавшихся в РФ субстанций и видов природного сырья	Изучение специфической фармакологической активности и общих фармакологических свойств в полном объеме	Проведение исследований в полном объеме в соответствии с действующим законодательством и методическими документами — изучение общетоксического действия ЛСПП и лекарственной формы в условиях острых, подострых и хронических экспериментов, а также исследование возможных мутагенных, аллержизирующих, иммунотоксических, канцерогенных свойств и репродуктивной и онтогенетической токсичности. Сведения о токсических свойствах (общая и специфическая токсичность активных компонентов комбинации) с учетом возможного токсикологического взаимодействия
Воспроизведенные лекарственные средства природного происхождения		
ЛСПП воспроизведенные	Необходимо представить: 1) документы, подтверждающие идентичность сырья, химического строения и лекарственной формы воспроизведенного препарата и препарата сравнения, зарегистрированного в РФ; 2) подробную литературную справку, отражающую все аспекты фармакологической активности препарата сравнения, зарегистрированного в РФ	Изучение острой и подострой токсичности в сравнении с оригинальным препаратом. Сведения и данные об изучении специфической токсичности, опубликованные в специализированных печатных изданиях
Лекарственные средства природного происхождения, содержащие ранее зарегистрированные компоненты		
Новые композиции ЛСПП, имеющие в своем составе зарегистрированные субстанции или официальные виды природного сырья	Изучение фармакологической активности в ограниченном объеме с использованием в эксперименте основных методик, подтверждающих заявленное фармакологическое действие ЛСПП. Необходимо проводить доклиническое исследование, доказывающее оптимальность новой комбинации по сравнению с активностью ранее зарегистрированного состава	Изучение острой и подострой токсичности при условии, что дозы основных действующих веществ не превышают доз, ранее разрешенных к медицинскому применению. Анализ возможного токсикологического взаимодействия

Группы лекарственных средств природного происхождения в зависимости от инновационности	Фармакологические исследования	Токсикологические исследования
Субстанции и ЛСПП на основе неофициального природного сырья, но широко используемого в народной медицине или пищевой промышленности	Изучение специфической фармакологической активности в ограниченном объеме с использованием в эксперименте основных методик, подтверждающих заявленное фармакологическое действие ЛСПП. Результаты исследований общих фармакологических свойств ЛСПП или данные об изучении общих фармакологических свойств ЛСПП, опубликованные в специализированных печатных изданиях	Изучение общетоксических свойств. Результаты исследований специфической токсичности ЛСПП или сведения и данные об изучении токсичности, опубликованные в специализированных печатных изданиях
Моно- и многокомпонентные ЛСПП, заявляемые по новым показаниям	Изучение фармакологической активности в ограниченном объеме с использованием в эксперименте основных методик, подтверждающих заявленное фармакологическое действие ЛСПП	Анализ результатов ранее проведенных исследований при условии отсутствия изменений ранее разрешенных способа применения и режима дозирования
Моно- и многокомпонентные ЛСПП, заявляемые в новой лекарственной форме	Изучение фармакологической активности в ограниченном объеме с использованием в эксперименте основных методик, подтверждающих заявленное фармакологическое действие ЛСПП	Изучение острой токсичности, хронической токсичности, аллергизирующего и местнораздражающего действия
Моно- и многокомпонентные ЛСПП, заявляемые для применения в новых дозировках	Изучение фармакологической активности в ограниченном объеме с использованием в эксперименте основных методик, подтверждающих заявленное фармакологическое действие ЛСПП	В случае повышения дозы: токсикологическое обоснование безопасности
Моно- и многокомпонентные ЛСПП, заявляемые для применения при новом пути введения	Изучение фармакологической активности в ограниченном объеме с использованием в эксперименте основных методик, подтверждающих заявленное фармакологическое действие ЛСПП	Изучение острой токсичности, хронической токсичности, аллергизирующего и местнораздражающего действия

ДОПОЛНЕНИЕ 2

ОСОБЕННОСТИ ДОКЛИНИЧЕСКОГО ИЗУЧЕНИЯ НОВОЙ ЛЕКАРСТВЕННОЙ ФОРМЫ, РАЗРАБАТЫВАЕМОЙ ИЗ ЛЕКАРСТВЕННОГО РАСТИТЕЛЬНОГО СЫРЬЯ, — СЫРЬЕ РАСТИТЕЛЬНОЕ ПОРОШОК В ФИЛЬТР-ПАКЕТАХ

*Составители: к. б. н. Н.М. Крутикова; Н.Г. Оленина; к. б. н. О.Е. Пасхина;
д. фарм.н., проф. Т.А. Сокольская*

Введение

Настоящие методические рекомендации содержат требования по объему экспериментального изучения новой лекарственной формы — сырье растительное порошок в фильтр-пакетах — для ЛС, разрабатываемых на основе растительного сырья. Они являются дополнением к Методическим рекомендациям по доклиническому изучению ЛС, разрабатываемых из природного сырья, которые являются частью общей программы доклинических фармакологических и токсикологических исследований, обязательных при разработке новых ЛС в Российской Федерации. Задачей данных методических рекомендаций является изложение принципов и объема экспериментального изучения, обязательных при разработке новой лекарственной формы — сырье растительное порошок в фильтр-пакетах — для ЛС, разрабатываемых на основе растительного сырья.

В настоящее время в Российской Федерации зарегистрировано более 320 видов растительного сырья, в том числе и лекарственных сборов. Более 130 видов реализуется через аптечную сеть в виде измельченного сырья, фасованного в пачки; прессованного сырья в виде брикетов или таблеток и т.д. За последние 15 лет широкое распространение получила новая лекарственная форма для ЛС из растительного сырья — сырье порошок в фильтр-пакетах. В настоящее время зарегистрировано более 50 видов растительного сырья, в том числе сборов, выпускаемых в новой лекарственной форме [1].

Преимуществом новой лекарственной формы является прежде всего более точное дозирование препарата из лекарственного растительного сырья (одна доза в виде порошка содержится в одном фильтр-пакете) и удобство в использовании: настои из порошка в фильтр-пакетах получают путем добавления необходимого количества кипятка и настаивания при комнатной температуре в течение 15–20 мин. Данный метод получения настоя не требует нагревания на водяной бане и последующего настаивания в течение 45 мин, как в случае традиционного метода получения настоя или отвара из измельченного сырья в пачках.

В связи с тем, что высокий интерес к новым ЛС растительного происхождения сопровождается повышением требований к их эффективности и безопасности, а также методам контроля их качества, необходимо обеспечить соблюдение соответствующих требований к их стандартизации, что позволит гарантировать воспроизводимость заявляемых фармакологических эффектов и уровня безопасности лекарственного растительного средства [2].

Известно, что на качество водных извлечений оказывает влияние ряд факторов, в том числе измельченность сырья, соотношение количества сырья и экстрагента, режим настаивания. Для фильтр-пакетов важным фактором является также сорт используемого для их производства материала.

Измельчение растительного сырья необходимо для облегчения проникновения экстрагента в экстрагируемый материал, имеющий клеточную структуру. Достижение более высокой измельченности ЛРС (размер частиц порошка в фильтр-пакетах составляет в основном 0,25–1 мм) с одной стороны, способствует повышению степени его истощения и увеличению содержания основных действующих веществ в водном извлечении, с другой стороны — увеличивает и выход сопутствующих веществ. Для некоторых видов ЛРС (например, содержащего в больших количествах пектиновые вещества) измельчение сырья до состояния порошка может привести к ухудшению условий диффузионного обмена и снижению качества получаемого извлечения. Так как каждый вид ЛРС (тем более растительный сбор) имеет различный химический состав, а особенности клеточной структуры растительного сырья (толщина и плотность клеточных оболочек, степень их пропитанности лигнином, наличие суберина и кутина и т.д.) оказывают значительное влияние на процесс экстрагирования веществ, исследования по разработке оптимального способа получения водных извлечений из фильтр-пакетов необходимо проводить в каждом конкретном случае индивидуально [3].

Настоящие методические рекомендации являются описанием комплекса процедур, гарантирующих получение ЛС из растительного сырья в новой лекарственной форме — сырье порошок в фильтр-пакетах, не уступающего по качеству и фармакологическим и токсикологическим свойствам ЛС из растительного сырья в традиционной лекарственной форме (измельченное сырье) в соответствии с современными принципами Good Laboratory Practice (GLP).

Новизна данных методических рекомендаций заключается в том, что впервые вводятся требования по определению соответствия содержания действующих веществ в водных извлечениях, приготовленных из сырья растительного порошка в фильтр-пакетах (настой) в соответствии с предлагаемым методом, и сырья растительного измельченного (настой, отвары) в соответствии с методом, описанным в утвержденной инструкции.

Общие положения

При проведении сравнительного экспериментального изучения содержания действующих веществ в водных извлечениях полученных из лекарственного растительного средства в новой лекарственной форме (сырье порошок в фильтр-пакетах) и традиционной лекарственной форме должно использоваться специализированное отечественное и зарубежное оборудование, сертифицированное в установленном порядке Минздравсоцразвития России. В качестве препарата сравнения необходимо использовать только зарегистрированную в установленном порядке лекарственную форму для данного ЛС из растительного сырья (сырье растительное измельченное, сырье растительное цельное и т.д.).

Сравнительное экспериментальное изучение соответствия содержания действующих веществ в водных извлечениях, полученных из лекарственного растительного средства в новой лекарственной форме (сырье порошок в фильтр-пакетах) и традиционной лекарственной форме, должно начинаться после решения всех вопросов, связанных со стандартизацией исходного сырья и новой лекарственной формы. Необходимые показатели стандартизации должны быть зафиксированы в нормативных документах, включающих методы качественной и количественной оценки исходного сырья и новой лекарственной формы. Образцы для исследования должны быть подготовлены по утвержденному регламенту.

Рекомендуемые тесты. Описание метода

1. Определение массы (г) растительного сырья в 1 столовой ложке

При проведении экспериментального изучения содержания действующих веществ в водных извлечениях, приготовленных из традиционной формы растительного сырья, равную дозу растительного сырья для приготовления водного извлечения, в соответствии с утвержденной инструкцией, необходимо брать по весу.

Традиционно для приготовления настоя или отвара в домашних условиях необходимое количество растительного сырья отмеряют столовыми ложками. Количество столовых ложек сырья, необходимое для приготовления настоя или отвара, определяется путем многократных взвешиваний массы сырья в одной столовой ложке, исходя из разовой дозы сырья. Если не получается кратного количества столовых ложек (0,5 ст.л., 1,5 ст.л. и т.п.), то можно использовать чайные ложки.

В отчете о проведенных исследованиях следует привести таблицу полученных результатов с определением средней массы сырья в 1 столовой (чайной) ложке. В дальнейшем, при подготовке проекта инструкции, в разделе «Способ применения и дозы» следует указать разовую дозу растительного сырья как в граммах, так и в количестве столовых (чайных) ложек.

При отсутствии данных исследований в инструкции разовая доза растительного сырья, необходимая для приготовления водного извлечения (настоя или отвара), указывается в граммах, а в пачке должна быть приложена мерная ложка, вмещающая разовую дозу сырья.

2. Определение оптимального режима настаивания (времени экстракции)

При изучении данного параметра готовят водные извлечения (настоя, или отвар) из традиционной формы растительного сырья в соответствии с утвержденной инструкцией.

Готовят водные извлечения из сырья порошка в фильтр-пакетах с использованием разных режимов настаивания (10 мин, 15 мин, 20 мин, 30 мин и т.д.) и определяют в них количественное содержание действующих веществ (экстрактивные вещества, сухой остаток, биологически активные вещества). Минимальное время настаивания, позволяющее получить постоянное количество действующих веществ, является оптимальным. Полученные результаты (в виде таблицы) отражают в заключительном отчете о проведении исследований. Кроме того, полученные извлечения оценивают по внешнему виду и органолептическим характеристикам.

3. Определение разовой дозы сырья порошка в фильтр-пакетах (количества фильтр-пакетов) для приготовления настоя

При изучении данного параметра готовят водные извлечения (настоя или отвар) из традиционной формы растительного сырья в соответствии с утвержденной инструкцией и определяют количество действующих веществ (экстрактивные вещества, сухой остаток, биологически активные вещества) в полученном водном извлечении.

Одновременно готовят водные извлечения из сырья порошка в фильтр-пакетах, используя разное количество фильтр-пакетов (1, 2, 3 и т.д.) на 200 мл воды. В полученных настоях определяют количественное содержание действующих веществ.

Анализируя полученные результаты, определяют количество фильтр-пакетов на 100 мл (1/2 стакана) или 200 мл (1 стакан) воды, необходимое для приготовления настоя с содержанием действующих веществ, соответствующим их содержанию в водном извлечении, приготовленном из традиционной формы растительного сырья методом, описанным в утвержденной инструкции.

В случае изменения рекомендуемого для разового приема объема настоя, приготовленного из фильтр-пакетов (например, 100 мл), по сравнению с рекомендуемым объемом настоя или отвара, приготовленных из измельченного сырья традиционным способом в соответствии с утвержденной инструкцией (например, 1 столовая ложка), необходимо представить сравнительную характеристику рекомендуемых для приема разовых доз соответствующих водных извлечений — количество определяемых действующих веществ должно быть одинаковым. При этом следует учитывать целесообразность увеличения объема разовой дозы принимаемого настоя.

4. Статистическая обработка данных

Статистическая обработка результатов исследования проводится в соответствии с требованиями ГФ XI.

5. Структура и содержание отчета о проведенных исследованиях

В отчете о результатах проведенных исследований следует четко отразить объекты исследования (название, лекарственная форма, количество серий, нормативные документы на упаковочный материал — фильтр-пакеты)¹², цель и задачи исследования; подробно описать методы приготовления исследуемых водных извлечений; обосновать выбор определяемых действующих веществ. Полученные результаты должны быть статистически обработаны и представлены в виде таблиц. В заключении отчета необходимо представить выводы. Отчет должен быть подписан исполнителем или другим ответственным лицом данного производства.

Заключение

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и статистически обработанных результатов. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Государственный реестр лекарственных средств 2002 г., 2004 г., 2009 г.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. — 2000; 2005.
3. Пасхина О.Е., Оленина Н.Г. Проблемы регистрации лекарственного растительного сырья в форме выпуска порошок в фильтр-пакетах // Мат. VII Межд. съезда «Фитофарм 2003» «Актуальные проблемы создания новых лекарственных препаратов природного происхождения». Санкт-Петербург–Пушкин, 3–5 июля 2003 г. — СПб., 2003. — С. 628–629.
4. ГФ XI, вып. 1, стр. 199 (Москва, 1998 г.).

¹² При повторной регистрации новой лекарственной формы в случае изменения упаковочного материала фильтр-пакетов необходимо проведение новых исследований.

РАЗДЕЛ III

ОБЩИЕ

МЕТОДОЛОГИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ

К ОЦЕНКЕ ОТНОШЕНИЯ

ОЖИДАЕМОЙ ПОЛЬЗЫ

К ВОЗМОЖНОМУ РИСКУ

ПРИМЕНЕНИЯ

ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

ГЛАВА 57

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ПРОВЕДЕНИЮ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ФАРМАКОКИНЕТИКИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: член-корр. РАМН, д. б. н., проф. А.А. Фирсов;
д. м. н., проф. В.П. Жердев; Ю.А. Портной, д. б. н. Г.Б. Колыванов,
д. б. н. А.А. Литвин, к. б. н. Е.Ю. Барманова*

Введение

Изучение фармакокинетики — кинетики всасывания, распределения и элиминации фармакологических средств в организме является составной частью доклинических исследований фармакологических средств. В настоящих Методических рекомендациях конкретизированы задачи, содержание и порядок представления результатов доклинического изучения фармакокинетики фармакологических средств.

Объем фармакокинетических исследований и соответствующей документации дифференцируется следующим образом:

полный объем исследований — для оригинальных фармакологически активных веществ, а также известных веществ, ранее не применявшихся в качестве фармакологических средств;

ограниченный объем исследований:

- для новых лекарственных форм, содержащих известное фармакологическое средство,
- для воспроизведенных фармакологических средств,
- для обоснования расширения показаний к применению ранее зарегистрированных фармакологических средств.

1. Фармакокинетические исследования оригинальных лекарственных средств

1.1. 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 КИ. Важной задачей изучения фармакокинетики оригинального фармакологического средства является оптимизация выбора его лекарственной формы.

1.2. Объект исследования и лабораторные животные

1.2.1. Фармакологические средства

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

1.2.2. 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.

1.2.3. Биологический материал

Важнейшим элементом фармакокинетического изучения фармакологического средства является исследование динамики изменения его концентрации в крови, поэтому плазма (или сыворотка) крови или цельная кровь рассматриваются в качестве основного вида биоматериала.

Определение концентрации в крови обязательно и для тех фармакологических средств, которые предназначены исключительно для местного применения. В том случае, когда системная доступность равна нулю — фармакологическое средство не достигает системного кровотока, — требуется определять его концентрацию в месте введения (например, в коже или подлежащих мышцах при накожной аппликации фармакологического средства). Во всех остальных случаях необходимо определение концентрации фармакологических средств и в периферических тканях.

Выбор периферических тканей, в которых следует определять концентрацию фармакологического средства, осуществляется таким образом, чтобы среди объектов исследования оказались ткани, отличающиеся по степени васкуляризации. В качестве сильно васкуляризованных тканей можно использовать, например, сердце или селезенку, умеренно васкуляризованных — ткань мышц, слабо васкуляризованных — 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 экскретах (моча, желчь, фекалии — в зависимости от их роли в элиминации).

1.3. Регламент эксперимента

1.3.1. Пути и методы введения фармакологического средства

Пути введения. Фармакокинетику фармакологического средства необходимо исследовать при тех способах введения, которые предполагается рекомендовать для КИ. При этом

даже в тех случаях, когда фармакологическое средство предполагается применять только внесосудистым 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.

Методы введения. Внутривенно фармакологические средства следует вводить в хвостовые вены мышей и крыс, ушные вены морских свинок и кроликов, бедренные вены собак и кошек. При изучении фармакокинетики фармакологического средства при его многократном введении допускается замена внутривенного введения на внутрибрюшинное, однако в дни проведения фармакокинетического исследования фармакологическое средство следует ввести тем же способом, что и при однократном введении, то есть внутривенно.

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

В зависимости от вида лекарственной формы и ее предназначения возможно закапывание растворов или аппликация мазей на слизистую оболочку глаза, инстилляция в переднюю камеру глаза, введение суппозиторий, 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.

1.3.2. 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.

При многократном введении достаточно использовать один уровень дозы (желательно близкий к величине ЭД₅₀, 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.

1.3.3. Продолжительность эксперимента

Длительность наблюдения за концентрацией фармакологического средства в биоматериале определяется возможностями аналитического метода, однако в любом случае должна быть не менее чем в 5 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.

1.3.4. 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, связанных с удлинением продолжительности эксперимента (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 5. 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 выявляется 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.

При изучении кинетики экскреции необходимо определять не только концентрацию фармакологического средства в каждой порции экскрета, но и объем экскрета, 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.

1.4. Методы количественного определения концентрации лекарственных средств

Для определения концентрации фармакологических средств в биоматериале могут быть использованы различные методы (физико-химические, иммунологические, микробиологические и др.), обеспечивающие возможность уверенного слежения за общей концентрацией (суммарный уровень свободного и связанного макромолекулами) фармакологического средства при выбранных условиях фармакокинетического эксперимента, в частности его длительности, и отвечающие общим требованиям избирательности, точности, воспроизводимости. В тех случаях, когда фармакологическое средство связывается макромолекулами крови, процессы связывания должны быть изучены *in vitro* методами равновесного диализа или ультрафильтрации с использованием аналитических процедур, перечисленных выше. При этом показатели связывания следует оценивать при концентрациях фармакологического средства, которые отражают диапазон изменения его уровней *in vivo*.

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).

1.5. Анализ фармакокинетических данных

1.5.1. Однократное введение фармакологического средства

Гипотеза линейности. Проверка этой гипотезы является важнейшим элементом фармакокинетического анализа, т.к. позволяет оценить предсказуемость изменений концентрации (C) в ответ на изменение дозы (D) 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 (t)», нормированных относительно дозы (кривые изменения C/D 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 ($C1_T$), 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):

$$C1_T = D/AUC.$$

Стационарный объем распределения (V_{ss}) — 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 $C1_T$ на среднее время удержания (MRT — среднее время пребывания в организме молекулы фармакологического средства):

$$V_{ss} = C1_T \times MRT.$$

Значения $C1_T$ 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 ($t \times C$)».

Наряду с параметрами $C1_T$, 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:

$$T_{1/2} = 0,693/\lambda,$$

где λ — показатель экспоненты, характеризующий скорость снижения концентрации препарата на конечном (моноэкспоненциальном) участке фармакокинетической кривой.

Параметры $C1_T$, 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.

Характеристика всасывания фармакологического средства. 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, $T_{1/2}$.

Абсолютная степень всасывания (f_a — абсолютная биодоступность) определяется отношением значений AUC при внесосудистом (ev) и внутрисосудистом (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 (AUC_t), если величина AUC_t составляет не менее 80% от AUC.

Скорость всасывания характеризуется значениями t_{\max} и C_{\max}/AUC или C_{\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. Распределение фармакологического средства между водной частью плазмы или сыворотки крови и их высокомолекулярными компонентами характеризуется степенью связывания (f_b — отношение концентрации связанного вещества к его общей концентрации), если она не зависит от концентрации фармакологического средства, и параметрами уравнения Скэтчарда (константа равновесия и число центров связывания), если f_b зависит от концентрации.

Интенсивность проникновения фармакологического средства в периферические ткани должна быть охарактеризована тканевой доступностью (f_T), определяемой отношением значения AUC в ткани (AUC_T) к соответствующей величине AUC в плазме или сыворотке крови (AUC_P):

$$f_T = AUC_T/AUC_P.$$

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 характеризуется близкими значениями λ :

$$K_d = C_T/C_P.$$

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

Итогом изучения распределения фармакологического средства в организме является 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 (М) должны быть характеризованы соответствующими значениями параметров C_{\max} , t_{\max} , AUC, MRT, $T_{1/2}$ ($C_{\max, M}$, $t_{\max, M}$, AUC_M , MRT_M , $T_{1/2, M}$). 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_R), определяемый отношением скорости экскреции к средней концентрации фармакологического средства в крови в соответствующий период времени или отношением кумулятивной экскреции (M_E) к AUC фармакологического средства в крови:

$$Cl_R = M_E / AUC.$$

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

$$Cl_{NR} = Cl - Cl_R.$$

Нелинейная фармакокинетика. Описанный в предыдущих разделах аппарат применим для фармакологических средств, фармакокинетика которых линейна. Если фармакокинетика нелинейна, фармакокинетические свойства могут быть охарактеризованы кажущимся значением $T_{1/2}$, величиной AUC, а при внесосудистом 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_{min}). Кроме того, следует рассчитать интегральную среднюю концентрацию (квазистационарная концентрация — C_{ss}), определяемую отношением AUC в пределах от 0 до t_{min} к продолжительности интервала дозирования, и оценить выраженность флуктуации уровней фармакологического средства путем отнесения разности ($C_{max} - C_{min}$) к C_{ss} .

1.5.2. 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_{ss} и MRT с использованием стационарных значений AUC и AUMC, рассчитанных в пределах интервала дозирования, и $T_{1/2}$ при внутрисосудистом введении фармакологического средства, а также стационарные значения C_{max} , C_{min} , C_{ss} при его внесосудистом введении, а для лекарственных форм пролонгированного действия — также отношение $(C_{max} - C_{min}) / C_{ss}$.

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 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.

1.6. Рекомендация выбора дозы лекарственного средства для I фазы КИ

В соответствии с общепринятыми представлениями выбор дозы фармакологического средства для I фазы КИ 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 (m) и поверхностью тела (S) человека и животного. При этом предполагается, что минимальная эффективная доза, отнесенная к (S), у человека и животного одинакова. Для соответствующих вычислений целесообразно воспользоваться данными, приведенными в таблице.

Соотношение между дозами фармакологического средства у человека (масса тела 70000 г) и животных (в скобках — стандартная масса тела в г)

Мышь	Крыса	Морская свинка	Кролик	Кошка	Обезьяна	Собака
(20) 388	(200) 56,0	(400) 31,5	(1500) 14,2	(2000) 13,0	(4000) 6,1	(12000) 3,1

Примечание: $S \text{ (см}^2\text{)} = 11,2 \text{ м}^{2/3}$

Для того чтобы оценить дозу фармакологического средства для человека, величину дозы, использованной в исследованиях 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 70000 г будет в 56 раз выше, т. е. 560 мг.

По результатам экспериментальных исследований, по крайней мере, в тех случаях, когда конечная фаза снижения концентрации 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 исследованиях 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 (h):

$$T_{1/2,h} = (m_h/m_a)^{0,25} \times T_{1/2,a}$$

Знание $T_{1/2,h}$ позволяет ориентировочно оценить длительность наблюдения за концентрацией лекарственного вещества в крови (см. раздел 1.3.) при КИ фармакокинетики.

2. Фармакокинетическое изучение новых лекарственных форм, содержащих известное лекарственное 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 ЖКТ, снижение пресистемной элиминации, пролонгация удерживания фармакологического средства в организме, изменения 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 (s) 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 1.5, 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 (МАТ). 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 3.

В тех случаях, когда фармакокинетические свойства новой лекарственной формы качественно отличаются от описанных для уже существующих форм, необходимо параллельное изучение фармакокинетики и фармакодинамики, с оценкой эквивалентных уровней фармакологического средства.

3. Фармакокинетические исследования воспроизведенных лекарственных 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 исследования, помимо фармакокинетических исследований обычно включают только оценку острой и подострой токсичности.

Фармакокинетические исследования воспроизведенного фармакологического средства выполняются на одном виде животных с использованием одной дозы, вводимой однократно, и предусматривают определение концентрации преимущественно в крови (сыворотке, плазме). В тех случаях, когда концентрации фармакологического средства и/или его метаболита(ов) (например, эндогенной структуры) определить в крови (сыворотке, плазме) не представляется возможным, допускается оценка относительной биодоступности по результатам определения содержания фармакологического средства и/или его метаболита(ов) в моче животных. 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 1.3. и 1.5. Поскольку в этих случаях нет необходимости прогнозировать концентрацию препарата у человека, расчеты, предусмотренные разделом 1.6., не проводятся.

4. Фармакокинетическое изучение воспроизведенных лекарственных 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, оценивается проникновение лекарственного вещества через гематоэнцефалический барьер и т.д. Подобные исследования выполняются на одном виде животных с ис-

пользованием 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 1.2 и 1.3, а анализ фармакокинетических данных — на оценку тканевой доступности и коэффициента распределения препарата (раздел 1.5). Прогнозирование 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 1.6.

5. Заключение

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. Метрологические характеристики методики должны включать порог чувствительности, диапазон линейности, точность, воспроизводимость.

Результаты определения концентрации фармакологического средства желательно представить в графической форме. При этом на график (линейный или лучше полулוגарифмический) должны быть нанесены средние значения найденных концентраций и границы доверительного интервала.

Следует указать методы вычисления параметров фармакокинетики (1.5). Если при этом использовалась компьютерная техника, нужно представить данные о применявшихся программных средствах.

В заключении следует указать ориентировочные дозы для I фазы КИ и период полувыведения оригинального лекарственного вещества, оцененные способами, изложенными в разделе 1.6.

Материалы оформляются в виде научного отчета в соответствии с ГОСТ 7.32-2001 и Приказом Минздравсоцразвития России от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики» с предоставлением в таблицах как первичных данных по каждому веществу, так и результатов их статистической обработки. К отчету необходимо приложить аналитические паспорта или нормативные документы на референтные и тестируемые вещества.

Литература

1. Жердев В.П., Пиотровский В.К., Борисенко С.А., Клейменова Н.Н. Современное состояние проблемы фармакотерапии (биодоступность лекарственных средств). — М.: ВНИИМИ, 1987. — 76 с.
2. Пиотровский В.К. Фармакология и токсикология. — 1986, № 5, С. 118–127.
3. Соловьев В.Н., Фирсов А.А., Филов В.А. Фармакокинетика (руководство). М.: Медицина, 1980. — 423 с.
4. Фирсов А.А., Пиотровский В.К. Фармакокинетические методы в биофармации. Итоги науки и техники. — М.: ВИНТИ, 1984. — Т. 14, С. 114–227.
5. Voxelbaum H., Ronfeld R. Amer. J. Physiol., 1983. — 245. — p. 768–775.
6. Dedrick R. L. J. Pharmacokinet. Biopharm., 1973. — 1. — p. 435–461.

ГЛАВА 58

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ОПРЕДЕЛЕНИЮ БЕЗОПАСНОЙ ДОЗЫ ЛЕКАРСТВЕННОГО ПРЕПАРАТА ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ I-ФАЗЫ КЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ У ВЗРОСЛЫХ ВОЛОНТЕРОВ

*Составители: член-корр. РАМН, д.м.н., проф. Т.А. Гуськова;
академик РАМН, проф. В.Г. Кулес; д. м. н. А.Н. Миронов*

Введение

Основным результатом доклинических токсикологических исследований нового фармакологического вещества является прогноз его безопасности для человека. Особое внимание должно уделяться выбору начальной дозы препарата для первого назначения человеку во время проведения I-фазы КИ. При этом очень важным является создание гармонизированных требований, предъявляемых к доклиническим и клиническим исследованиям новых ЛС, соответствующих международным правилам и рекомендациям.

Данные методические рекомендации гармонизированы с рекомендациями, изложенными в материалах Конференции по гармонизации (ICH) (14,15,16), позицией Управления по контролю за продуктами и лекарствами (FDA) по данному вопросу (13), и не противоречат данным, изложенным в Методических рекомендациях по оценке безопасности применения ЛС в клинике на основании результатов доклинических токсикологических исследований [5]. Они не относятся к эндогенным гормонам и белкам, которые используются в физиологических концентрациях, к бактериальным и вирусным вакцинам, вакцинам ДНК, а также к клеточной и генной терапии. Кроме того, данные рекомендации не рассматривают начальные дозы препаратов, I-фаза КИ которых проводится на пациентах (цитостатики и некоторые другие), хотя многие принципы и некоторые подходы, рекомендуемые здесь, могут быть использованы при планировании таких исследований.

Задачей I-фазы КИ является изучение переносимости нового препарата волонтерами, т.е. здоровыми или, как их еще называют, бессимптомными добровольцами среди людей [3]. На этом этапе исследований, как правило, нет достаточного количества данных, полученных на животных, которые позволили бы построить научно обоснованную фармакокинетическую модель для точного выбора безопасной дозы. Даже если на стадии доклинического изучения у животных была установлена зависимость токсических эффектов от концентрации препарата в крови, существует ряд неизвестных на тот момент факторов, не позволяющих переносить эти данные на человека. Прежде всего, может быть существенное различие в биодоступности и метаболизме нового потенциального ЛС у животных и человека. Токсичность препарата у животного может быть вызвана не самим веществом, а его метаболитом, который в организме человека может и не образовываться или иметь место в незначительных количествах. Фармакокинетическое моделирование на животных для расчета безопасных начальных доз для человека можно использовать только в тех случаях, когда требуется ввести небольшое число исходных различий. В качестве примера можно привести белки с высокой молекулярной массой, например, моноклональные антитела, которые при внутривенном введении не подверже-

ны метаболизму, оказывают на клетки крови немедленный эффект, и объем распределения которых ограничен объемом плазмы крови. При таких обстоятельствах фармакокинетические и фармакодинамические модели могут быть полезны для определения дозы для человека в мг/кг [19, 20]. Но даже в этих случаях наличие определенных факторов, например, различия в чувствительности рецепторов или их плотности у человека и животных, могут иметь очень большое значение при экстраполяции данных с животных на человека [13]. Поэтому решающими показателями для рекомендации величины безопасной начальной дозы нового препарата для волонтеров являются данные, полученные при доклинических токсикологических исследованиях, которые должны быть проведены качественно в соответствии с существующими требованиями [4, 15, 16].

В данных методических рекомендациях описывается метод (алгоритм) и терминология для определения максимальной рекомендованной начальной дозы (МРНД) для первых КИ на людях новых фармакологических веществ и предлагается стандартная процедура, с помощью которой можно выбрать МРНД. Этот метод предназначен для того, чтобы обеспечить безопасность людей-добровольцев.

1. Термины и определения

Коэффициент пересчета на площадь поверхности тела (КП): Коэффициент, с помощью которого пересчитывают дозу (мг/кг) для животных в эквивалентную дозу для человека (которую также называют эквивалентной дозой человека), на основании разности площадей поверхности тела животного и человека. Коэффициент КП — это отношение площади поверхности тела у испытуемых видов животных к средней площади поверхности тела человека.

Эквивалентная доза для человека (ЭДЧ): Доза для человека, которая, по предположениям, обеспечит такой же эффект, как и наблюдаемый у животных при данной дозе.

$K_{\text{п}}$: Коэффициент пересчета дозы, выраженной в мг/кг, в дозу, выраженную в мг/м².

Максимальная рекомендованная начальная доза (МРНД): Наибольшая доза, рекомендованная в качестве начальной дозы при I-фазе в КИ. Предполагается, что при КИ взрослых здоровых добровольцев МРНД не окажет отрицательного действия. Единицы измерения дозы (мг/кг или мг/м²) могут варьировать в зависимости от используемых методов.

Доза без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ): Наибольшая доза, исследованная на животных, которая не вызывает существенного увеличения отрицательных эффектов по сравнению с контрольной группой. Отрицательные эффекты, которые являются биологически существенными, должны учитываться при определении ДБНОЭ.

Фармакологически активная доза (ФАД): Наименьшая доза, исследованная на животных, которая обладает заданной фармакологической активностью.

Коэффициент безопасности (КБ): Число, на которое нужно разделить ЭДЧ, чтобы иметь запас безопасности между ЭДЧ и МРНД.

M: Масса тела в кг.

2. Соответствие данной терминологии Рекомендациям FDA и ICH

Коэффициент пересчета на площадь поверхности тела (КП) соответствует BSA-CF (Body surface area conversion factor).

Эквивалентная доза для человека (ЭДЧ) соответствует HED (Human equivalent dose).

Коэффициент пересчета ($K_{\text{п}}$) дозы, выраженной в мг/кг, в дозу, выраженную в мг/м², соответствует k_{m} (Factor for converting mg/kg dose to mg/m² dose).

Максимальная рекомендованная начальная доза (МРНД) соответствует MRSD (Maximum recommended starting dose).

Доза без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ) соответствует NOAEL (No observed adverse effect level).

Фармакологически активная доза (ФАД) соответствует PAD (Pharmacologically active dose).

Коэффициент безопасности (КБ) соответствует SF (Safety factor).

Масса тела в кг (М) соответствует W (Body weight in kg).

3. Схема расчета

Начальная клиническая доза не должна быть токсичной. Однако нужно выбирать дозу, которая позволила ли бы достаточно быстро добиться выполнения целей I-фазы КИ, которые формулируются как оценка терапевтической переносимости препарата, его фармакодинамического или фармакокинетического профиля. Все данные, полученные в доклинических исследованиях, а именно информация о фармакологически активной дозе, полная токсикологическая характеристика ЛП и его фармакокинетика (абсорбция, распределение, метаболизм и экскреция), должны учитываться при определении МРНД.

Расчет МРНД должен проводиться после того, как будут проанализированы результаты доклинических токсикологических исследований, проведенные в соответствии с существующими правилами [4].

Для каждого фармакологического вещества должна быть определена наибольшая доза, исследованная на животных, которая не вызывала существенных изменений в состоянии гомеостаза животных, получавших препарат, по сравнению с контрольной группой. Эта доза может быть названа дозой без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ). Затем эту дозу преобразуют в эквивалентную дозу для человека (ЭДЧ), используя соответствующие коэффициенты пересчета (КП). К полученной величине следует применить коэффициент безопасности (КБ), чтобы усилить уверенность в том, что первая доза для человека не вызовет отрицательных эффектов. КБ необходим, поскольку люди могут быть более чувствительны к токсическому действию ЛС, чем это прогнозируется по результатам исследований на животных, биодоступность препарата у разных видов животных и человека может различаться, и, кроме того, не все нежелательные эффекты у людей могут быть оценены в исследованиях на животных. Например, глазные расстройства или боль (например, сильные головные боли) у человека могут быть существенным проявлением токсичности препарата, ограничивающим величину его дозы, но при исследованиях на животных эти явления могут остаться незамеченными. КБ в большинстве случаев не должен быть менее 10. Дозу МРНД находят, уменьшив дозу ЭДЧ на КБ. Забота о здоровье волонтеров или недостатки, отмеченные в планировании доклинических токсикологических исследований на животных, могут привести к необходимости увеличения коэффициента безопасности и, следовательно, еще большему снижению дозы МРНД. Наоборот, если есть информация о хорошей переносимости ЛП, относящихся к данному фармакологическому или химическому классу, то можно ослабить требования и допустить уменьшение стандартного КБ и, соответственно, увеличение дозы МРНД. Этот алгоритм рассчитывает МРНД в мг/кг, что представляет собой обычный способ выражения доз при проведении I-фазы КИ, однако при желании можно использовать мг/м² для расчета окончательной дозы, применяя соответствующие уравнения и коэффициенты.

4. Описание метода

4.1. Определение дозы фармакологического вещества без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ) у животных

На первом этапе оцениваются данные токсикологического изучения препарата на животных, чтобы определить величину ДБНОЭ для каждого вида животных. Существуют несколько определений для дозы ДБНОЭ, но для выбора начальной дозы используют следующую формулировку: самый высокий уровень дозы, который не вызывает значительного усиления отрицательного действия по сравнению с контрольной группой.

В этом контексте отрицательным действием является биологически значимое действие (даже если оно не является статистически значимым), которое следует учитывать при расчете дозы ДБНОЭ. Величина ДБНОЭ является общепризнанным эталоном безопасности, если она получена в ходе правильно выполненных исследований на животных и может служить начальной точкой для обоснованного расчета безопасной дозы нового ЛС для здоровых добровольцев.

Хотя природа и степень отрицательных эффектов может сильно различаться у разных типов ЛП и во многих случаях специалисты будут расходиться во мнениях относительно того, характеризовать ли выявленные эффекты как отрицательные, использование ДБНОЭ как ориентира для выбора максимально безопасной дозы для здоровых добровольцев необходимо.

При выборе этой дозы наибольшее значение имеют 2 позиции:

- 1) длительность введения препарата животным;
- 2) методы оценки влияния препарата на животных.

I-фаза КИ подразумевает применение нового препарата однократно или в течение нескольких дней. В связи с этим можно рекомендовать длительность введения препарата животным в соответствии с существующими правилами [4], т.е. не более 14 дней (табл. 1).

Таблица 1

Длительность применения препарата у человека	Длительность введения фармакологического вещества животным
Однократное введение	5–7 дней
2–6 дней	14 дней
7–14 дней	1 месяц
15–30 дней	2–4 месяца
1–6 месяцев	6–12 месяцев

Методы определения наиболее чувствительных органов или систем организма к препарату (органы-мишени) разнообразны. Использование физиологических, фармакологических, биохимических, гематологических, патоморфологических и других методов исследования в исследованиях на животных позволяет оценивать токсические свойства препарата и изменения структуры внутренних органов с использованием гистологических методов, влияние препаратов на внутриутробное развитие плода, возможное мутагенное или канцерогенное действие.

Оценка функционального состояния органов в хроническом токсикологическом эксперименте является очень важным исследованием. Однако при этом далеко не всегда учитывается один из важнейших принципов функциональных систем, сформулированный П.К. Анохиным, который гласит, что сила, отклоняющая параметры данной функции от нормального уровня, меньше силы сопротивления этому отклонению. Это особенно важно учитывать при длительном введении веществ в малых дозах: когда интенсивность воздействия не превышает критического уровня, адаптационные системы успевают включиться в процесс детоксикации и компенсировать функциональную недостаточность органа-мишени.

Компенсаторные возможности организма чрезвычайно велики, например, признаки функциональной недостаточности надпочечных желез у крыс проявляются только при поражении 9/10 ткани надпочечников. Поэтому при отсутствии отклонений от физиологической нормы показателей функционального состояния органов у экспериментальных животных при оценке токсичности потенциальных ЛС основным тестом, определяющим влияние препарата на организм, являются гистологические исследования. Доза препарата, при введении которой у животных обнаружены незначительные изменения в структуре органа-мишени, носящие обратимый характер и не определяющиеся после прекраще-

ния введения препарата, может быть принята за дозу без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ).

Величина ДБНОЭ включает в себя отсутствие только отрицательного воздействия на экспериментальных животных, чем и отличается от дозы, при введении которой не наблюдается никакого эффекта (ДБНЭ), поскольку некоторые эффекты, наблюдаемые в организме животного, могут проявляться за счет фармакологического действия препарата и не должны трактоваться как нежелательные эффекты.

4.2. Расчет эквивалентной дозы для человека (ЭДЧ)

Пересчет дозы с мг/кг на мг/м².

После того, как в токсикологических исследованиях на различных видах животных были определены величины ДБНОЭ, их пересчитывают в эквивалентные дозы для человека (ЭДЧ). Для этого следует выбрать самый подходящий метод экстраполяции дозы для животных на эквивалентную дозу для человека.

В настоящее время общепринятым методом для межвидовой экстраполяции доз, в том числе с животных на человека, является пересчет по площади поверхности тела [1]. Однако коэффициенты, используемые для пересчета доз из мг/кг в мг/м², имеют некоторую вариабельность в разных литературных источниках. Учитывая, что нормирование по площади поверхности тела обеспечивает разумный подход для расчета ЭДЧ, коэффициенты, используемые для пересчета доз для каждого вида, должны быть стандартизованы. Так как площадь поверхности тела варьирует в зависимости от массы тела, то и коэффициенты пересчета могут изменяться. Однако расчеты, выполненные для определения влияния массы тела на фактическую величину коэффициента пересчета по площади поверхности тела, показали, что стандартный коэффициент дает разумную оценку ЭДЧ в широком диапазоне величин массы тела животных и людей [13]. Авторами был рассчитан коэффициент пересчета для разных величин массы тела животных и в диапазоне массы тела человека от 50 до 80 кг. Проведенный авторами анализ позволил сделать следующие выводы:

— Различие в $\pm 20\%$ от стандартного коэффициента пересчета наблюдается в широком диапазоне величин массы животных и человека.

— Учитывая, что масса тела человека меняется в широких пределах, при расчете дозы ЭДЧ не обязательно обращать внимание на влияние изменения величины массы животных внутри вида.

— Если в ходе токсикологического исследования встречается крайнее значение массы тела животного, то можно рассчитать точный коэффициент пересчета, используя соотношение ($M_{\text{животного}}/M_{\text{человека}}$).

В итоге суммирования данных литературы, рекомендаций FDA [13] и результатов собственных исследований [1] предложены коэффициенты пересчета для использования в качестве стандартных величин при межвидовом пересчете дозы для определения ДБНОЭ (табл. 2).

Таблица 2

Пересчет дозы с животных на человека

Вид	Чтобы пересчитать дозу для животных или человека (мг/кг) в дозу с учетом площади поверхности тела (мг/м ²), нужно умножить на $K_{\text{п}}$	Чтобы пересчитать дозу для животных, мг/кг, в ЭДЧ ^а в мг/кг, нужно:	
		разделить дозу для животного на $K_{\text{п}}$	умножить дозу для животного на $K_{\text{п}}^{-1}$
Человек	37	—	—
Ребенок (20 кг) ^б	25	—	—
Мышь	3	12,0	0,09

Вид	Чтобы пересчитать дозу для животных или человека (мг/кг) в дозу с учетом площади поверхности тела (мг/м ²), нужно умножить на K_{Π}	Чтобы пересчитать дозу для животных, мг/кг, в ЭДЧ в мг/кг, нужно:	
		разделить дозу для животного на K_{Π}	умножить дозу для животного на $K_{\Pi}-1$
Хомяк	5	7,4	0,13
Крыса	6	6,0	0,17
Хорек	7	5,3	0,19
Морская свинка	8	4,7	0,22
Кролик	12	3,2	0,32
Собака	20	1,8	0,55
Приматы:			
Обезьяны ^с	12	3,2	0,32
Мартышка	6	6,0	0,16
Беличья обезьяна	7	5,3	0,19
Бабуин	20	1,8	0,54
Микросвинья	27	1,4	0,73
Карликовая свинья	35	1,1	0,95

^а Исходя из массы тела человека 50–80 кг.

^б Эта величина K_{Π} приводится только для справки, так как здоровые дети редко бывают добровольцами на I-фазе КИ.

^с Например, человекообразные обезьяны, макака-резус и короткохвостая макака.

Пример пересчета дозы в мг/кг в дозу в мг/м² для одного и того же вида животных или человека

Чтобы пересчитать дозу, выраженную в мг/кг, на дозу, выраженную в мг/м², для одного и того же вида животного или человека, необходимо дозу в мг/кг умножить на коэффициент пересчета на площадь поверхности тела K_{Π} (мг/м²), который равен массе тела в кг, разделенной на площадь поверхности тела в м².

Формула:	мг/кг × K_{Π} = мг/м ²
для пересчета дозы 30 мг/кг в мг/м ² для собаки:	$30 \times 20 = 600$ мг/м ²
для пересчета дозы 2,5 мг/кг в мг/м ² для человека:	$2,5 \times 37 = 92,5$ мг/м ²

Пример пересчета дозы без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ) для животного в мг/кг в эквивалентную дозу для человека в мг/кг (ЭДЧ)

Дозу ЭДЧ (мг/кг) можно рассчитать непосредственно по дозе для животного (мг/кг), *разделив* дозу для животного на K_{Π} для человека и животного или *умножив* на коэффициент $K_{\Pi}-1$ для животного и человека, округлив полученные показатели до единицы.

Метод деления

$$ЭДЧ = \frac{ДБНОЭ(мг / кг)}{K_{\Pi}}$$

Пример:

$$ЭДЧ = \frac{ДБНОЭ \text{ для собак } 30 \text{ мг / кг}}{1,8(K_{II})} = 16 \text{ мг / кг.}$$

$$ЭДЧ = \frac{ДБНОЭ \text{ для крыс } 30 \text{ мг / кг}}{6,0(K_{II})} = 5 \text{ мг / кг.}$$

$$ЭДЧ = \frac{ДБНОЭ \text{ для обезьян } 30 \text{ мг / кг}}{3,2(K_{II})} = 9,4 \text{ мг / кг.}$$

Метод умножения

$$ЭДЧ = ДБНОЭ(\text{мг / кг}) \times K_{II} - 1.$$

Пример:

$$ЭДЧ = ДБНОЭ \text{ для собак } 30 \text{ мг / кг} \times 0,54 = 16,2(16) \text{ мг / кг.}$$

$$ЭДЧ = ДБНОЭ \text{ для крыс } 30 \text{ мг / кг} \times 0,16 = 4,8(5) \text{ мг / кг.}$$

$$ЭДЧ = ДБНОЭ \text{ для обезьян } 30 \text{ мг / кг} \times 0,32 = 9,6(10) \text{ мг / кг.}$$

Возможные отклонения от метода определения ЭДЧ по площади поверхности тела

Отклонения от метода определения ЭДЧ с учетом площади поверхности тела при переводе дозы с животного на человека должны быть четко обоснованы, поскольку величина ЭДЧ, вычисленная на основе мг/кг без K_{II} даст величину ЭДЧ, которая будет примерно в 12, 6 и 2 раза превышать величину, полученную при стандартном методе с использованием нормирования по мг/м² для мышей, крыс и собак соответственно. В связи с этим для определения ЭДЧ необходимо придерживаться метода пересчета по поверхности тела, так как он позволяет получить более безопасные величины МРНД.

Возможность использования прямого пересчета дозы в мг/кг допустима, если имеются только две величины ДБНОЭ, полученные в токсикологических исследованиях на разных видах животных при обязательном наличии одного из следующих положений:

- ЛС вводят перорально, и доза ограничена локальной токсичностью (18).
- Токсичность для людей зависит от времени воздействия, которое тесно взаимосвязано с дозой, выраженной в мг/кг. Так, для некоторых ЛС величина C_{\max} коррелирует с дозой, выраженной в мг/кг у различных видов животных.
- Другие фармакологические и токсикологические предельные величины ЛС также определяются между видами в мг/кг. К таким предельным величинам относятся МПД, наименьшая летальная доза и фармакологически активная доза.
- Существует надежная корреляция между уровнями содержания лекарства в плазме (C_{\max} и АУС) и дозой, выраженной в мг/кг.

Межвидовой пересчет на основе мг/м² не рекомендуется для следующих категорий ЛП:

1. ЛП, вводимые несколькими разными путями (например, подкожно, внутримышечно, интраназально, местно), для которых доза ограничена локальной токсичностью. Такие лекарства следует нормировать по концентрации (например, мг/площадь нанесения) или по количеству лекарства (мг) в месте введения.

2. Лекарства, вводимые в области тела с дальнейшим незначительным распространением за пределы этой области. В качестве примера можно привести интраторакальный, внутрипузырный, внутриглазной или внутриплевральный путь введения. Такие лекарства следует нормировать по видам в соответствии с объемами областей тела и концентрациями лекарства.

3. Белки с $M_r > 100000$ дальтон, вводимые внутривенно. Такие препараты следует нормировать в мг/кг.

4.3. Выбор самых подходящих видов животных

В соответствии с существующими правилами доклинические токсикологические исследования проводятся на нескольких видах лабораторных животных [3].

После того, как значения ЭДЧ были определены по величинам ДБНОЭ на всех изученных видах животных, следует выбрать одну дозу ЭДЧ для последующего расчета величины МРНД. Эту величину ЭДЧ следует выбирать по результатам токсикологических исследований, полученным на самых подходящих для данного препарата видах животных.

При отсутствии дополнительной информации, помогающей выбрать самый подходящий вид животных, как правило, исходят из того, что самым подходящим видом является самый чувствительный вид животных, поскольку использование наименьшей ЭДЧ обеспечивает самую безопасную начальную дозу для человека.

Однако это положение нельзя считать универсальным. Некоторые виды животных могут рассматриваться как неподходящие для оценки токсичности определенных классов фармакологических средств [1]. Например, морские свинки высоко чувствительны к пенициллину, тетрациклину и другим антибактериальным препаратам [2], кролики высоко чувствительны к антиаритмикам. Ульцерогенный эффект ибупрофена наблюдается у собак в очень низких дозах, хотя для человека это препарат считается одним из самых слабых ульцерогенов среди нестероидных противовоспалительных препаратов (НПВП). При такой специфической чувствительности какого-то вида животных к ЛП он не может считаться самым подходящим видом для определения МРНД [1].

Если имеется информация, что определенный вид животных является наиболее пригодным для оценки риска для человека, то ДБНОЭ для этого вида можно использовать в последующих расчетах МРНД, независимо от того, является ли этот вид самым чувствительным. Эта ситуация применима к оценке безопасности ЛС, полученных на основе биотехнологии, многие из которых обладают высокой селективностью к связыванию с определенными белками человека и проявляют ограниченную реакционную способность у видов, которые обычно используют для изучения токсичности. В таких случаях до планирования токсикологических исследований необходимо изучить в опытах *in vitro* процессы связывания, чтобы выбрать наиболее подходящий вид животных для расчета МРНД [6, 14].

При определении МРНД для первой фазы КИ нового препарата, когда неизвестны параметры абсорбции, распределения и экскреции у людей, в опытах *in vitro* могут быть получены очень важные данные по метаболизму. Эти данные имеют первостепенное значение, когда ДБНОЭ очень различаются у разных видов животных. Опыт, накопленный при оценке токсичности данного класса фармакологических веществ, может подсказать, какой вид животных является более подходящим для расчета МРНД препарата, относящегося к этому классу. Например, обезьяна считается наиболее подходящим видом для КИ безопасности тиофосфорных соединений, так как у обезьян, в отличие от грызунов, показатели токсичности близки к человеку. Для ЛС, относящихся к этому химическому классу, величина МРНД обычно основывается на ЭДЧ, рассчитанной по величине ДБНОЭ для обезьян, независимо от того, будет ли она ниже, чем соответствующая величина для грызунов, если только среди грызунов не наблюдались значительные токсические явления [12].

Если у вида животных, считающегося менее пригодным для оценки токсичности данного препарата, обнаружены серьезные токсические эффекты, то они должны обязательно учитываться при расчете МРНД. Например, если при доклинических токсикологических исследованиях у собак были обнаружены изменения со стороны ССС, то для расчета МРНД должен быть выбран именно этот вид животных, несмотря на то, что,

на основании данных по фармакологической активности крыса считалась более подходящим видом.

Биологическая активность вместе с видовой и/или тканевой спецификой многих ЛП, производимых с использованием биотехнологий, часто делает невозможным использование в токсикологических исследованиях обычных видов животных (крысы и собаки). В опытах *in vitro* клетки млекопитающих могут быть использованы для предсказания определенных аспектов действия *in vivo* и количественной оценки относительной чувствительности различных видов (включая человека) к препаратам, полученным на основе биотехнологий. Такие исследования могут проводиться, например, в целях определения рецепторов, с которыми они взаимодействуют, и быть полезными при выборе оптимальных видов животных для токсикологических исследований *in vivo*. Обобщенные результаты исследований *in vitro* и *in vivo* помогают более правильно определить МРНД для первой фазы КИ препаратов, созданных на основе биотехнологии.

В случае моноклональных антител иммунологические свойства препарата должны быть изучены детально, включая особенности антигенов, а также их токсичность по отношению к человеческим тканям с обязательным использованием соответствующих иммуногистохимических методов (6).

Программы оценки безопасности ЛП обычно должны предусматривать использование двух подходящих видов животных. Однако в определенных случаях может быть достаточным использование одного вида. Например, в случае, когда был определен только один подходящий вид, либо в случаях, когда биологическое действие биофармацевтического препарата хорошо известно. Кроме того, даже в тех случаях, когда для оценки токсичности с проведением краткосрочных исследований необходимо использование двух видов животных, для такой оценки с проведением долгосрочных исследований может быть достаточным использование одного вида. Например, когда токсикологические характеристики препарата, полученные при проведении краткосрочных исследований на двух видах животных, являются схожими.

Данные, полученные при изучении токсичности на животных неподходящих видов, могут ввести в заблуждение и не должны использоваться при расчете МРНД. При отсутствии подходящих видов животных следует изучить возможность использования трансгенных животных, имеющих рецепторы, близкие к человеческим. Информация, полученная при использовании трансгенных животных, имеющих сходные с человеческими рецепторы, оптимизируется, когда взаимодействие препарата и рецептора имеет физиологические последствия, схожие с ожидаемыми для человека.

4.4. Применение коэффициента безопасности (КБ)

После того, как доза ЭДЧ была определена по величине ДБНОЭ для самого подходящего вида животных, следует использовать коэффициент безопасности (КБ), чтобы найти границы безопасности для защиты людей, принимающих начальную клиническую дозу. Необходимость использования КБ при определении МРНД обусловлена несколькими причинами:

1) возможное наличие повышенной чувствительности к фармакологическому средству людей по сравнению с животными; 2) трудности в определении некоторых видов токсичности у животных (головная боль, мышечная боль, психические расстройства); 3) различия в качестве или количестве рецепторов; 4) появление неожиданных видов токсичности; 5) значительные межвидовые различия в показателях токсичности и др. Эти различия можно учесть, уменьшив начальную дозу для человека, рассчитанную по дозе ЭДЧ, которая была получена из величины ДБНОЭ для выбранного вида животных.

На практике величина МРНД для КИ должна быть определена путем деления ЭДЧ, найденной по величине ДБНОЭ для животных, на КБ. Стандартный КБ, которым обычно пользуются, равен 10. Это исторически принятая величина, но, как описано ниже, она должна быть оценена на основе имеющейся информации.

КБ, равный 10, может не подходить для всех случаев. Его следует увеличить, если есть причина для серьезных опасений проявления нежелательных эффектов у волонтеров, или уменьшить, если опасения невелики, потому что имеющиеся дополнительные данные гарантируют безопасность. Степень увеличения или уменьшения выбирают, главным образом, исходя из здравого смысла и используя имеющуюся информацию. Исследователь обязан привести четкие доводы в пользу примененного КБ, если он отличается от стандартной величины, равной 10, в особенности, если он ниже 10.

А. Увеличение коэффициента безопасности (КБ) необходимо в следующих случаях:

— *Крутая кривая, отражающая зависимость доза/эффект.* Крутая кривая, отражающая зависимость доза/эффект у подходящего вида животных или у нескольких видов может указывать на больший риск для человека.

— *Высокая токсичность.* Высокая степень токсичности, особенно повреждение ЦНС указывает на повышенный риск для людей.

— *Токсичность без предостерегающих признаков.* Если развитие патологии не связано надежно с предупреждающими признаками у животных, то при исследованиях на людях может быть затруднено определение начала токсического действия. Например, развитие патологии в надпочечных железах может длительный период времени не проявляться клинически, вплоть до развития необратимых процессов в надпочечниках (1).

— *Значительное различие токсичности препарата у нескольких видов животных.* Резкое различие в показателях токсичности у нескольких видов животных, которых используют для определения величины ЭДЧ, предполагает большую возможность недооценки токсичности для людей.

— *Большой разброс в показателях токсичности у животных, получающих одну и ту же дозу препарата.* Когда дозы или концентрации препарата, при которых развивается токсический эффект, значительно различаются у отдельных животных, то возможность прогнозирования токсичной дозы ухудшается.

— *Нелинейная фармакокинетика.* Когда концентрация препарата в плазме крови не увеличивается пропорционально дозе, то возможность прогнозирования токсичной дозы для людей уменьшается.

— *Неадекватные данные о реакции на дозу.* Плохое планирование исследований (например, малое число исследованных доз, широкие интервалы между введениями каждой дозы) могут затруднить описание кривой зависимости доза/эффект.

— *Новые терапевтические показания.* Новые терапевтические показания или новые способы применения ЛС, которые ранее не были клинически оценены, могут увеличить ненадежность использования данных доклинических исследований на животных для обоснования безопасной начальной дозы для людей.

— *Использование животных с недостаточной чувствительностью к препарату.* Некоторые классы лекарственных биопрепаратов могут иметь выраженную иммуногенность, либо работать по механизмам, в отношении которых отсутствуют данные об их переносе с животных на человека. В этих случаях данные по безопасности, полученные в рутинных исследованиях на животных, могут быть очень ограниченными по объему и интерпретации.

Б. Уменьшение коэффициента безопасности может быть в следующих случаях:

— Если величина ДБНОЭ была определена на основании исследований хронической токсичности с большей длительностью введения препарата, чем предполагаемые КИ на здоровых добровольцах [4]. В этом случае ДБНОЭ имеет большую степень безопасности, так как она связана с большей длительностью воздействия препарата на организм животных, чем предполагается применение у волонтеров во время проведения I-фазы КИ.

— Если потенциальное ЛС относится к хорошо охарактеризованному классу (как экспериментально, так и клинически с точки зрения безопасности). При этом препараты должны иметь один и тот же путь введения; схема и длительность применения должны быть идентичны; они должны иметь сходный метаболический профиль и биодоступ-

ность; кроме того, у них должны быть близкие показатели токсичности, полученные на животных, и хорошая переносимость у людей. Токсикологическое исследование в этих случаях должно быть самого высокого класса, как по планированию, так и по проведению.

— Если токсические изменения в организме животных, вызванные препаратом, легко отслеживаются, обратимы, предсказуемы и имеют прямую зависимость между дозой и реакцией от умеренной до слабо выраженной. При этом токсические эффекты должны быть сопоставимы у всех испытуемых видов животных, как качественно, так и количественно.

4.5. Обсуждение фармакологически активной дозы

Выбор фармакологически активной дозы (ФАД) нового фармакологического средства для проведения КИ определяется соответствующими методическими рекомендациями. Однако после того как была определена МРНД, ее полезно сравнить с ФАД, определенной в доклинических фармакологических исследованиях. Если ФАД определена в исследованиях *in vivo* в мг/кг, то дозу ЭДЧ можно найти, используя соответствующий коэффициент пересчета. Эту величину ЭДЧ нужно сравнивать непосредственно с МРНД. Если фармакологическая доза ЭДЧ ниже, чем МРНД, то следует начинать клиническое изучение с этой дозы, постепенно повышая ее до уровня МРНД. Кроме того, для некоторых фармакологических групп ЛС или биопрепаратов (например, сосудорасширяющих средств, антикоагулянтов, моноклональных антител или факторов роста) токсичность может возникать в результате чрезмерного фармакологического действия. Доза ФАД в этих случаях может быть более чувствительным индикатором, чем ДБНОЭ, и таким образом может явиться основанием для понижения МРНД.

Заключение

Стратегия определения максимальной рекомендованной начальной дозы (МРНД) для проведения I-фазы КИ новых потенциальных ЛП с участием взрослых здоровых добровольцев сводится к следующему. Величины ДБНОЭ, определенные в качественно проведенных токсикологических исследованиях на различных видах животных, пересчитывают в величины ЭДЧ, используя коэффициенты пересчета. Используя разумные научные подходы, следует применить коэффициент безопасности (КБ) к величинам ЭДЧ, найденным для самых подходящих видов животных, чтобы получить МРНД. Этот процесс рассчитан на нахождение верхнего предела рекомендованной начальной дозы и ни в коей мере не препятствует использованию препаратов в более низких начальных дозах.

Такой подход к оценке безопасности нового фармакологического средства для волонтеров будет способствовать стандартному выбору МРНД, что защитит волонтеров от нежелательных явлений нового потенциального ЛП и будет соответствовать современным международным гармонизированным требованиям.

Литература

1. Гуськова Т.А. // Токсикология лекарственных средств. М., 2003. — С. 153.
2. Кивман Г.Я. и соавт. // БЭБМ, 1959. — № 10. — С. 52–55.
3. Надлежащая клиническая практика. Издание официальное. ГОСТ Р 52379-5005.
4. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М., 2005, с. 41–54.
5. Там же. С. 204–209.
6. Там же. С. 209–216.
7. Boxenbaum H., C DiLea, 1995, First-Time-in-Human Dose Selection: Allometric Thoughts and Perspectives, *Journal of Clinical Pharmacology*, 35: 957–966.
8. Burtles, S.S., D.R. Newell, R.E.C. Henrar, T.A. Connors, 1995, Revisions of General Guidelines for the Preclinical Toxicology of New Cytotoxic Anticancer Agents in Europe, *European Journal of Cancer*, 31A: 408–410.

9. Contrera, J.F., A.C. Jacobs, R.P. Hullahalli, M. Mehta, W.J. Schmidt, J.A. DeGeorge, 1995, Systemic Exposure – Based Alternative to the Maximum Tolerated Dose for Carcinogenicity Studies of Human Therapeutics, *Journal of American College of Toxicology*, 14: 1–10.
10. EPA, 1992, A Cross-Species Scaling Factor for Carcinogen Risk Assessment Based on Equivalence of $M_r/k_r0.75/\text{Day}$, *Federal Register*, 57: 24152–24173.
11. Freireich, E.J., E.A. Gehan, D.P. Rall, L.H. Schmidt, H.E. Skipper, 1966, Quantitative Comparison of Toxicity of Anticancer Agents in Mouse, Rat, Hamster, Dog, Monkey, and Man, *Cancer Chemotherapy Reports*, 50: 219–244.
12. Geary, R.S., J.M. Leeds, S.P. Henry, D.K. Monteith, A.A. Levin, 1997, Antisense Oligonucleotide Inhibitors for the Treatment of Cancer: 1. QUESTION Pharmacokinetic Properties of Phosphorothioate Oligodeoxynucleotides, *Anti-Cancer Drug Design*, 12: 383–393.
13. Guidance for Industry Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers Food and Drug Administration Center for Drug Evaluation and Research (CDER), July 2005, *Pharmacology and Toxicology*.
14. ICH Guidance for Industry, S6 Preclinical Safety Evaluation of Biotechnology-Derived Pharmaceuticals. 1997.
15. ICH Guidance for Industry, S3A Toxicokinetics: The Assessment of Systemic Exposure in Toxicity Studies, 1997.
16. ICH Guidance for Industry, M3 Nonclinical Safety Studies for the Conduct of Human Clinical Trials for Pharmaceuticals, 1997.
17. Lowe, M.C. R.D. Davis, 1998, The Current Toxicology Protocol of the National Cancer Institute, in K. Hellman, S.K. Carter (eds.), *Fundamentals of Cancer Chemotherapy*, pp. 228–235, New York: McGraw Hill.
18. Mahmood, I, M.D. Green, J.E. Fisher, 2003, Selection of the First-Time Dose in Humans: Comparison of Different Approaches Based on Interspecies Scaling of Clearance, 43(7): 692–697.
19. Mordenti, J, 1986, Man Vs. Beast: Pharmacokinetic Scaling in Mammals, *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 75: 1028–1040.
20. Reigner, B.G. K.S. Blesch, 2002, Estimating the Starting Dose for Entry into Humans: Principles and Practice, *European Journal of Clinical Pharmacology*, 57: 835–845.

ГЛАВА 59

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО РАЗРАБОТКЕ ПЛАНА ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

Составители: к. б. н. А.Н. Васильев; д. м. н. О.Л. Верстакова; к. б. н. Г.Н. Енгальцева;
к. м. н. Р.Д. Сюбаев

Общие положения

В соответствии с действующими нормативными правовыми документами, один из необходимых документов, из которых формируется регистрационное досье на лекарственный препарат для медицинского применения в целях его государственной регистрации, — это отчет о результатах доклинического исследования лекарственного средства для медицинского применения, содержащий описание, результаты и статистический анализ результатов данного доклинического исследования.

Программа доклинических исследований лекарственного препарата должна быть научно обоснована.

1. Изучение безопасности и эффективности лекарственного средства *in vitro* и *in vivo*

При проведении экспертизы лекарственных средств осуществляется оценка выбора экспериментальных моделей исследования и (или) тест-систем, объема выполненных доклинических исследований лекарственного препарата, который определяется целью установления его фармакодинамических эффектов, механизма действия и потенциальных побочных действий и включает следующее:

Изучение фармакодинамических свойств лекарственного препарата:

- а) основных фармакодинамических (иммунологических) эффектов;
- б) фармакологических эффектов, не связанных с заявленным показанием к применению;
- в) влияния на сердечно-сосудистую систему, центральную нервную систему, дыхательную систему, желудочно-кишечный тракт;
- г) фармакодинамического взаимодействия лекарственного препарата;

Изучение фармакокинетических свойств лекарственного препарата:

- а) всасывания лекарственного препарата;
- б) распределения лекарственного препарата;
- в) метаболизма лекарственного препарата;
- г) выведения лекарственного препарата;
- д) фармакокинетического взаимодействия лекарственного препарата;

Изучение токсикологических свойств лекарственного препарата:

- а) токсичность при однократном введении (острая токсичность);
- б) токсичность при повторном введении (подострая и хроническая токсичность);
- в) мутагенность;
- г) канцерогенность;
- д) репродуктивная и онтогенетическая токсичность;
- е) раздражающее действие;

ж) другие токсикологические исследования (антигенность, иммунотоксичность и др.) (при наличии).

2. Рекомендации по разработке плана доклинических исследований лекарственных средств

При планировании доклинических исследований и подготовке отчета рекомендуется использовать методологические подходы, изложенные в методических рекомендациях настоящего Руководства. В случае применения других отечественных или зарубежных методических рекомендаций при составлении отчета целесообразно представить обоснование и описание их со ссылками на открытые источники.

Характеристики лекарственного препарата, которые следует учитывать при разработке плана доклинических исследований.

По степени инновационности различают: оригинальные, воспроизведенные и прочие ЛП.

По цели экспертизы: КИ, регистрация, продление регистрации, внесение изменений в материалы регистрационного досье.

По цели КИ:

1) установление безопасности лекарственных препаратов для здоровых добровольцев и (или) переносимости их здоровыми добровольцами;

2) подбор оптимальных дозировок лекарственного препарата и курса лечения для пациентов с определенным заболеванием, оптимальных доз и схем вакцинации иммунобиологическими лекарственными препаратами здоровых добровольцев;

3) установление безопасности лекарственного препарата и его эффективности для пациентов с определенным заболеванием, профилактической эффективности иммунобиологических лекарственных препаратов для здоровых добровольцев;

4) изучение возможности расширения показаний для медицинского применения и выявления ранее не известных побочных действий зарегистрированных лекарственных препаратов.

По регистрационному статусу: разрешенные к медицинскому применению в стране производителя и других странах, не разрешенные к медицинскому применению в стране производителя и других странах.

По степени клинической апробации: разрешенные к проведению КИ в других странах, не разрешенные к проведению КИ в других странах.

По происхождению: химический синтез, природного происхождения, полученные биотехнологическими методами, полученные нанотехнологическими методами.

По степени экспериментального изучения предлагаемого ЛС: фармакологическая активность и токсичность изучены полностью в соответствии с современными требованиями, изучены отдельные виды активности и токсичности, предлагаемое ЛС в экспериментальных исследованиях не изучалась.

По степени экспериментального изучения и наличия информации в открытой научной литературе: активные и вспомогательные компоненты изучены в соответствии с современными требованиями отечественными или зарубежными исследователями, в материалах регистрационного досье имеются ссылки на литературные источники, активные и вспомогательные компоненты лекарственной формы частично изучены в соответствии с современными требованиями отечественными или зарубежными исследователями; сведений не представлено.

По адекватности представления результатов экспериментальных исследований и научного анализа литературы в проекте инструкции и/или протоколе КИ: соответствует материалам регистрационного досье и данным научной литературы, не соответствует.

По наличию информации о наблюдении за побочными эффектами заявляемой лекарственной формы: имеется, нет.

При разработке плана доклинических фармакотоксикологических исследований лекарственного средства необходимо учитывать все вышеперечисленные факторы для получения объективной научной информации о фармакологических и токсикологических свойствах лекарственного препарата и последующего ее применения при создании протокола клинических исследований и инструкции по применению лекарственного препарата для медицинского применения.

Основной целью доклинических фармако-токсикологических исследований воспроизведенного ЛС является получение доказательств идентичности его фармакологических и токсикологических свойств соответствующему оригиналу. В связи с этим рекомендуется проводить сравнительные доклинические фармакологические и/или токсикологические и аналитические исследования: сравнение с оригинальным ЛС или с зарегистрированным аналогом; сравнение с соответствующими литературными данными.

В таблице представлена стратегия составления плана доклинических исследований лекарственного средства на примере некоторых категорий лекарственных препаратов.

Таблица

Дифференцированный подход к необходимому объему доклинических фармако-токсикологических исследований лекарственного средства/лекарственного препарата

Категории лекарственных средств	I Изучение фармакологических свойств					II Изучение токсикологических свойств							III								
	1	2	3	4	5					6			7				8				
	1	2	3	4	5.1.	5.2.	5.3.	5.4.	5.5.	6.1.	6.2.	6.3.	7.1.	7.2.	7.3.	7.4.	7.5.	8.1.	8.2.	8.3.	
Регистрация																					
Оригинальные	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
Воспроизведенные										+	+							+	+	+	
Внесение изменений в регистрационное досье																					
Лекарственные препараты с новыми показаниями	+	**																	+	+	+

Примечание. I – Изучение фармакологических свойств лекарственного препарата: 1 – изучение основных фармакологических эффектов, связанных с заявленным показанием к применению, и механизмов действия; 2 – изучение фармакологических эффектов, не связанных с заявленным показанием к применению; 3 – изучение влияния на сердечно-сосудистую систему, дыхательную систему, желудочно-кишечный тракт; 4 – изучение фармакодинамического взаимодействия; 5 – изучение фармакокинетических свойств. 5.1 – изучение всасывания; 5.2 – изучение распределения; 5.3 – Изучение метаболизма; 5.4 – изучение выведения; 5.5 – изучение фармакинетического взаимодействия;

II – Изучение токсикологических свойств лекарственного препарата: 6 – изучение общетоксического и местнораздражающего действия; 6.1 – изучение острой токсичности; 6.2 – изучение подострой токсичности; 6.3 – изучение хронической токсичности; 7 – изучение специфической токсичности: 7.1 – изучение мутагенности; 7.2 – изучение канцерогенности; 7.3 – изучение репродуктивной и онтогенетической токсичности; 7.4 – изучение аллергизирующего действия; 7.5 – изучение иммунотоксического действия.

III – Оценка отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственного препарата: 8 – оценка результатов фармако-токсикологических исследо-

ваний: 8.1 — определение безопасной дозы ЛП для проведения КИ; 8.2 — определение показателей широты терапевтического действия; 8.3 — экстраполяция риска для пациентов по соотношению токсических и терапевтических доз с учетом токсикокинетических/фармакокинетических параметров.

* В сравнении с зарегистрированным аналогом.

** Если ранее разрешенные способ применения и режим дозирования ЛП для взрослых не меняются и ЛП не предлагаются для применения у детей или у беременных и кормящих женщин.

При разработке плана доклинических исследований ЛП для взрослых, предлагаемого для клинических исследований по новым показаниям, достаточно представления результатов изучения основных фармакологических эффектов, связанных с заявленным показанием к применению (специфической фармакологической активности), если ранее разрешенные способ применения и режим дозирования не меняются и если ЛП не предлагается для применения у детей или у беременных и кормящих женщин.

Для государственной регистрации лекарственного препарата для медицинского применения в Российской Федерации необходимо представление отчета о результатах доклинического исследования лекарственного средства для медицинского применения, содержащего описание, результаты и статистический анализ результатов данного доклинического исследования.

3. Критерии, устанавливающие научную обоснованность программы доклинических исследований по оригинальным лекарственным препаратам (в т.ч. новые комбинации ЛС)

1. Надлежащее описание методов (состав исследуемого препарата, характеристика тест-объекта — вид, пол, масса тела животных, количество в группе; способ ведения, дозы/концентрации, схема введения, продолжительность введения).

2. Надлежащее представление результатов (оформление данных, доза–эффект, концентрация–эффект, продолжительность/обратимость эффектов, особенности действия в зависимости от тест-объекта и способа введения, количественные параметры эффектов — ЭД (эффективные дозы), ЭК (эффективные концентрации), ЛД (летальные дозы), МПД (максимально переносимые дозы), НТД (нетоксические дозы), ВНТД (высшая нетоксическая доза) и др.).

3. Наличие характеристики спектра и механизмов фармакологического/токсического действия, широты терапевтического действия, побочных эффектов (фармакологических, токсикологических).

4. Наличие специальных исследований метаболитов, вспомогательных веществ, примесей.

5. Наличие изучения лекарственного взаимодействия (фармакологическое, токсикологическое, фармакокинетическое).

6. Наличие экстраполяции риска для пациентов по соотношению токсических и терапевтических доз с учетом токсикокинетических и клинических фармакокинетических параметров (AUC , C_{max}).

7. Наличие анализа корреляции результатов доклинических и клинических исследований (побочные эффекты).

8. Соответствие информации, содержащейся в инструкции (сведения о фармакологических/токсических свойствах, режим дозирования, показания, противопоказания, побочное действие) и информации о результатах фармако-токсикологических исследований.

9. Наличие основных показателей спектра токсичности ЛС:

— Количественные параметры токсичности:

а) величины LD_{50} при разных путях введения;

б) диапазон безопасных доз при хроническом введении.

— Показатели, свидетельствующие о механизме токсического действия ЛС, его токсикокинетических свойствах:

- а) характеристика состояния гомеостаза;
- б) органы-мишени токсического действия.

— Показатели, характеризующие специфическую токсичность ЛС — сведения о мутагенных, канцерогенных, репротоксических свойствах, аллергизирующем действии, иммунотоксичности, способности к кумуляции и др.

4. Критерии, устанавливающие научную обоснованность программы доклинических исследований по воспроизведенным лекарственным препаратам

1. Надлежащее описание методов (состав исследуемого ЛП, характеристика тест-объекта — вид, пол, масса тела животных, количество в группе; способ ведения, дозы/концентрации, схема введения, продолжительность введения).

2. Надлежащее представление результатов фармако-токсикологических исследований ЛП (острая и подострая (субхроническая) токсичность, местно-раздражающее действие в сравнении с зарегистрированным аналогом).

В случае воспроизведенного лекарственного средства дополнительно к результатам доклинических фармако-токсикологических исследований допустимо представление отчета о доклиническом исследовании, содержащего сведения и данные, опубликованные в специализированных печатных изданиях.

Рекомендации по составлению плана фармакокинетических исследований лекарственных средств, а также особенности составления плана фармакологических (по сокращенной сравнительно с оригинальными ЛС программе) и токсикологических исследований воспроизведенных ЛС отдельных фармакотерапевтических групп (например, противомикробных ЛС, противоопухолевых и др.) описаны в соответствующих методических рекомендациях настоящего руководства.

Подробная информация о токсических свойствах воспроизведенного препарата необходима при проведении сравнительной оценки спектра токсичности известных ЛС, предлагаемых для применения с новыми характеристиками и условиями (состав лекарственной формы, технология, режим дозирования, путь введения, способ применения, показания, возрастная группа и др.):

— при рассмотрении вопроса о безопасности клинических исследований или медицинского применения новых аналогов (в т.ч. для сравнительной оценки преимуществ и недостатков по экспериментальным показателям эффективности и безопасности);

— при изменении инструкции (например, расширение показаний — беременность, педиатрия; изменение режима дозирования — увеличение дозы/продолжительности курса) с учетом спектра токсичности и диапазона безопасных доз — терапевтической широты;

— при рассмотрении вопроса о безопасности или целесообразности безрецептурного применения препарата (в т.ч. для общей и сравнительной оценки токсических свойств и рисков применения препарата при самолечении: адекватность дозировки лекарственной формы, безопасный режим дозирования, дополнительные противопоказания, предостережения и др.);

— при определении «класс-специфичности» токсических эффектов (спектра токсичности) для информации в инструкции; для оценки неожиданных побочных эффектов при мониторинге ЛС;

— при разработке доказательных критериев для оценки результатов доклинического изучения безопасности ЛС; для определения наиболее перспективных научных направлений в разработке более безопасных и эффективных ЛС.

Дополнительные доклинические исследования известных ЛС могут потребоваться при:

— отсутствии достаточных сведений о токсичности препарата при расширении показаний к его применению (педиатрия, беременность, безрецептурный отпуск);

— изменении способа введения/лекарственной формы;

— изменении режима дозирования.

При оценке плана доклинических исследований ЛС определяется соответствие: цели доклинических исследований (изучение оригинального ЛС или новой комбинации ЛС, дополнительное изучение нового способа введения/лекарственной формы известного ЛС, подтверждение биоэквивалентности); основных направлений и разработка программы доклинических исследований (фармакодинамика, фармакокинетика, токсикология); программы исследований методическим требованиям правил лабораторной практики с учетом состава лекарственной формы, способа введения и рекомендуемого режима дозирования; продолжительности введения фармакологического средства экспериментальным животным при изучении хронической токсичности в зависимости от рекомендуемого курса его применения в клинике.

Заключение

В лекции, посвященной памяти выдающегося русского клинициста С.П. Боткина великий физиолог и фармаколог И.П. Павлов назвал лекарства «универсальным орудием врача». Любое «орудие» требует умелого с ним обращения. Непрерывно возрастают требования к познанию этого «орудия». Известна родственность понятий «Pharmakon» и «Toxicon». Врачу необходимо знание: а) фармакологических свойств лекарств и механизмов их действия — влияния на рецепторы, на метаболические процессы организма, включая биосинтез и «кругооборот» эндогенных физиологически активных соединений; б) фармакокинетических параметров: всасывания, распределения в организме, метаболизма и выведения; в) лекарственной токсикологии — общих и специфических токсикологических показателей, в том числе тератогенности, эмбриотоксичности, мутагенности, канцерогенности и аллергогенности препаратов, а также возможности поступления их в молоко кормящих матерей; г) последствий взаимодействия применяемого лекарства с другими лекарственными препаратами и допустимости их взаимного (одновременного или последовательного применения); особенностей действия лекарственных средств у детей и больных пожилого возраста (элементы педиатрической и гериатрической фармакологии) [6, 7].

Научно обоснованная программа доклинических фармако-токсикологических исследований лекарственного средства способствует получению объективных результатов фармакологических, фармакокинетических и токсикологических исследований на доклиническом этапе разработки и объективности, всесторонности, полноты экспертизы при оценке отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственного препарата для медицинского применения на этапе после проведения клинических исследований лекарственного средства.

Литература

1. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 53434-2009 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (утв. и введен в действие Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 2 декабря 2009 г. № 544-ст).
2. Национальный стандарт РФ ГОСТ Р 52379-2005 «Надлежащая клиническая практика» (утв. приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 27 сентября 2005 г. № 232-ст).
3. Приказ Минздравсоцразвития РФ от 23 августа 2010 г. № 708н «Об утверждении правил лабораторной практики».
4. Технический кодекс установившейся практики ТКП 125-2008 (02040) «Надлежащая лабораторная практика Министерства здравоохранения Республики Беларусь». Введен в действие Постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 28.03.2008 № 56.
5. Правила доклинической оценки безопасности фармакологических средств (GLP). Руководящий нормативный документ РД 64-126-91. — Москва, 1992. — 78 с.
6. Машковский М.Д. Лекарства XX века // М.: ООО «Издательство „Новая волна“, 1998. — 320 с.
7. Машковский М.Д. Фармакология: XX век — веку XXI // В мире лекарств. — 2000. — № 4(10). С. 4–7.

ГЛАВА 60

РАЦИОНАЛЬНЫЙ ВЫБОР НАИМЕНОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ (МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ)

*Составители: д. фарм. н. И.А. Баландина; д. фарм. н., проф. Н.Д. Бунятян;
к. б. н. А.Н. Васильев; д. фарм. н., проф. Н.Б. Дремова; к. м. н. В.В. Дудченко;
д. фарм. н. Е.Л. Ковалева; Л.В. Корнеева; академик РАМН, проф. Н.В. Медуницын;
д.м.н., проф. В.А. Меркулов; д. м. н. А.Н. Миронов; д. м. н., проф. А.А. Мовсисянц;
к. м. н. Н.А. Озерецковский; к. фарм. н. М.Р. Сакаев; к. фарм. н. И.В. Сакаева;
д. фарм. н., проф. Г.В. Шашкова; д. м. н., проф. А.Н. Яворский*

1. Введение

Современный фармацевтический рынок характеризуется чрезвычайным многообразием наименований ЛС, число которых с каждым годом продолжает увеличиваться. Сегодня более 1000 конкурирующих между собой отечественных организаций–производителей и зарубежных фармацевтических фирм из 80 стран мира предлагают потребителю более 10000 наименований ЛС.

Учитывая эти объективные реалии, очевидно, что одним из важнейших условий долгого и успешного пребывания ЛС на рынке является правильно выбранное наименование. В связи с этим производители выбирают наименования, исходя из маркетинговых соображений, так, чтобы они выгодно выделяли препарат из ряда предлагаемых конкурентами генерических аналогов. С позиции бизнеса наименование служит средством достижения высоких продаж и продвижения ЛП на рынке, а также является наиболее значимым и устойчивым элементом связи товара с потребителем.

В то же время с позиции общества ЛС представляют особый жизненно важный товар, от правильного применения которого зависит здоровье людей. С этой позиции к вопросу присвоения наименования следует подходить с особой осторожностью и ответственностью. Здесь большое значение имеет понимание высокого риска опасных для здоровья людей медицинских ошибок, связанных с путаницей сходных до степени смешения наименований ЛС. Кроме того, в силу объективной фармакологической и токсикологической характеристики наименование априори не должно представлять ЛС как абсолютно эффективное, полностью безопасное и уникальное по отсутствию нежелательных побочных эффектов.

Таким образом, при решении вопроса о присвоении наименования ЛС пересекаются нередко противоречивые интересы различных субъектов сферы обращения ЛС: производителей, продавцов, потребителей, медицинских и фармацевтических работников.

С учетом этих обстоятельств одним из направлений деятельности государственной системы по надзору и контролю в сфере обращения ЛС является предрегистрационная экспертиза наименований ЛС. Целью этой экспертизы является предупреждение медицинских ошибок, связанных с опасным для здоровья и жизни людей смешением наименований новых и уже существующих на фармацевтическом рынке ЛП, а также недопущения использования наименований, являющихся носителями необъективной и вводящей в заблуждение информации.

При рациональном выборе наименования ЛС целесообразно руководствоваться научно-обоснованными методическими подходами, учитывающими международный

опыт, действующую нормативно-правовую базу, информацию, полученную в ходе мониторинга использования имеющихся наименований, медицинских, правовых, экономических и иных возможных последствий выбора конкретного наименования.

2. Термины и определения

В соответствии с Федеральным законом Российской Федерации от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств» (ФЗ ОЛС) для целей настоящего документа используются следующие основные понятия:

«Лекарственные средства» — вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики (за исключением веществ или их комбинаций, не контактирующих с организмом человека или животного), лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности и полученные из крови, плазмы крови, из органов, тканей организма человека или животного, растений, минералов методами синтеза или с применением биологических технологий. К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты».

«Фармацевтические субстанции» — лекарственные средства в виде действующих веществ биологического, биотехнологического, минерального или химического происхождения, обладающие фармакологической активностью, предназначенные для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяющие их эффективность».

«Лекарственные препараты» — лекарственные средства в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности».

«Иммунобиологические лекарственные препараты» — лекарственные препараты биологического происхождения, предназначенные для иммунологической диагностики, профилактики и лечения заболеваний».

«Лекарственное растительное сырье» — свежие или высушенные растения, либо их части, используемые для производства лекарственных средств организациями — производителями лекарственных средств или изготовления лекарственных препаратов аптечными организациями, ветеринарными аптечными организациями, индивидуальными предпринимателями, имеющими лицензию на фармацевтическую деятельность».

«Лекарственный растительный препарат» — лекарственный препарат, произведенный или изготовленный из одного вида лекарственного растительного сырья или нескольких видов такого сырья и реализуемый в расфасованном виде во вторичной (потребительской) упаковке».

«Международное непатентованное наименование лекарственного средства» — наименование фармацевтической субстанции, рекомендованное Всемирной организацией здравоохранения».

«Торговое наименование лекарственного средства» — наименование лекарственного средства, присвоенное его разработчиком».

Исходя из действующей правовой базы, принципиально важно различать наименования лекарственных средств, находящихся:

- под международной юрисдикцией;
- под национальной юрисдикцией.

Под международной юрисдикцией находятся Международные непатентованные наименования фармацевтических субстанций (МНН) — (International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances — INN), выбор и рекомендация которых являются исключительной компетенцией Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ) (www.who.org).

Под национальной юрисдикцией находятся:

— наименования фармацевтических субстанций лекарственных средств, действующие до момента получения рекомендации ВОЗ на использование соответствующего МНН;

— торговые наименования лекарственных препаратов;

Официальная регистрация лекарственных препаратов под торговыми наименованиями, присвоенными как отечественными, так и зарубежными разработчиками возможна только после прохождения процедуры официальной экспертизы в Федеральном государственном бюджетном учреждении по проведению экспертизы лекарственных средств и получения заключения об их соответствии действующему российскому законодательству и нормативно-правовым актам уполномоченного федерального органа исполнительной власти.

3. Нормативная правовая база

К основным нормативным правовым актам, регулирующим сферу обращения лекарственных средств в части использования наименований лекарственных средств, относятся:

- Федеральные законы Российской Федерации:
 - «Об обращении лекарственных средств» от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ;
 - «О защите прав потребителя» № 2300-1 от 7 февраля 1992 г.;
 - «Гражданский кодекс Российской Федерации» (часть 4) от 18.12.2006 № 230-ФЗ.
- Акты международного права:
 - резолюции Всемирной ассамблеи здравоохранения ВОЗ по МНН;
 - решения Исполнительного комитета ВОЗ по МНН;
 - рекомендации ВОЗ по МНН;
 - Мадридская Конвенция о товарных знаках от 14 сентября 1891 года.

Международное право применяется в отношении МНН. Национальное законодательство регулирует отношения, возникающие в связи с выбором национальных непатентованных наименований (ННН) фармацевтических субстанций и торговых наименований лекарственных препаратов.

4. Международные непатентованные наименования фармацевтических субстанций

ВОЗ в 1950 году была принята резолюция, которая определила необходимость международной координации работы национальных уполномоченных организаций по вопросам экспертизы наименований лекарственных средств, создания соответствующего экспертно-консультативного совета ВОЗ и разработки программы по Международным непатентованным наименованиям лекарственных средств.

В 1953 году был опубликован первый перечень МНН. В настоящее время общее количество рекомендованных МНН превышает 8000 и продолжает ежегодно увеличиваться на 100–120 новых наименований.

4.1. Определение МНН

Международное непатентованное наименование фармацевтической субстанции (МНН) (*International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances*) (INN) — это уникальное наименование фармацевтической субстанции, которое имеет всемирное признание и является общественным достоянием.

С момента создания Программы ВОЗ по МНН ее целью является обеспечение специалистов в области здравоохранения уникальными и универсальными наименованиями, позволяющими идентифицировать лекарственные средства в любой стране мира. Существование международной номенклатуры лекарственных средств в виде МНН важно с точки зрения четкой идентификации производимых под разными наименованиями лекарственных препаратов как важнейшего условия для их правильного назначения, отпуска из аптек и применения пациентами. МНН являются также основой для обеспечения взаимодействия и обмена информацией между специалистами здравоохранения и учеными всего мира.

Другая важная особенность МНН заключается в том, что наименования, относящиеся к веществам одной фармакологической группы, должны демонстрировать взаимосвязь друг с другом на базе «общих основ» (common stems). На основе знания «общих основ» практикующие врачи, фармацевты или любые другие лица, имеющие дело с лекарственными препаратами, могут определить их принадлежность к конкретной группе лекарственных средств, обладающих сходными фармакологическими свойствами.

4.2. Использование МНН

МНН применяются международными и национальными уполномоченными органами, осуществляющими контроль в сфере обращения лекарственных средств, при регистрации/выдаче разрешения на сбыт для той или иной фармацевтической продукции производителями лекарственных препаратов, а также теми организациями, которые используют МНН в своей работе: патентными бюро и ведомствами, поверенными и специалистами по товарным знакам, учеными, преподавателями, работниками здравоохранения.

МНН предназначаются для использования в фармакопях, при маркировке лекарственных препаратов, предоставлении информации о лекарственных средствах, в рекламе и рекламных материалах, при контроле за лекарственными препаратами, в научной литературе и в качестве основы для наименований воспроизведенных лекарственных препаратов. С использованием МНН составляются перечень жизненно-необходимых лекарственных средств ВОЗ и соответствующие перечни многих стран мира. В нашей стране «Перечень жизненно необходимых и важнейших лекарственных средств» утверждается Правительством России.

4.3. Процедура выбора МНН

Выбор МНН осуществляется в соответствии с процедурой отбора рекомендуемых международных непатентованных наименований для фармацевтических субстанций, утвержденной резолюцией Исполнительного комитета ВОЗ EB115.R4 от 19 января 2005 года [3].

Процесс выбора МНН разделен на три основных этапа:

1. Направление заявки в Секретариат ВОЗ.
2. Выбор предложенного МНН (proposed INN).
3. Выбор рекомендованного МНН (recommended INN).

После получения заявки Секретариат ВОЗ по МНН передает материалы в Группу экспертов ВОЗ по МНН для изучения предложенного наименования на соответствие основным правилам, сходства с опубликованными МНН и исключения возможных потенциальных конфликтов с уже существующими наименованиями, включая опубликованные МНН и товарные знаки (торговые марки).

Предложенное МНН публикуется в Информационном бюллетене ВОЗ по лекарственным средствам «WHO Drug Information» [5]. В течение 4-х месяцев после опубликования Секретариат ВОЗ по МНН принимает замечания и/или возражения в связи с предложенными наименованиями.

Ежегодно публикуются два перечня предложенных МНН.

Конечный этап процесса выбора заключается в опубликовании рекомендованных МНН в Информационном бюллетене ВОЗ по лекарственным средствам. Как только наименование будет опубликовано в качестве рекомендованного МНН, оно может использоваться при маркировке лекарственных средств, в научных публикациях, учебных изданиях, справочной или рекламной информации по лекарственным препаратам. С момента опубликования рекомендованное МНН становится общественным достоянием и не подлежит регистрации в качестве товарного знака (торговой марки).

Ежегодно публикуется один перечень рекомендованных МНН. Периодически ВОЗ публикует сводный перечень МНН отдельным изданием [6].

4.4. Общие принципы, используемые при выборе международных непатентованных наименований для фармацевтических субстанций

МНН выбираются только для отдельных, четко определенных веществ, которые могут быть недвусмысленно охарактеризованы химическим наименованием (или формулой). МНН не присваиваются растительным лекарственным средствам или гомеопатическим лекарственным средствам. Также МНН не могут быть присвоены тем веществам, которые имеют долгую историю использования в медицинских целях под хорошо известными наименованиями (например, алкалоиды морфин, кодеин) или под химическими наименованиями (например, уксусная кислота).

Как правило, МНН присваивается только активной части молекулы, чтобы исключить подачу заявлений на новое МНН в случаях использования солей, эфиров и т.п.

При выборе МНН ВОЗ рекомендует руководствоваться следующими принципами:

- МНН должны иметь характерное звучание и написание. Они не должны быть излишне длинными или похожими на общеупотребительные наименования;

- МНН для лекарственных средств, принадлежащих к одной фармакотерапевтической группе, должны по возможности демонстрировать эту принадлежность. Следует избегать таких наименований, которые содержат ссылки на анатомические, физиологические, патологические или терапевтические аспекты;

- при разработке МНН для первого вещества в новой фармакологической группе должны быть предусмотрены возможности присвоения подходящих МНН для других родственных веществ, принадлежащих к этой новой группе;

- при разработке МНН следует по возможности уклоняться от языковых проблем. Поскольку наименования используются по всему миру, необходимо не только избегать некоторых букв, но и неприемлемых для основных языков мира буквенных сочетаний;

- в случае соответствия данным принципам приоритет должны иметь те наименования, которые были предложены лицами, открывшими, разработавшими или впервые выпустившими лекарственное средство, или национальные непатентованные наименования, уже существующие в каких-либо странах.

Групповая принадлежность МНН должна по возможности демонстрироваться путем использования общей основы (**common stem**). Поэтому МНН состоит из случайного вымышленного префикса и общей основы; в наименованиях препаратов, принадлежащих к одной фармакотерапевтической группе, присутствует общая основа.

Ниже приведено несколько примеров основ для фармакологических групп веществ.

Основа, латынь	Основа, английский язык	Фармакотерапевтическая группа	Пример МНН
– acum	– ac	Противовоспалительные средства, производные ибупрофена	Диклофенак
– cain	– cain	Местноанестезирующие средства	Лидокаин
Gli –	Gli –	Гипогликемические средства, производные сульфонида	Глибенкламид
– azepamum	– azepam	Транквилизирующие средства, производные диазепама	Диазепам

Перечень общих основ, используемых при выборе МНН, представлен в документе ВОЗ «Использование общих основ при выборе международных непатентованных наименований (МНН) для фармацевтических продуктов (WHO/EMP/QSM/2009.3)», WHO, Geneva, 2009 [7].

4.5. Защита МНН

Во избежание путаницы, которая может представлять угрозу безопасности пациентов, товарные знаки (торговые марки) не должны составляться на базе МНН [4]. Кроме того, использование общей основы в торговых марках существенно затруднит дальнейший выбор международных непатентованных наименований в группах фармакологических веществ.

С учетом растущего числа МНН и товарных знаков (торговых марок) возможность конфликта между двумя сторонами постоянно увеличивается. Основная причина конфликта обычно заключается в попытке организации-производителя предложить новый товарный знак, содержащий «общую основу», учрежденную ВОЗ для МНН. Если такое наименование окажется под защитой в качестве товарного знака, это ограничит свободу ВОЗ по дальнейшему выбору МНН для этой группы фармакологических веществ.

Для исключения таких ситуаций в мае 1993 года на сорок шестом заседании Всемирной ассамблеи здравоохранения была принята резолюция WHA46/19 по международным непатентованным наименованиям для фармацевтических субстанций, в которой государствам — членам ВОЗ предложено:

- «ввести в действие правила и нормы, гарантирующие использование международных непатентованных наименований (или эквивалентных национальных наименований воспроизведенных лекарственных средств) на видном месте в целях маркировки и рекламы фармацевтической продукции;
- поощрять производителей при продвижении и сбыте продукции, поступающей из нескольких источников после окончания действия патента; пользоваться наименованиями фирм и международными непатентованными наименованиями, а не торговыми марками;
- разрабатывать указания по использованию и защите международных непатентованных наименований и препятствовать использованию наименований на базе МНН и особенно включению установленных основ МНН в торговые марки».

Полный текст резолюции приведен в Приложении 3.

В соответствии с резолюцией WHA46.19 допустима регистрация торговых наименований, содержащих МНН совместно с наименованием фирмы.

Необходимость соблюдения государствами — членами ВОЗ требований резолюции WHA46/19 была подтверждена Резолюцией 115-й сессии Исполнительного комитета ВОЗ EB115.R4 от 19 января 2005 года. В принятой в соответствии с этой Резолюцией «Процедуре отбора рекомендуемых международных непатентованных наименований для фармацевтических субстанций» [3] в статье 8 указано:

«Препровождая информацию о рекомендованном государствам-членам международном непатентованном наименовании в соответствии со статьей 7, Секретариат:

- (а) просит признать его в качестве непатентованного наименования данного вещества;
- (б) просит государства-члены предпринять шаги, необходимые для предотвращения приобретения авторских прав на данное наименование, и запретить регистрацию данного наименования в качестве товарного знака или торгового наименования».

5. Основные принципы рационального выбора наименований лекарственных средств

5.1. Основные принципы выбора наименований фармацевтических субстанций

Наименование фармацевтической субстанции — это словесное обозначение в виде определенного сочетания букв (знаков) или отдельных слов, идентифицирующее фармацевтическую субстанцию.

Для выбора наименования фармацевтической субстанции могут быть использованы:

– Международное непатентованное наименование фармацевтической субстанции (МНН) в соответствии с рекомендациями ВОЗ. Рекомендованные МНН публикуются ВОЗ в журнале «WHO Drug Information» [5] и специальном международном справочнике ВОЗ «International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substance. Cumulative List» [6]. В ряде случаев МНН не совпадает с химическим наименованием субстанции. В этих случаях допустимо использовать в качестве наименований фармацевтических субстанций соответствующие модифицированные МНН.

– Национальное непатентованное наименование фармацевтической субстанции (ННН), действующее до утверждения соответствующего МНН или взамен его. В странах, уровень научно-технического развития которых позволяет проводить поиск, изучение и внедрение в медицинскую практику новых лекарственных средств, существуют национальные системы экспертного отбора и введения в действие непатентованных наименований для новых лекарственных средств с возможностью их последующего представления в ВОЗ для присвоения статуса МНН.

– Химическое наименование в соответствии с требованиями Международного союза по чистой и прикладной химии (IUPAC) [8].

Выбор химического наименования применим только для лекарственных средств, представляющих химические вещества, имеющие идентифицированную структуру молекулы. Эти наименования хорошо применимы для лекарственных веществ, имеющих относительно простое строение. Однако в качестве наименований лекарственных средств, имеющих более сложное строение, химические наименования являются малоприменимыми в связи с их чрезмерной грамматической и лексической сложностью.

5.2. Основные принципы выбора наименований лекарственных препаратов

Наименование лекарственного препарата — это словесное обозначение в виде определенного сочетания букв (знаков) или отдельных слов, под которым определенная организация-разработчик и (или) организация-производитель проводит регистрацию, предлагает к реализации и реализует на фармацевтическом рынке произведенный им лекарственный препарат, обладающий определенным качественным и количественным составом и фармакологическим действием.

Для выбора наименования лекарственного препарата могут быть использованы:

– Международное непатентованное наименование (МНН) в точности так, как опубликовано ВОЗ, без сокращений. Для идентификации товара на рынке организация-производитель (организация-разработчик) вправе дополнять используемое в качестве наименования лекарственного препарата МНН своим полным или сокращенным (аббревиатура) фирменным наименованием.

– Национальное непатентованное наименование (ННН).

– Торговое наименование.

В свою очередь, торговые наименования делятся на 2 группы:

– Наименования, утвержденные при регистрации лекарственных препаратов в соответствии с требованиями Федерального закона «Об обращении лекарственных средств» от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ.

– Наименования, дополнительно зарегистрированные в качестве товарных знаков в соответствии с требованиями Гражданского кодекса Российской Федерации (часть 4) от 18.12.2006 г. № 230-ФЗ (синонимы — Товарный знак, Патентованное наименование — Trade mark, Brand name, Proprietary name). Наименования этой группы представляют собой особую форму интеллектуальной (промышленной) собственности, принадлежащей государству, юридическому или физическому лицу (лицам), имеющим исключительное право на их использование, охраняемое международным законодательством [9] и законодательством Российской Федерации в сфере защиты интеллектуальной собственности [10].

5.2.1. Основы рационального выбора торгового наименования лекарственного препарата

Торговое наименование лекарственного препарата является частью медицинской терминологии и по своей сути призвано помогать специалистам (медицинским и фармацевтическим работникам) и потребителям однозначно идентифицировать различные по составу и действию препараты.

Торговые наименования лекарственных препаратов должны быть по возможности краткими (состоящими из одного слова), легко произносимыми, благозвучными, привычно звучащими для русского языка. В качестве дополнения возможно использование уточнений/сокращений при помощи букв или цифр (арабские или римские).

Торговые наименования лекарственных препаратов с различными действующими веществами (фармацевтическими субстанциями) должны отличаться по написанию и звучанию.

Не допускается использование при регистрации лекарственных препаратов торговых наименований, являющихся ложными или способными ввести в заблуждение потребителя относительно товара или его изготовителя, а также противоречащих общественным интересам, принципам гуманности и морали.

Не следует использовать в качестве торговых наименований вновь регистрируемых лекарственных препаратов обозначения, идентичные или признанные графически и (или) фонетически сходными с наименованиями ранее зарегистрированных лекарственных препаратов, различающихся по составу и действию.

Проверка предлагаемых торговых наименований на графическое и фонетическое сходство проводится в соответствии с рекомендациями (приложение 1).

В торговых наименованиях лекарственных препаратов не следует использовать составные части или структурные элементы МНН, особенно общие основы (common stem) [7].

Не следует использовать МНН или графически и (или) фонетически сходные с ними торговые наименования для лекарственного препарата другого химического состава или действия, а также включать в наименование лекарственного препарата слова или части слов, характерные для наименований препаратов других химических и (или) фармакологических групп.

Не допускается государственная регистрация:

- различных лекарственных препаратов под одинаковым торговым наименованием;
- одного лекарственного препарата, выпускаемого производителем под различными торговыми наименованиями и представленного на государственную регистрацию в виде двух и более лекарственных препаратов (ст. 13 п. 6 «Государственная регистрация лекарственных препаратов» ФЗ «Об обращении лекарственных средств»).

Лекарственные препараты, выпускаемые в различных лекарственных формах, рекомендуется называть по входящему в их состав лекарственному средству (фармацевтической субстанции). Разные торговые наименования для отличающихся лекарственных форм одного и того же лекарственного средства допускаются только как исключение, например, при значительном изменении действия лекарственного препарата под влиянием лекарственной формы и, соответственно, изменения показаний к применению.

Лекарственная форма препарата не выносится в наименование лекарственного препарата. Исключение составляют иммунобиологические лекарственные препараты (смотри раздел 5.3), лекарственное растительное сырье и лекарственные растительные препараты (смотри раздел 5.4) и не имеющие аналогов инновационные технические устройства.

Не следует использовать одинаковые торговые наименования для комбинированных лекарственных препаратов, отличающихся составом или соотношением дозировок входящих в них фармацевтических субстанций.

Для лекарственного препарата, содержащего вещество, которое является предшественником (пролекарство) лекарственного средства, следует использовать наименование, которое отличалось бы от наименования конечного активного действующего вещества.

Не рекомендуется использование торговых наименований, способных ввести в заблуждение потребителя относительно истинного состава и действия лекарственного препарата. К этой категории относятся обозначения, порождающие в сознании потребителя представление об определенной качественной характеристике (составе и (или) фармакологических свойствах) лекарственного препарата, которое не соответствует действительности.

Торговое наименование лекарственного препарата не должно представлять его, как уникальное, наиболее эффективное, наиболее безопасное, исключительное по отсутствию побочных эффектов.

Не рекомендуется полностью воспроизводить в торговых наименованиях лекарственного препарата наименования болезней и симптомов заболеваний, анатомические и физиологические термины, имена собственные, географические наименования, общепринятые символы и слова из бытовой лексики. Не допускается использовать в наименованиях слова, графически и (или) фонетически сходные с нецензурными выражениями.

Не следует использовать в качестве торговых наименований обозначения, тождественные или имеющие графическое и (или) фонетическое сходство с официальными наименованиями особо ценных объектов культурного наследия народов Российской Федерации либо объектов всемирного культурного или природного наследия.

При рассмотрении торгового наименования вопрос о каких-либо нарушениях прав интеллектуальной собственности не принимается во внимание, так как за процедуру рассмотрения вопросов, касающихся товарных знаков, отвечают другие учреждения — как на национальном (Федеральная служба по интеллектуальной собственности, патентам и товарным знакам — Роспатент) так и на международном уровнях (World Intellectual Property Organization — WIPO).

5.2.2. Методические подходы к формированию торговых наименований лекарственных препаратов

Знание принципов формирования и способов словообразования, традиционно применяемых в номенклатуре лекарственных средств, позволяет целенаправленно формировать наименования лекарственных препаратов, играющих роль носителей определенной медицинской и фармацевтической информации [11]. Для формирования торговых наименований лекарственных препаратов целесообразно использовать лингвистическую словообразовательную модель, представленную ниже.

Лингвистическая модель наименования лекарственного средства

Элемент модели
1. Основосложение (словосложение) с использованием взаимосвязанных основ (объект-действие) с использованием не связанных друг с другом основ с использованием соединительных гласных без использования соединительных гласных
2. Суффиксация с использованием суффиксов -in-, -ol-, -al-, -id- и др. с использованием префиксов ex- и des- в качестве суффиксов с использованием финальных элементов
3. Префиксация
4. Сокращение слова с сохранением начальной части исходного слова с сохранением конечной части слова с сохранением средней части слова с сохранением букв и слогов, произвольно выбранных из слова
5. Создание сложносокращенных слов

Элемент модели
6. Наложение частей слов
7. Перестановка компонентов слова перестановка смежных букв или буквосочетаний перестановка смежных слогов перестановка произвольно выбранных частей наименования полная перестановка букв, начиная от конца слова или его части
8. Инициальная аббревиация (наименования-аббревиатуры)
9. Заимствование слов заимствование существующего (готового) слова субстантивация прилагательных (преобразование слова-прилагательного в слово-существительное)

Эффективность использования конкретных элементов данной модели будет продемонстрирована ниже на примере лингвистического анализа ряда хорошо известных торговых наименований лекарственных препаратов.

5.2.2.1. Основосложение или словосложение

Основосложение или словосложение – соединение двух или более основ. В номенклатуре лекарственных средств оно чаще всего сопровождается добавлением какого-либо суффикса.

При сложении основ по модели «объект – действие» создаются наименования, наиболее легкие для выявления информации:

Haematogenum – Гематоген, стимулятор кроветворения, греч. *haema, atos* – кровь, *genos* – род, рождение;

Urografin – Урографин, рентгеноконтрастное средство для диагностики заболеваний мочевой системы, греч. *uron* – моча, *grapho* – писать + *-in*;

Cholevid – Холевид, рентгеноконтрастное средство для исследования желчного пузыря и желчных протоков, греч. *chole* – желчь, лат. *video* – видеть.

В торговой номенклатуре лекарственных средств соблюдение порядка компонентов не обязательно, часто используются перестановки:

Cardiovalenum – Кардиовален, кардиотоническое средство, греч. *cardia*- сердце, лат. *valeo* – быть сильным, здоровым + *-en*;

Valocordin – Валокордин, седативное средство, лат. *valeo* – быть здоровым, *cor, cordis* – сердце.

5.2.2.2. Суффиксация

Суффиксация – присоединение к основе суффикса, имеющего определенное значение или просто завершающего наименование лекарственных средств.

Суффикс *-in-*, происходящий от суффикса латинских прилагательных со значением отношения к предмету, явлению – один из самых распространенных в номенклатуре лекарственных средств. Значения производящих основ разнообразны: источник получения лекарственных средств, заболевание, результат действия лекарственных средств и др.

Atropinum – Атропин, алкалоид растения красавка *Atropa belladonna*.

Суффикс *-ol-* имеет двойное происхождение:

а) от конечной части слова *alcohol*; применяется в наименованиях спиртов, фенолов и спиртосодержащих лекарственных средств:

Batilol – Батилол, батилловый спирт, радиопротектор;

Iodinolum – Йодиол, антисептическое средство, содержащее йод и поливиниловый спирт;

б) от слова *oleum* – масло; применяется в наименованиях ЛС, содержащих масло или имеющих консистенцию масла.

Aecolum – Аекол, комбинированное лекарственное средство, содержащее витамины А, Е и другие, а также растительное масло.

Суффикс *-al-*, происходящий от начальной части слова *alcohol*, впервые был применен в наименовании вещества *Chloralum hydratum* (Хлоралгидрат), обладающего снотворным действием, и употреблялся первоначально в наименованиях снотворных средств:

Veronal – Веронал, снотворное средство, производное барбитуровой кислоты, *Verona* – Верона, город в Италии + *-al*.

В настоящее время встречается в наименованиях средств для наркоза и снотворных средств: *Hexobarbitalum*, *Phenobarbital*, *Hexenahum*, *Methohexital*, *Thiopental Sodium*, *Amobarbital*.

В номенклатуре лекарственных средств употребляются также искусственно образованные суффиксы. Так, стали применяться в конце слов и уподобились суффиксам префиксы *ex-* из и *des-* от для указания на устранение какого-либо объекта, явления, часто без связи со значением основы слова:

Convulex – Конвулекс, противосудорожное средство, лат. *convulsio* – судорога + *-ex*;

Enterodesum – Энтеродез, дезинтоксикационное средство, греч. *enteron* – кишечник + *-des*.

Некоторые корневые элементы вследствие регулярного употребления в конце слов, приближающиеся по функции к суффиксам, могут быть названы суффиксоидами.

Так, усеченный корень *-cid-*, происходящий от лат. *occido* – убивать, в 30–40-х годах XX века применялся для создания наименований лекарственных средств, уничтожающих микроорганизмы, т.е. наименования строились как сложные слова, образованные по модели «объект – действие»:

Streptocidum – Стрептоцид, средство, убивающее стрептококки;

Plasmocidum – Плазмоцид, средство для уничтожения малярийных плазмодиев.

С 50-х годов XX века *-cid-* применяется в наименованиях противомикробных и противопаразитарных средств, при этом первая часть слова может и не обозначать объект действия препарата:

Chinocidum – Хиноцид, противомаларийное средство, относящееся к химической группе хинолинов.

Кроме того, в торговых наименованиях лекарственных средств в роли суффиксов без специального значения используются финальные элементы: *-ax*, *-ox*, *-ix*.

Vermox – Вермокс, противоглистное средство, лат. *vermis* – глист + *-ox*;

Cardix – Кардикс, антиангинальное средство, греч. *cardia* – сердце + *-ix*.

5.2.2.3. Префиксация

Префиксация – способ словообразования, в чистом виде встречающийся в номенклатуре редко. Чаще встречаются наименования лекарственных средств, образованные префиксально-суффиксальным способом, нередко от сокращенной основы.

Префиксация в номенклатуре лекарственных средств выполняет следующие задачи:

- подчеркивает информацию, содержащуюся в корне слова;
- дополняет информацию, содержащуюся в корне;
- указывает на высокое качество лекарственных средств.

Таким образом, наличие префикса в наименовании лекарственных средств это, как правило, признак отношения наименования к коммерческой номенклатуре лекарственных средств.

Наиболее распространены префиксы, которые в сочетании с корнями, обозначающими заболевание или причину заболевания, указывают на действие лекарственных средств, направленное на их устранение: *anti-*, *contra-* – против, *a-* – не, отрицание, *de(s)* – от, *e-*, *ex-*, *exo* – из:

Antistruminum – Антиструмин, средство для профилактики эндемического зоба, *anti-* + лат. *struma* – зоб + *-in*;

Contractubex – Контрактубекс, средство для устранения келоидных рубцов, *contra-* + лат. *tuber* – бугор, нарост + *-ex*;

Abaktal – Абактал, антибактериальное средство, *a-* + *bacterium* + *-al*.

Префикс *pro-* используется в значениях: для, вместо:

Proderm – Продерм, антисептическое средство, *pro-* для + греч. *derma* – кожа;

Procaine – Прокаин, первое синтетическое местноанестезирующее средство, *pro-* вместо + (*co*)*cainum*.

Префиксы *super-*, *supra-* сверх, *ultra-* более, сверх, *eu-* хорошо подчеркивают эффективность препаратов:

Supradyn – Супрадин, мультивитаминный комплекс с микроэлементами, *supra-* + греч. *dynamis* – сила.

5.2.2.4. Сокращение слова

Сокращение слова – способ, используемый очень часто в торговой номенклатуре лекарственных средств:

АСС – АЦЦ, от Ацетилсалициловая кислота,

РАСК – ПАСК, от пара-Аминосалициловая кислота.

5.2.2.5. Создание сложносокращенных слов

Создание сложносокращенных слов – способ словообразования, применяемый наиболее часто в номенклатуре лекарственных средств, в том числе в наименованиях комбинированных препаратов, при этом способы сокращения исходных слов также разнообразны:

Theodibaverinum – Теодибаверин, комбинированный препарат, содержащий теобромин, дибазол, папаверин;

Humulin – Хумулин, антидиабетическое средство, лат. *humanus* – человеческий, *Insulin* – инсулин.

5.2.2.6. Наложение частей слов

Наложение частей слов – способ, применяемый как дополнительный при создании сложных или сложносокращенных слов с целью уменьшения общей длины слова.

Наиболее часто наложение одной буквы, общей для соединяемых частей исходных слов:

Vulnusan – Вулнусан, противовоспалительное ранозаживляющее средство, лат. *vulnus* – рана + *sano* – лечить.

Реже встречаются случаи наложения двух-трех букв:

Progesteronum – Прогестерон, гормональное средство, *pro* – для, *gestatio* – беременность, вынашивание, *steroidum* – стероид + *-on*;

Pectusinum – Пектусин, отхаркивающее средство, лат. *pectus* – грудь + *tussin* – кашель + *-in*.

5.2.2.7. Перестановка компонентов слова

Перестановка компонентов слова – способ, достаточно широко применяемый при образовании торговых наименований лекарственных средств. Слово, образованное перестановкой букв другого слова, называется анаграммой:

Adebit – Адебит, противодиабетическое средство. Наименование получено перестановкой букв термина *diabet(es)*.

В чистом виде этот способ встречается не часто, обычно перестановка сопровождается другими способами словообразования.

Iodovidonum – Йодовидон, антисептическое средство.

Сравните: *Povidone-Iodine* – Повидон-Йод, наименование, принятое в Фармакопее США.

5.2.2.8. Инициальная аббревиация

Инициальная аббревиация, т.е. сокращение слов с сохранением только их начальных букв – способ, используемый в торговой номенклатуре лекарственных средств своеобразно. Поскольку исходными для наименований лекарственных средств служат почти всегда сложные или сложносокращенные слова и словосочетания, то аббревиатура образуется обычно из начальных букв компонентов этих слов:

5-NOK – 5-НОК, противомикробное средство от МНН *Nitroxolin* – Нитроксолин.

Некоторые наименования лекарственных средств, образованные инициальной аббревиацией, уподобляются обычным словам, для чего прописная (большая) буква употребляется только в начале аббревиатуры:

Apo-Asa – Апо-Аса, противовоспалительное средство, *Apo* – от наименования фирмы *Apotex Inc.*, *Asa* – от МНН *Acetylsalicylic Acid*;

Fibs – Фибс, отгон лиманной грязи, *Fi* – от имени академика Филатова, *b* – биогенный, *s* – стимулятор.

5.2.2.9. Заимствование слов

Заимствование слов – это способ создания наименований лекарственных средств, представляющий собой использование для обозначения лекарственных средств слов, взятых в готовом виде из естественных языков или из медицинской терминологии:

Duplex – Дуплекс, общеукрепляющее средство, содержащее два компонента – нитрат стрихнина и арсенат калия лат. *duplex* – двойной;

Gasterin, *Venter* – Гастерин, Вентер, средства, применяемые при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки греч. *gaster* – желудок, лат. *venter* – живот;

Adonis – Адонис, экстракт из травы горичвета весеннего – *Adonis vernalis*;

Memoria – Мемория, препарат для лечения заболеваний нервной системы и улучшения памяти, лат. *memoria* – память.

Таким образом, для создания наименований лекарственных средств применяется значительное количество способов словообразования и дополнительных приемов как самостоятельно, так и в различных комбинациях. Разнообразие способов и словообразовательных средств позволяет создавать в достаточной степени отличающиеся друг от друга наименования для препаратов-аналогов.

Знание и использование разнообразных способов словообразования, применяемых при создании торговых наименований лекарственных препаратов, может служить основой для включения в них необходимой медицинской и фармацевтической информации.

При всем многообразии вышеописанных способов словообразования, применяемых при создании торговых наименований лекарственных препаратов, при их формировании необходимо учитывать некоторые общие принципы: возможная краткость, благозвучность, отсутствие отрицательных ассоциаций, оригинальность написания и звучания.

5.3. Особенности формирования наименований иммунобиологических лекарственных препаратов

К иммунобиологическим лекарственным препаратам относятся вакцины, анатоксины, сыворотки лечебно-профилактические, иммуноглобулины и другие препараты из сыворотки и плазмы крови человека и животных, моноклональные антитела, препараты из нормофлоры, бактериофаги, аллергены, цитокины и другие иммуномодуляторы микробного происхождения.

В большинстве случаев торговое наименование иммунобиологических лекарственных препаратов представляет собой сочетание нескольких слов.

1. Наименование препарата должно начинаться с группового наименования («Вакцина...», «Сыворотка...», «Бактериофаг...» и т.п.).

2. Последовательность расположения слов-определений в сложных наименованиях основных групп препаратов (структура наименований):

2.1. Вакцины:

– Групповое наименование — «Вакцина»: против какого вида возбудителя инфекции, в форме прилагательного — «туляремийная», «гриппозная» или наименования заболевания — «Вакцина клещевого энцефалита»;

– Технология получения: «рекомбинантная», «культуральная», «аллантоисная», «химическая», «векторная» и пр. (при необходимости);

– Метод получения: «очищенная», «концентрированная», «адсорбированная»;

– Биологическое состояние: «живая», «инактивированная», «субцеллюлярная»;

– Физическое состояние: «жидкая», «сухая»;

– Способ применения (при необходимости): «для перорального применения», «для накожного применения» и т.п.

2.2. Иммуноглобулины (сыворотки) лечебно-профилактические

– Групповое наименование — «Иммуноглобулин», «Сыворотка»;

– Против какой инфекции или против какого объекта в форме прилагательного с частицей против- или анти- — «противостолбнячная», «антилимфоцитарная» и др. Если вместо прилагательного указано наименование заболевания, микроорганизма или токсина, то перед таким наименованием ставят слово «против» — «Иммуноглобулин против клещевого энцефалита», «Сыворотка против яда кобры»;

– Видовая принадлежность — «лошадиная», «волосья» (для сывороток), «человека» (для иммуноглобулинов), или исходное сырье — «плацентарный», «донорский», «из сыворотки крови лошади» (для иммуноглобулинов);

– Метод получения — «очищенная», «концентрированная»;

– Физическое состояние — «жидкая», «сухая»;

– Способ применения (при необходимости).

2.3. Структуру наименований других групп иммунобиологических лекарственных препаратов следует строить с учетом вышеперечисленных рекомендаций.

В отдельных случаях в традиционное наименование иммунобиологических лекарственных препаратов может быть дополнительно включено оригинальное наименование (в виде одного слова), способы словообразования которого позволяют ему играть роль носителя определенной медицинской информации.

В качестве примера таких наименований можно привести:

Rabivac — Рабивак, вакцина антирабическая, лат. *rabies* — бешенство, *vaccine* — вакцина;

Tuberculin — Туберкулин, аллерген туберкулезный, лат. *tuberculosis* — туберкулез и *in*;

Mencevax — Менцевакс, менингококковая вакцина, лат. *meningococcus* — менингококк, *vaccine* — вакцина;

Antihep — Антигеп, иммуноглобулин против гепатита В, лат. *anti* — против, *hepatitis* — гепатит.

5.4. Особенности формирования наименований лекарственных растительных препаратов

Наименование лекарственных растительных препаратов, произведенных или изготовленных из одного вида лекарственного растительного сырья, реализуемых в расфасованном виде во вторичных (потребительских) упаковках и предназначенных для приготовления водных извлечений, формируется из родового наименования производящего растения в родительном падеже и наименования используемой морфологической группы во множественном числе именительного падежа (исключения составляют «кора» и «трава» — в единственном числе).

Наименование данной группы лекарственных растительных препаратов указывается по основному синониму на русском и латинском языках.

Например: 1. Красавки листья — *Belladonnae folia*;

2. Калины кора — *Viburni cortex*;

3. Чабреца трава — *Serpylli herba*.

В тех случаях, когда используется лекарственное растительное сырье от определенного вида лекарственного растения, то указывается и его видовое название.

- Например: 1. Горичвета весеннего трава — *Adonidis vernalis herba*;
2. Аралии маньчжурской корни — *Araliae mandshuricae radices*.

Для указанной группы лекарственных растительных препаратов в наименовании лекарственной формы приводится информация об измельченности.

- Например: Мята перечной листья — *Menthae piperitae folia*,
листья цельные или листья измельченные,
или листья — порошок.

Для сборов, состоящих из нескольких видов лекарственного растительного сырья, приводится торговое наименование, лекарственная форма (сбор) с указанием информации об измельченности.

Например: Арфазетин сбор — сбор цельный или сбор измельченный, или сбор-порошок.

С появлением новых торговых наименований сборов, которые производители присваивают традиционным сборам, целесообразно сохранять на переходный период старое наименование одновременно с новым.

- Например: 1. Фитонэфрол (урологический) сбор — сбор измельченный;
2. Фитосон (успокоительный № 3) сбор — сбор-порошок.

Наименования лекарственных растительных препаратов, изготовленных (произведенных) из лекарственного растительного сырья и не предназначенных для приготовления водных извлечений, рекомендуется формировать из родового наименования производящего растения (источника сырья) в родительном падеже и наименования лекарственной формы.

- Например: Шиповника сироп;
Боярышника настойка;
Валерианы экстракт густой;
Родиолы экстракт жидкий.

При наличии в нормативной документации на исходное лекарственное растительное сырье указания на видовую принадлежность производящего растения следует сохранять его в наименовании фармацевтических субстанций и лекарственных растительных препаратов.

Например: Бессмертника песчаного экстракт жидкий.

В тех случаях, если от одного производящего растения разрешены к заготовке и используются несколько видов лекарственного растительного сырья, следует указывать в наименовании морфологическую группу сырья.

- Например: 1. Лимонника плодов настойка;
2. Лимонника семян настойка.

Для лекарственных растительных препаратов и фармацевтических субстанций растительного происхождения допускается использование торговых наименований, не включающих указание на источник получения.

- Например: Мукалтин, экстракт сухой;
Панавир, суппозитории ректальные;
Хлорофиллипт, таблетки для рассасывания, 25 мг.

Приложение 1

Методика проверки наименований на графическое и фонетическое сходство

Наименование считается сходным с другим наименованием, если оно ассоциируется с ним в целом, несмотря на их отдельные отличия.

Сходство наименований может быть звуковым (фонетическим), графическим (визуальным).

Звуковое сходство определяется на основании следующих признаков:

- наличие близких и совпадающих звуков в сравниваемых обозначениях;
- близость звуков, составляющих обозначения;
- расположение близких звуков и звукосочетаний по отношению одних к другим;
- наличие совпадающих слогов и их расположение;
- число слогов в обозначениях;
- место совпадающих звукосочетаний в составе обозначений;
- близость состава гласных;
- близость состава согласных;
- характер совпадающих частей обозначений;
- вхождение одного обозначения в другое;
- ударение.

Признаки, на основании которых определяется звуковое сходство словесных обозначений (перечисляются ниже), могут учитываться как каждый в отдельности, так и в различных сочетаниях.

Наиболее распространенные случаи звукового сходства:

- тождество звучания начальных частей обозначений и сходство звучания конечных частей: флоксан — флоксал; глиотен — глиофен; имирил — имидил; тимопил — тимонил;
- сходство звучания начальных частей обозначений и тождество звучания конечных частей: абуфен — ибуфен; мигран — имигран;
- тождество звучания начальных и конечных частей обозначений и сходство звучания средних частей: пиновит — пиковит; эклин — экалин.
- тождество звучания средних частей обозначения и сходство звучания начальных и конечных частей: окоден — акодин

Общее правило состоит в том, что при подсчете букв (знаков), составляющих слова, различия между сравниваемыми наименованиями должны составлять 3 и более букв (знаков) в любом сочетании.

Приложение 2

Резолюция 46 Всемирной ассамблеи здравоохранения «WHA46.19 Непатентованные наименования для фармацевтических веществ»

Сорок шестая Всемирная Ассамблея Здравоохранения:

Вновь привлекла внимание к резолюции WHA31.32, касающейся использования непатентованных наименований при разработке национальных справочников по лекарственным средствам;

Отметила фундаментальный вклад программы ВОЗ по международным непатентованным наименованиям в эффективное взаимодействие в области медицины и решение проблем, связанных с номенклатурой применительно к новым веществам, вводимым в клиническую практику;

С удовлетворением отметила возрастающую долю продуктов-дженериков на национальных рынках лекарственных средств как в развивающихся, так и в развитых странах;

Отметила тенденцию выпуска на рынок продуктов, равноценных и способных заменить уже существующие на рынке препараты с тем же активным ингредиентом, которые известны под торговыми наименованиями или марками, использующими основы или другие идентификаторы из номенклатуры международных непатентованных наименований;

Признала, что использование таких препаратов в качестве однокомпонентных лекарств, отпускаемых по рецепту, может создать угрозу безопасности пациентов за счет возникновения путаницы при распределении лекарств и возвести препятствия на пути развития номенклатуры международных непатентованных наименований;

Проявила беспокойство в связи с тем, что на последнем совещании Международной конференции организаций по контролю за лекарственными средствами широко использовались фармацевтические торговые марки, которые были очень похожи на международные непатентованные наименования или базирующихся на МНН;

Обратила внимание на пятый отчет Экспертного Комитета ВОЗ по использованию важнейших лекарственных средств, в котором содержался призыв настойчиво препятствовать использованию торговых марок, базирующихся на международных непатентованных наименованиях.

1. Выдвинула требования к странам-участницам:

(1) соблюдать правила и нормы для обеспечения правильного отображения международных непатентованных наименований (или эквивалентных национальных, одобренных наименований дженериков); используемых при маркировке и рекламе фармацевтической продукции;

(2) поощрять производителей обращаться к их фирменным наименованиям и международным непатентованным наименованиям, а не к торговым маркам при продвижении и сбыте продуктов, полученных из нескольких источников, после истечения срока действия патента;

(3) разрабатывать стратегические указания по использованию и защите международных непатентованных наименований и препятствовать использованию наименований, происходящих из МНН, в особенности включению основ МНН в торговые марки.

2. Высказала пожелание Генеральному директору усилить консультативную работу с правительствами и представителями фармацевтической промышленности по решению проблем, связанных с номенклатурой лекарственных препаратов, которые могут приводить к путанице и ставить под угрозу безопасность пациентов.

Двенадцатое пленарное заседание, 12 мая 1993 г.

Литература

1. Федеральный закон от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
2. Государственный реестр лекарственных средств, М.: Росздравнадзор, 2009. — Т. I, ч. 1. — 648 с., ч. 2. — 624 с.
3. International Nonproprietary Names: revised procedure. Procedure for the selection of recommended international nonproprietary names for pharmaceutical substances. EB115.R4, WHO, Geneva, 2005.
4. «Guideline on the acceptability of invented names for human medicinal products processed through the centralised procedure» (CPMP/328/98/Rev.5), EMEA, London, 2007.
5. «WHO Drug Information» (Информация ВОЗ по лекарственным средствам — ежеквартальный журнал), ВОЗ, Женева.
6. «International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substance. Cumulative List», № 12, 2007, WHO, Geneva.
7. The use of stems in the selection of International Nonproprietary Names (INN) for pharmaceutical substances (WHO/EMP/QSM/2009.3), WHO, Geneva, 2009.
8. Номенклатурные правила ИЮПАК по химии. М.: ВИНТИ, 1979. — Т. 1. — 660 с., Т. 2. — 896 с.
9. Мадридское соглашение о международной регистрации знаков от 14.09.1891 г.
10. Гражданский кодекс Российской Федерации, часть 4 от 18.12.2006. № 230-ФЗ.
11. Дремова Н.Б., Березникова Р.Е. Номенклатура лекарственных средств: особенности формирования и фармацевтическая информация. — Курск, 2002. — 151 с.

ГЛАВА 61

МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ ПО СТАТИСТИЧЕСКОЙ ОБРАБОТКЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

*Составители: акад. РАМН, проф. В.И. Сергиенко В.И., д. б. н. И.Б. Бондарева;
д. м. н., проф. Е.И. Маевский*

Введение

При проведении доклинических исследований лекарственного препарата анализируются различные аспекты его фармакологической активности, эффективности и безопасности в сравнении с аналогичными показателями уже применяемых лекарственных средств. Понимание основ математической статистики позволяет грамотно спланировать исследование, проанализировать получаемые данные и интерпретировать наблюдаемые результаты. Основные особенности статистической обработки данных доклинических исследований связаны с небольшими объемами анализируемых выборок, оптимальный объем выборки должен оцениваться и обосновываться на стадии планирования каждого исследования. Статистический анализ данных, получаемых в ходе доклинических исследований, необходим, поскольку известно, что в одной и той же дозе изучаемое вещество вызывает у различных особей эффект неодинаковой интенсивности и направленности, и эта межиндивидуальная реакция может варьировать в достаточно широких пределах. В силу этого параметры, количественно оценивающие фармакологический эффект, являются случайными величинами, и их выборочные оценки должны быть описаны соответствующими статистическими характеристиками. На языке математики отдельные числовые значения варьирующего параметра в выборке принято называть вариантами. Хотим предупредить, что, с точки зрения математики и статистики, не существует принципиального различия между эффектами, которые в медицине принято относить к прямому или побочному действию. В дальнейшем, говоря об эффекте, мы будем подразумевать изучаемое в данном исследовании проявление фармакологической активности.

На этапе планирования доклинического исследования в соответствии со сформулированной целью выбирается его дизайн и оценивается необходимое число животных для получения статистически значимых выводов. Типы дизайнов аналогичны применяемым в клинических исследованиях: параллельные группы, перекрестный дизайн, факториальные планы, повторяющиеся измерения, последовательный дизайн. Все эти варианты подробно описаны в учебниках, в том числе в [18]. Также в доклинических исследованиях применяются различные методы рандомизации, позволяющие распределять испытуемых случайным образом, контролировать известные и неизвестные источники вариабельности данных и предотвращать появление систематической ошибки в получаемых результатах и выводах. Подобно клиническим исследованиям, доклинические исследования могут быть подтверждающими (confirmatory) и исследующими (exploratory), возможен также вариант пилотных исследований для сбора предварительной информации о статистических характеристиках изучаемых показателей. Подтверждающие исследования обычно проводятся для проверки одной или нескольких предварительно сформулированных гипотез, а исследующие — в большей степени дают возможность ознакомиться

с получаемыми результатами, чем формально тестируют гипотезы. Это деление условное, поскольку в некоторых исследованиях могут объединяться обе задачи. Для подтверждающих исследований в соответствии с целями и гипотезами выбираются показатели для анализа результатов (outcomes), еще больше таких переменных оценивается в исследовательских работах. Эти показатели могут быть количественными и качественными. Дизайн исследования, его цель и тип выбранных показателей определяют выбор процедур и методов статистического анализа данных.

Описанию статистических методов посвящено большое количество работ, ту или иную формулу для расчета статистических характеристик можно найти в справочниках [3, 4, 6–17, 19–21]. Нашей целью является не простое перечисление методов и схем расчетов из области математической статистики, которые принято использовать в медико-биологических приложениях, а анализ применимости этих подходов к статистической обработке результатов доклинических исследований. К сожалению, объем этой работы не позволяет одинаково подробно осветить все темы и разобрать все возникающие в доклинических исследованиях статистические задачи, поэтому мы приведем ссылки на работы, в которых нужные методы, процедуры и примеры их использования рассмотрены более детально. Кроме того, основные подходы и статистические методы, обычно применяемые в медико-биологических и клинических исследованиях, подробно рассмотрены в [18].

1. Нормальное распределение показателей

Значительный материал, накопленный экспериментальной биологией, свидетельствует о том, что распределение животных одного и того же вида по их чувствительности к воздействию большинства лекарственных препаратов достаточно хорошо описывается нормальным распределением. Это означает, что если на бесконечно большом количестве животных будет измеряться некоторый показатель эффекта, вызываемый препаратом в определенной дозе, то графическое изображение результатов такого эксперимента (ось абсцисс — величина эффекта, ось ординат — количество животных, у которых наблюдался эффект данной величины) часто будет описываться симметричной кривой вида (рис. 1). Однако надо обратить внимание читателей, что заключение о конкретном законе распределения данной совокупности делается на основе проверки специальных статистических тестов, а в случае недостаточного объема выборки — с помощью графических методов.

Изображенная на рисунке 1 кривая носит название кривой *нормального распределения* или кривой Гаусса-Лапласа. Кривая такого типа однозначно характеризуется двумя величинами: M — *математическим ожиданием* (или *арифметическим средним значением*) и s — *средним квадратичным (или стандартным) отклонением*. Значения этих величин определяют положение кривой в системе координат и ее форму. Так, максимум достигается в точке, соответствующей среднему значению M ; среднее квадратичное отклонение определяет форму кривой: при большой вариабельности данных, то есть большом значении s , кривая будет более пологой, при малой — крутой. Таким образом, количественный показатель эффекта при его приближенно нормальном распределении может быть охарактеризован средним значением и средним квадратичным отклонением (или дисперсией).

При использовании в исследовании достаточно большого числа животных можно говорить математическим языком о *сплошном* изучении *генеральной совокупности*. Однако в реальных условиях эксперимент проводится на ограниченном количестве животных, которые представляют *выборку* из генеральной совокупности. Количество объектов в выборке называется *объемом выборки* и обозначается n . При анализе данных доклинических исследований обычно приходится иметь дело с малыми выборками, часто $n < 30$. Известно, что правильно отобранная часть генеральной совокупности может довольно хорошо отображать структуру этой совокупности, но полного совпадения выборочных показателей с характеристиками генеральной совокупности, как правило, не бывает. Выборочные характеристики являются лишь приближенными оценками генеральных параметров. Это — случайные величины, и их оценки могут быть *точечными* и *интервальными*.

Выборочная средняя и стандартное квадратичное отклонение Sx , являющиеся точечными оценками соответствующих параметров M и s генеральной совокупности, вычисляются по следующим формулам:

$$\bar{X} = \frac{1}{n} \sum x_i; \quad (1)$$

$$Sx = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X})^2}{1 - n}}, \quad (2)$$

где x_i — i значение оцениваемого признака, n — объем выборки, Σ — знак суммирования по всем элементам выборки ($i=1, \dots, n$).

$$Dx = Sx^2 — \text{выборочная дисперсия признака.} \quad (3)$$

Величину отклонения выборочного показателя от его генерального параметра называют *статистической ошибкой*, для измерения этой ошибки некоторой статистики служат *дисперсия* или *квадратичная (стандартная) ошибка статистики* (нельзя путать соответственно с выборочными дисперсией и средним квадратичным отклонением). *Стандартная ошибка средней арифметической Sx* может быть найдена по формуле:

$$\sigma x = \frac{Sx}{\sqrt{n}}. \quad (4)$$

На практике достаточно часто приходится сравнивать изменчивость признаков, выраженных разными единицами. В этих случаях используют относительные показатели вариации, например, *коэффициент вариации CV*. Этот показатель представляет собой среднее квадратичное отклонение, выраженное в процентах, от величины средней арифметической:

$$CV = 100\% \times \frac{Sx}{X}.$$

Этот показатель также является выборочным, и его ошибка может быть оценена по формуле:

$$\sigma_{CV} = CV \times \sqrt{\frac{0,5 + 0,0001 \times CV^2}{n}}. \quad (5)$$

Обычно варьирование признака считается средним, если величина коэффициента вариации находится в пределах от 10 до 25%.

Нормальный закон распределения полностью задается двумя статистическими параметрами — средним значением и стандартным отклонением (или дисперсией).

По известным выборочным характеристикам можно построить *интервальную оценку*, или *доверительный интервал*, в котором с той или иной вероятностью находится генеральный параметр. Вероятности, признанные достаточными для уверенного суждения о генеральных параметрах на основании известных выборочных показателей, называют *доверительными*. Обычно в медико-биологических исследованиях приемлемым является значение доверительной вероятности $P=0,95$. С доверительной вероятностью тесно связано понятие *уровень значимости α* , который вычисляется как разность $\alpha = 1 - P$.

Как известно из *центральной предельной теоремы*, независимо от распределения исходной совокупности, из которой извлечены выборки, выборочные средние имеют приближенно нормальное распределение. Таким образом, доверительный интервал для выборочного среднего значения находится между границами $-t \times sx$ и $+t \times sx$, где t — *коэффициент Стьюдента*, величина, зависящая от объема выборки и от выбранного уровня значимости, определяется по таблицам распределения Стьюдента (таблица 1).

В данном случае число степеней свободы при пользовании таблицей вычисляется как $f=n-1$. Иллюстрацию см. на рисунке 2.

Надо обратить внимание, что в некоторых руководствах по биометрии предлагается при построении доверительного интервала для генеральной средней в качестве значений t брать критические значения стандартного нормального распределения (таблица 7) или, другими словами, предельные значения распределения Стьюдента (таблица 1 для числа степеней свободы, равного бесконечности). Тогда наиболее часто используемым доверительным вероятностям соответствуют следующие табличные значения коэффициента: $P_1=0,95$ соответствует $Z=1,96$; $P_2=0,99$ — $Z=2,58$; $P_3=0,999$ — $Z=3,29$. Однако такой метод применим только в том случае, если дисперсия изучаемой совокупности известна заранее. В случае неизвестной и оцененной по выборке дисперсии для построения доверительного интервала при оценке значения коэффициента Стьюдента по таблицам необходимо учитывать число степеней свободы.

При достаточно большом объеме выборки ($n>30$) можно считать, что истинное значение средней при уровне вероятности $P=0,95$ находится в пределах $\pm 2 \times s_x$. При этом вероятность выхода истинного значения средней за пределы этих границ равна уровню значимости 0,05.

Пример 1.

Изучали влияние предварительного введения потенциального антигипоксанта на содержание креатинфосфата (ммоль/г) в ткани сердца и концентрацию молочной кислоты в крови (ммоль/л) у животных, подвергшихся действию острой гипоксии (подъем в барокамере на высоту 8000 м). Результаты приведены в таблице 11. Группа 1 — интактные животные, группа 2 — животные, перенесшие 30-минутную гипоксию, группа 3 — животные, перенесшие 30-минутную гипоксию на фоне введения антигипоксанта.

Таблица 11

Содержание креатинфосфата, мМ/г			Исходное содержание молочной кислоты, мМ/л			Прирост концентрации молочной к-ты, мМ/л	
Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 1	Группа 2	Группа 3	Группа 2	Группа 3
1	2	3	4	5	6	7	8
12	8	8	0,7	0,8	0,8	4	4
13	8	9	1,4	0,9	0,9	5	3
14	9	9	1,8	2,5	2,3	4	3,5
15	10	11	1,5	1,2	2,0	3,5	2
14	7	12	1,1	1,3	1,4	5	1
13	7	12	1,6	1,5	1,6	5	1,5
13	9	13	1,7	1,6	1,3	3,5	1
10	9	13	1,3	2,1	1,7	4	1,5
11	11	12	1,4	2,0	1,5	2	2
16	6	11	2,2	1,0	1,6	5	2

В качестве примера для расчета рассмотрим данные 1-го столбца таблицы 11. Выборочное математическое ожидание вычисляется по формуле

$$\bar{X} = \frac{12+13+14+15+14+13+13+10+11+16}{10} = 13,1.$$

Выборочная дисперсия данного показателя равна $Dx=3,2$; среднее квадратичное отклонение $Sx = \sqrt{Dx} = \sqrt{3,2} = 1,79$.

$$CV = \frac{1,79}{13,1} \times 100\% = 13,7\% \text{ — ошибка коэффициента вариации; } s_{CV} = 3,12 \text{ — ошибка вы-}$$

борочной средней.

Коэффициент Стьюдента t в данном случае для числа степеней свободы $f=10-1=9$ и уровня значимости 5% равен 2,26 (таблица 1), 95% доверительный интервал для средней арифметической заключен между границами $13,1 \pm 2,26 \times 0,57$, таким образом левая граница интервала равна 11,81, а правая — 14,39.

Часто при анализе результатов доклинических исследований, предполагающих дизайн параллельных групп, средние групповые значения сопоставляются между собой или с показателями группы контроля; на основе такого сопоставления и делаются определенные выводы, ради которых проводятся исследования. Если исследователь просто сопоставляет средние значения, рассчитанные по малым выборкам, без учета их случайной природы, возникает реальная опасность ошибочных заключений. Необходимо иметь в виду, что разность средних арифметических двух выборок, каждая из которых имеет свою ошибку, также является случайной величиной со своей стандартной ошибкой. Сопоставление выборочных средних арифметических, рассчитанных на основе ограниченного количества наблюдений, позволяет оценить лишь доверительные границы, в пределах которых при данном уровне значимости находится разность истинных средних значений, — метод доверительных интервалов. Такие сопоставления методами математической статистики могут также делаться с помощью тестирования статистической гипотезы о равенстве средних значений выборок.

2. Статистические гипотезы и их проверки

О преимуществе той или иной из сравниваемых групп судят обычно по разности между средними значениями, средними долями, другими выборочными показателями или распределениями — величинами случайными и являющимися статистическими выборочными оценками соответствующих генеральных показателей. Вопрос о достоверности различий может решаться на основе проверки по выборочным характеристикам той или иной статистической гипотезы.

В области биомедицинских исследований широкое применение получила так называемая *нулевая гипотеза*. Смысл ее в случае сравнения групповых средних значений сводится к предположению, что различия, наблюдаемые между выборочными характеристиками, носят исключительно случайный характер. Так, например, если одна выборка извлечена из нормально распределенной генеральной совокупности с параметрами (среднее значение и стандартное отклонение) M_1 и s_1 , а другая — из совокупности с параметрами M_2 и s_2 , то нулевая гипотеза состоит в том, что $M_1 = M_2$, то есть $M_1 - M_2 = 0$. Противоположная нулевой — *альтернативная гипотеза* — состоит в том, что средние считаются либо просто неравными $M_1 - M_2 \neq 0$ (*двусторонний тест*), либо исследователь ориентирован в направлении эффекта одного метода над другим, а возможность преимущества другого исключается, например, $M_1 > M_2$ (*односторонний тест*). При таком подходе не ставится задача количественной оценки имеющихся различий, достаточно лишь проверить, принадлежат ли обе группы с определенной вероятностью к различным генеральным совокупностям. Надо заметить, что при решении других статистических задач нулевая гипотеза будет иметь другую формулировку. Обычно нулевая гипотеза формулируется в соответствии с целью исследования как утверждение, которое хотелось бы отвергнуть, а альтернативная гипотеза — к которому хотелось бы прийти по результатам проведенного исследования.

Проверяется статистическая гипотеза с помощью величин или, другими словами, статистик, функции распределения которых известны и табулированы (например, t -распределение Стьюдента, распределение χ^2 и др.). Эти величины в каждом конкретном случае позволяют выявить, удовлетворяют ли выборочные показатели выдвинутой

гипотезе. Процедура проверки гипотезы связана с объемом выборки (или соответствующим числом степеней свободы f) и понятиями *ошибки I и II рода*. Так, *вероятность ошибки I рода* — возможность ошибочно отклонить нулевую гипотезу, то есть найти различия там, где их нет (ложноположительный результат). Приемлемая для данного эксперимента ошибка I рода называется *уровнем значимости α* . Уровень значимости, или вероятность ошибки I рода, допускаемой при оценке принятой гипотезы, может различаться (5; 1; 0,1 %), но в медико-биологических приложениях, если специально не оговорено другое значение, он обычно принимается равным 5%. *Ошибка II рода* возникает, когда мы принимаем нулевую гипотезу, а она неверна, другими словами, не находим существующее различие (ложноотрицательный результат). Вероятность ошибки II рода обозначается буквой β , обычно ее величина в исследовании 10–20 %.

Важным является также вопрос о справедливости нулевой гипотезы. Для оценки справедливости H_0 рассчитывается показатель, который обычно обозначается буквой p . Он оценивает вероятность того, что значение критерия окажется не меньше критического значения при условии справедливости нулевой гипотезы, то есть при отсутствии различий между сравниваемыми группами. Поэтому, если в результате проверки нулевой гипотезы она было отвергнута на уровне значимости α , то для отражения наличия статистически значимых различий результат сравнения может быть записан в виде $p < \alpha$. Это означает, что ошибка сравнения возможна не более чем в $\alpha \times 100$ % случаев, а значит, маловероятна. Больше информации о результатах проверки статистической гипотезы содержится в записи вида двойного неравенства, например $(0,01 < p < 0,05)$.

Для проверки гипотез в биометрии возможны два вида критериев: *параметрические* (построенные на основании параметров данной совокупности) и *непараметрические* (построенные непосредственно по вариантам данной совокупности и их частотам). Первые служат для проверки гипотез о параметрах совокупности, распределенных по известному закону (обычно в биометрии по нормальному закону), вторые — для проверки гипотез независимо от формы распределения совокупностей. Так, при нормальном распределении признака параметрические критерии обладают большей мощностью, чем непараметрические, поэтому, если известно, что сравниваемые выборки извлечены из приблизительно нормально распределенных совокупностей, предпочтение следует отдавать параметрическим критериям. В случае значительных отклонений распределения признака от нормального закона, а также при малых объемах выборки рекомендуется применять непараметрические критерии. Если признаки выражаются не количественными переменными, а качественными с числом градаций больше двух, применение непараметрических критериев оказывается единственно возможным. Проверить, извлечена ли рассматриваемая выборка из нормально распределенной совокупности в свою очередь можно с помощью специальных статистических тестов. Кратко познакомим с некоторыми из них.

3. Проверка гипотезы о законах распределения

Гипотезу о законе распределения проверяют разными способами, например, с помощью коэффициентов *асимметрии* и *эксцесса*. С формулами для расчета этих показателей можно познакомиться, например, в [7, 9, 12, 19, 20]. При нормальном распределении эти показатели должны быть равны нулю. Однако на практике такое равенство почти не встречается, так как эти показатели также являются случайными величинами, имеющими ошибки. Поэтому для проверки нормальности распределения рекомендуется использовать соответствующие таблицы, в которых указаны критические точки для этих коэффициентов при различных уровнях значимости и объемах выборки n . Если наблюдаемые значения для коэффициентов асимметрии и эксцесса превосходят эти критические точки, гипотеза о нормальности распределения отвергается.

Кроме того, для оценки меры совпадения теоретической кривой распределения с фактическими данными на практике часто используется *критерий согласия χ^2* (Хи-

квадрат). Полученные в ходе эксперимента результаты представляются в виде *вариационного ряда* или *ряда распределения*. Вариационный ряд представляет собой двойной ряд чисел, показывающий для каждого значения признака (варианты), сколько раз оно(она) встречается в данной совокупности (частота варианты). Это определение в большей мере относится к так называемому *безынтервальному вариационному ряду*. Однако, если общую вариацию признака (в пределах от минимальной до максимальной варианты) разбить на промежутки и подсчитать частоту попадания вариант данной совокупности в эти интервалы, получится *интервальный вариационный ряд*. Графически вариационные ряды обычно представляются в виде гистограмм частотного распределения.

Данный критерий согласия эффективен при условии наличия не менее 50 элементов в выборке и при наличии хотя бы 1 попадания значения в каждый интервал вариационного ряда [19]. Если же в каком-нибудь интервале вариационного ряда не содержится частот, то этот класс объединяется с соседним классом. Общая формула этого критерия выглядит как:

$$\chi^2 = \sum_{i=1}^k \frac{(f - f_t)^2}{f_t}, \quad (6)$$

где f — фактические частоты, оцененные по изучаемой выборке, f_t — частоты, рассчитанные по теоретическому распределению.

Для оценки полученной величины Хи-квадрат необходимо знать число степеней свободы, которое зависит от того, какой тип теоретического распределения участвует в расчетах. Так при нормальном распределении число степеней свободы $f=k-3$, где k — число интервалов ряда. Вычисленное значение χ^2 не должно превышать табличное (таблица 2) при данных значениях f и α , тогда мы имеем право сделать вывод о несущественном различии теоретического и эмпирического распределений. При полном совпадении эмпирических частот с вычисленными значение Хи-квадрат было бы равно 0.

Пример 2.

Проиллюстрируем применение критерия согласия Хи-квадрат для проверки нормального закона распределения, используя данные столбцов 4–6 таблицы 11 (исходное содержание молочной кислоты). Данные этих трех столбцов могут быть объединены в одну обобщенную выборку, поскольку исходно все животные были однородны. Таким образом, мы получаем выборку объемом $n=30$ (малый объем выбран для наглядности вычислений) и хотим проверить, является ли она выборкой из генеральной совокупности, распределенной по нормальному закону. Среднее значение нашей выборки равно 1,49, а среднее квадратичное отклонение — 0,46. Ранжируя обобщенную выборку в порядке возрастания, видим, что значения изучаемого показателя варьируются от 0,7 до 2,5. Построим интервальный вариационный ряд: диапазон значений данного показателя [0,5; 2,5] разобьем на интервалы длиной 0,5 (получили 4 интервала) и определим частоту попадания вариант нашей выборки в соответствующие интервалы (см. таблицу 12, 1–2 столбцы). Поскольку табулировано (таблица 10) распределение нормальной случайной величины с нулевым математическим ожиданием и единичной дисперсией (стандартная нормальная переменная), проводим стандартизацию нашей переменной x_i (вычитаем среднее значение из величин x_i , делим результат на среднее квадратичное отклонение), полученное значение заносим в 3 столбец таблицы 12. Для значений стандартизованной переменной определяем соответствующие ординаты кривой нормального распределения (столбец 4). Теоретические частоты нормального распределения (столбец 5) получаем, умножая ординаты нормальной кривой из столбца 4 на произведение объема выборки (30) и ширины интервала (0,5), а затем делим результат на среднее квадратичное отклонение (0,46). Надо заметить, что это достаточно удобный, но не единственный способ расчета теоретических частот нормального распределения.

Центр интервала x_i	Фактические частоты	Стандартизованная переменная	Ординаты нормальной кривой	Теоретические частоты
0,75	6	-1,61	0,1092	3,7
1,25	11	-0,52	0,3485	11,5
1,75	9	0,57	0,3391	11,2
2,25	4	1,65	0,1023	3,5

В таблице 12 и на рисунке 3 показаны распределения теоретических и фактических частот распределения. Каждое слагаемое для критерия согласия χ^2 представляет собой разницу между соответствующими фактическими и теоретическими частотами, возведенную в квадрат и деленную на значение теоретической частоты, в нашем примере критерий $\chi^2 = 1,95$. В данном случае выборочное и теоретическое распределения различаются не существенно, так как рассчитанная величина статистики χ^2 не превышает табличное значение 3,84 (таблица 2), взятое для числа степеней свободы $f=4-3=1$ и уровня значимости $\alpha=5\%$. Таким образом, можно сделать вывод, что с вероятностью более 95% наша выборка извлечена из совокупности, распределенной по приблизительно нормальному закону.

Кроме того, для проверки статистически значимых отклонений выборочного распределения от нормального закона используется и критерий Колмогорова—Смирнова. Более подробно с различными тестами для проверки гипотез о законе распределения можно ознакомиться, например, в [7, 9, 12, 18–20].

4. Первичная обработка результатов

Построение рядов распределения — один из возможных способов описания полученных данных. А средняя арифметическая и дисперсия — одни из основных характеристик варьирующих объектов. Однако надо иметь в виду, что они не являются универсальными; для статистического описания данных в качестве обобщающих характеристик совокупности полезными (особенно если совокупность не распределена по нормальному закону) могут оказаться и так называемые *структурные показатели*. На практике часто используют такие структурные показатели, как *медиана*, *мода*, *квантили* (*квартили*, *децили*, *перцентили*), *минимальное значение*, *максимальное значение*, *размах вариации* и др. Подробнее об этом можно прочесть в [1, 9, 13, 18–20].

Так, *медиана* определяется как средняя, относительно которой упорядоченный ряд распределения делится на две равные части: в обе стороны от медианы располагается одинаковое число вариант. Для ранжированного ряда с нечетным числом членов центральная варианта и будет его медианой. При четном числе членов ряда медиана определяется по полусумме двух соседних вариант, расположенных в центре ранжированного ряда.

Еще одна структурная характеристика — *мода*. Так называется величина, наиболее часто встречающаяся в данной совокупности. В случае нормального распределения значения средней арифметической, медианы и моды совпадают.

Квантили — конкретная варианта совокупности, отсекающая в пределах вариационного ряда определенную часть (указывается в процентах) его членов. На практике используются обычно перцентили P3, P10, P25, P50, P75, P90 и P97. Причем P25 и P75 соответствуют первому и третьему квартилям, между которыми содержится 50 % элементов выборки, а P50 равен медиане. Формулы для расчета моды и квантилей для интервальных вариационных рядов содержатся, например, в [9,15,16].

Размах вариации равен разности между максимальным и минимальным вариантами совокупности.

При первичной обработке данных часто возникает ситуация — отдельные варианты, полученные в эксперименте выборки, по своим значениям сильно отличаются от осталь-

ных ее членов. Возможно, это произошло из-за погрешностей в постановке эксперимента. Проверка, принадлежит ли эта *сомнительная варианта (outlier)* изучаемой совокупности, делается с помощью специальных статистических критериев [1, 7, 9, 12, 15]. Однако решение об исключении резко отличающихся измерений из анализа принимается не на основе статистического тестирования. Если причина такого отклонения установлена, наблюдение может быть исключено как некорректное. Если причина отклонения неизвестна, проводится анализ чувствительности: расчет проводится в присутствии отличающегося наблюдения и еще раз после его исключения. Статистическое тестирование различий в получаемых на основе двух наборов данных результатах позволяет сделать вывод о влиянии исключения сомнительного наблюдения (анализ чувствительности).

Одним из таких статистических критериев для выявления резко отличающихся наблюдений в случае нормально распределенной выборки является проверка разностей между сомнительными и соседними членами ранжированного ряда [9]. Для этого вычисляются статистики

$$t_1 = \frac{x_2 - x_1}{x_{n-1} - x_1} \quad \text{или} \quad t_2 = \frac{x_n - x_{n-1}}{x_n - x_2}.$$

Первая для проверки наименьших x_p , вторая — для наибольших x_n сомнительных вариантов ранжированного ряда. Гипотезу о принадлежности сомнительной варианты изучаемой совокупности отвергают, если соответствующее рассчитанное значение статистики превзойдет табличное значение (таблицы 3а и 3б) для выбранного уровня значимости и объема выборки №.

Другим возможным критерием в случае нормально распределенной выборки для проверки единственного отличающегося наблюдения может быть Q-тест Диксона (Dixon Q-test). В случае множественных отличающихся наблюдений может использоваться критерий Grubbs' T-test. Для проверки последовательно вычисляется критериальная

статистика T для наиболее отличающегося значения ($T = \frac{|x_i - \bar{x}|}{Sx}$ — расстояние от сред-

него значения в единицах стандартного отклонения) и сравнивается с табличным значением. Если проверяемое значение T превзойдет соответствующее табличное значение и будет признано резко отличающимся, то при необходимости последующих проверок процесс повторяется, начиная с расчета нового среднего значения по выборке с исключенной на предыдущем шаге вариантной.

Пример 3.

Для оценки перцентилей рассмотрим выборку из примера 1, ранжируем ее в порядке возрастания, получаем ряд: 10 11 12 13 13 13 14 14 15 16.

Медианой выборки (P50) будет среднее значение 5-й и 6-й варианты, то есть она равна 13, мода также равна 13 (это значение встречалось чаще других), P25 оценим как 12, соответственно P75 можно оценить как 14. В данном случае мы можем только оценить значения квартилей, поскольку точно обеспечить разбиение порядковых статистик на 4 подмножества равного размера с помощью квартилей (P25, P50, P75) можно лишь в том случае, когда объем выборки имеет вид $n=4k+3$ (k — любое целое число). В этом случае квартилям соответствуют следующие варианты ранжированного ряда: P25 = X_{k+1} ; P50 = X_{2k+2} ; P75 = X_{3k+3} .

Максимальная варианта нашей выборки равна 16, а минимальная 10, размах равен 6. Статистические результаты исследования можно записать в форме $\bar{X} \pm Sx(X \max \div X \min)$. Так в нашем примере эта запись будет выглядеть как $13,1 \pm 1,79(10 \div 16)$. Иногда применяется запись вида $\bar{X} \pm Sx(\bar{X} - t \times \sigma x \div \bar{X} + t \times \sigma x)$, то есть в скобках указывают границы 95% доверительного интервала для средней арифметической. В нашем случае получаем запись $13,1 \pm 1,79(11,81 \div 14,39)$.

Допустим, что в данном примере в результате неконтролируемых нарушений условий фиксации ткани в жидком азоте вместо какого-то из значений (например,

последнего) было получено значение 6. Эта варианта является сомнительной, ее значение существенно меньше остальных, проверим возможность ее исключения. Ранжированный вариационный ряд в данном случае будет выглядеть как 6 10 11 12 13 13 13 14 14 15.

Рассчитаем для сомнительной варианты статистику t_1 :

$$t_1 = \frac{10-6}{14-6} = 0,5.$$

Критическое значение для статистики t_1 (уровень значимости равен 5% и $n=10$) равно 0,41 (таблица 3а), а значит, рассчитанное значение критерия превосходит табличное. Нулевая гипотеза может быть отвергнута на выбранном уровне значимости, и проверяемое значение признается резко отличающимся наблюдением.

5. Параметрические критерии для проверки гипотез о различии (сходстве) между средними значениями в двух параллельных группах и о значимости средних изменений показателя (парные сравнения)

Наиболее распространенным параметрическим методом оценки различий между сравниваемыми средними является **критерий Стьюдента**, или **t -критерий**. Так как согласно нулевой гипотезе $M_1 - M_2 = 0$, то t - критерий выражается в виде отношения разности выборочных средних к ошибке такой разности, то есть

$$|t| = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sigma d} \text{ или } |t| = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\sigma x_1^2 + \sigma x_2^2}}, \quad (7)$$

где σd — ошибка разности средних значений, σx_1 , σx_2 — ошибки сравниваемых средних арифметических.

Гипотезу о равенстве математических ожиданий отвергают, если фактически полученная величина t -критерия превзойдет или окажется равной табличному значению (распределение Стьюдента, таблица 1) для принятого уровня значимости и числа степеней свободы f . При этом делается заключение о наличии статистически значимых различий между средними значениями при соответствующем уровне значимости.

Формулы для расчета тестовой статистики t и числа степеней свободы f несколько различаются в зависимости от равенства или неравенства дисперсий сравниваемых совокупностей. Этот вопрос требует внимательного рассмотрения, особенно для выборок малого объема ($n < 20$).

В случае равенства дисперсий или выборок достаточно большого объема ошибка разности средних Sd определяется по следующим формулам:

Для неравночисленных выборок при $n_1 \neq n_2$,

$$\sigma d = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X}_1)^2 + \sum (x_i - \bar{X}_2)^2}{n_1 + n_2 - 2} \left(\frac{n_1 + n_2}{n_1 n_2} \right)}. \quad (8)$$

Для равночисленных выборок при $n_1 = n_2$ формула несколько упрощается:

$$\sigma d = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{X}_1)^2 + \sum (x_i - \bar{X}_2)^2}{(n-1)n}}, \quad (9)$$

а число степеней свободы для случая равных дисперсий равно $f = n_1 + n_2 - 2$.

Если хотя бы одна из сравниваемых выборок мала, то сначала следует проверить гипотезу о равенстве дисперсий выборок. В зависимости от ответа на этот вопрос последующее сравнение средних арифметических производят двумя различными способами.

Для проверки гипотезы о равенстве генеральных дисперсий пользуются критерием Фишера. При этом вычисляют показатель Фишера, равный отношению большей дисперсии к меньшей:

$$F = \frac{Sx_1^2}{Sx_2^2}, \quad Sx_1^2 \geq Sx_2^2. \quad (10)$$

Показатель Фишера всегда $F > 1$, а при равенстве дисперсий $F = 1$. Чем значительней неравенство, тем больше будет значение показателя и наоборот. Функция F табулирована [7, 9, 12, 15, 16] и зависит от чисел степеней свободы $f_1 = n_1 - 1, f_2 = n_2 - 1$. Если вычисленное значение F превысит соответствующее табличное значение и гипотеза о равенстве дисперсий будет отвергнута, то это означает, что выборки взяты из совокупностей с разными дисперсиями.

Итак, в случае несущественно различающихся или равных дисперсий средние арифметические сравниваются по формулам (7–9), приведенным выше.

А при различных по величине дисперсиях выборок разница средних арифметических оценивается по формуле t с числом степеней свободы:

$$f = \frac{(n_1 - 1)(n_2 - 1) \left(\frac{Sx_1^2}{n_1} + \frac{Sx_2^2}{n_2} \right)^2}{(n_2 - 1) \left(\frac{Sx_1^2}{n_1} \right)^2 + (n_1 - 1) \left(\frac{Sx_2^2}{n_2} \right)^2} \quad (11)$$

(число степеней свободы округляется до целого числа),

$$|t| = \frac{\bar{X}_1 - \bar{X}_2}{\sqrt{\frac{Sx_1^2}{n_1} + \frac{Sx_2^2}{n_2}}}. \quad (12)$$

Пример 4.

Допустим, что в ходе исследования были получены значения определенного параметра, характеризующего эффект изучаемого воздействия, для двух групп животных. Используя данные примера 1 (2 и 3 столбец таблицы 11) покажем, как можно сравнить две независимые выборки из нормально распределенных совокупностей, для получения ответа на вопрос о существовании статистически достоверных различий между их средними значениями. Поскольку значения генеральных параметров неизвестны, определим выборочные средние и дисперсии для обеих выборок. В нашем случае $n_1 = 10; n_2 = 10$. Прежде всего, проверим $X_1 = 8,4; X_2 = 11; Dx_1 = 2,28; Dx_2 = 3,1$ по критерию Фишера гипотезу о равенстве дисперсий обеих выборок, F -отношение равно $3,1/2,28 = 1,36$. По таблицам находим критическую точку для отношения Фишера в случае уровня значимости 5% и числа степеней свободы $f_1 = f_2 = 9$, ее значение равно 3,18. Наше рассчитанное F -отношение не превышает табличное, то есть на 5% уровне значимости нулевая гипотеза о равенстве дисперсий остается в силе.

А значит, расчет критерия Стьюдента будем проводить по формулам 7 и 9 (случай равенства дисперсий и равночисленных выборок). Для двустороннего критерия Стьюдента определяем модуль разности между выборочными средними, он равен 2,6. Найдем ошибку разности средних:

$$\sigma d = \sqrt{\frac{Dx_1 + Dx_2}{n}} = \sqrt{\frac{2,28 + 3,1}{10}} = 0,73.$$

Тогда значение t критерия Стьюдента равно $t = 2,6/0,73 = 3,56$.

Для уровня значимости 5% и числа степеней свободы $f = 10 + 10 - 2 = 18$ по таблице 1 находим критическое значение, равное 2,1. Так как вычисленное значение критерия превосходит соответствующее табличное, нулевая гипотеза отвергается на уровне значимо-

сти $p < 0,05$. На принятом уровне значимости разница между результатами исследования в двух сравниваемых группах оказалась статистически достоверной.

Для сравнения двух *зависимых* выборок или выборок с *попарно связанными вариантами* (перекрестный дизайн, исследования изменений ДО – ПОСЛЕ) проверяют гипотезу о равенстве нулю среднего значения их *попарных разностей*. В этом случае оценкой разности между генеральными средними будет средняя разность, определяемая из суммы попарных разностей, то есть

$$d = \frac{\sum d_i}{n} = \bar{X}_1 - \bar{X}_2. \quad (13)$$

Оценкой генеральной дисперсии разности средних будет выборочная дисперсия

$$Sd^2 = \frac{\sum (d_i - d)^2}{n - 1}, \quad (14)$$

где $d_i = X_{1i} - X_{2i}$ – попарные разности связанных вариантов, n – число парных наблюдений.

Ошибка средней разности определяют по формулам:

$$\sigma d = \sqrt{\frac{\sum (d_i - d)^2}{n(n - 1)}}. \quad (15)$$

Если члены генеральной совокупности распределяются нормально, то разности между ними будут также распределяться нормально. Поэтому для проверки нулевой гипотезы о равенстве средних значений рассчитывается тестовое отношение

$$t = d / Sd, \quad (16)$$

которое проверяется по таблицам Стьюдента (таблица 1) для выбранного уровня значимости и числа степеней свободы $f = N - 1$. Нулевая гипотеза отвергается для данного уровня значимости, если вычисленное значение превзойдет соответствующее табличное.

Пример 5.

Для примера сравнения выборок с попарно связанными вариантами рассмотрим результаты изменения содержания молочной кислоты в крови животных из примера 1. Для 2-й группы животных будем решать так называемую статистическую задачу «до и после», анализируя столбцы 5 и 7 таблицы 11. Таким образом, получаем две связанные выборки концентрации молочной кислоты в крови животных 2-й группы: исходно и после подъема в барокамере:

Таблица 13

Группа 2 – ДО	Группа 2 – ПОСЛЕ	Попарные разности $d_i = X_{1i} - X_{2i}$
0,8	4,8	4,0
0,9	5,9	5,0
2,5	6,5	4,0
1,2	4,7	3,5
1,3	6,3	5,0
1,5	6,5	5,0
1,6	5,1	3,5
2,1	6,1	4,0
2,0	4,0	2,0
1,0	6,0	5,0

Средняя разность равна $d = \frac{\sum d_i}{n} = \frac{41}{10} = 4,1$.

Ошибка разности $\sigma d = \frac{Sd}{\sqrt{n}} = \frac{0,97}{\sqrt{10}} = 0,31$.

Критерий $t=d/Sd = 4,1/0,31 = 13,4$. Для уровня значимости 5 % и числа степеней свободы $f=10-1=9$ критическое значение равно (таблица 1) 2,26. Так как вычисленное значение критерия превышает соответствующее табличное, нулевую гипотезу отвергают и с вероятностью более 95 % можно утверждать, что разница между средними значениями сравниваемых выборок статистически достоверна.

Правильное применение t -критерия предполагает *нормальное распределение* совокупностей, из которых извлечены сравниваемые выборки. Если это условие не выполняется, то более эффективными будут непараметрические критерии.

6. Непараметрические критерии для проверки гипотез о различии (сходстве) между двумя параллельными группами и о значимости изменений показателя (парные сравнения)

Как уже говорилось выше, литературные данные из области экспериментальной биологии свидетельствуют о том, что распределение животных одного и того же вида по их чувствительности к воздействию лекарственного препарата достаточно хорошо описывается нормальным законом распределения. А значит, обычно изучаемые параметры фармакологического эффекта при их представлении в количественной форме могут анализироваться в рамках параметрического подхода. Однако при количественной форме описания признаков для их сравнения может применяться и целый ряд непараметрических критериев (особенно в случае малых объемов выборок) среди которых важное место занимают так называемые ранговые критерии. Применение этих критериев основано на ранжировании членов сравниваемых групп. При этом сравниваются не сами члены ранжированного ряда, а их порядковые номера или ранги. Познакомиться с основными непараметрическими критериями — X -критерием Ван-дер-Вардена (для независимых выборок), U -критерием Уилкоксона (для независимых выборок), критерием знаков Z (для попарно связанных выборок), T -критерием Уилкоксона (для попарно связанных выборок) — можно, например, в книгах [6, 7, 9, 12, 13, 17, 19]. Там же даны и основные таблицы для проверки этих критериев. При решении конкретной задачи очень важно правильно выбрать критерий, решение этих вопросов для медико-биологических приложений достаточно подробно рассмотрено в [4, 9, 17, 19].

Приведем **U -критерий Уилкоксона (Манна-Уитни)** для проверки гипотезы о принадлежности сравниваемых независимых выборок к одной и той же генеральной совокупности или совокупностям с одинаковыми параметрами. Гипотезу проверяют, расположив в обобщенный ряд значения сравниваемых выборок в возрастающем порядке. Всем значениям полученного обобщенного ряда присваиваются ранги от 1 до $N=n_1+n_2$. Для каждой выборки находят суммы рангов R и рассчитываются статистики:

$$U_i = R_i - \frac{n_i(n_i+1)}{2} \quad \text{для } i=1 \text{ и } 2 - \text{ номер выборки.} \quad (17)$$

Если нулевая гипотеза верна и выборки извлечены из одной и той же генеральной совокупности, мы не должны ожидать преобладания наблюдений из одной выборки на одном из концов объединенного вариационного ряда, их значения должны быть достаточно равномерно рассеяны по всему обобщенному ряду. Таким образом, слишком большие или слишком маленькие значения статистики R должны заставить нас усомниться в справедливости нулевой гипотезы.

В качестве тестовой статистики выбирают минимальную величину U и сравнивают ее с табличным значением для принятого уровня значимости. Гипотеза принимается и раз-

личия считаются недостоверными, если рассчитанное значение больше соответствующего табличного (таблица 4).

Обычно в таблицах приводятся критические значения данного критерия для объема выборок 20 или 40. В случае выборок большего объема для проверки данного критерия применяется нормальная аппроксимация. Тогда критические значения для критерия U можно рассчитать по формуле:

$$U_{n_1, n_2, \alpha} = \frac{1}{2} n_1 \times n_2 - Z_{\alpha} \times \sqrt{\frac{1}{12} n_1 \times n_2 \times (n_1 + n_2 + 1)},$$

где Z_{α} — критические значения стандартного нормального распределения (таблица 7).

Пример 6.

Проверим гипотезу о принадлежности сравниваемых независимых выборок к одной и той же генеральной совокупности с помощью непараметрического U -критерия Уилкоксона. Сравним результаты, полученные в примере 4 для 2 и 3-го столбцов таблицы 11 по критерию Стьюдента, с результатами непараметрического сравнения. Для расчета U -критерия Уилкоксона расположим варианты сравниваемых выборок в порядке возрастания в один обобщенный ряд и присвоим вариантам обобщенного ряда ранги от 1 до $n_1 + n_2$. Первая строка представляет собой варианты первой выборки, вторая — второй выборки, третья — соответствующие ранги в обобщенном ряду:

6	7	7	8	8	9	9	9	10	11	11
8	9	9	11	11	12	12	12	13	13	13
1	2,5	2,5	5	5	5	9	9	9	12	14
14	14	14	17	17	17	19,5	19,5	19,5	19,5	19,5

Надо обратить внимание, что если имеются одинаковые варианты, им присваивается средний ранг, однако значение последнего ранга должно быть равно $n_1 + n_2$ (в нашем случае 20). Это правило используют для проверки правильности ранжирования.

Отдельно для каждой выборки рассчитаем суммы рангов их вариант $R1$ и $R2$. В нашем случае

$$R1 = 1 + 2,5 + 2,5 + 5 + 5 + 9 + 9 + 9 + 12 + 14 = 69$$

$$R2 = 5 + 9 + 9 + 14 + 14 + 17 + 17 + 17 + 19,5 + 19,5 = 141$$

Для проверки правильности вычислений можно воспользоваться другим правилом:

$$R1 + R2 = 0,5 \times (n_1 + n_2) \times (n_1 + n_2 + 1)$$

$$\text{В нашем случае } R1 + R2 = 69 + 141 = 0,5 \times 20 \times 21 = 210.$$

Статистика $U1 = 69 - 10 \times 11 / 2 = 14$, $U2 = 141 - 10 \times 11 / 2 = 86$. Для проверки одностороннего критерия выбираем минимальную статистику $U1 = 14$ и сравниваем ее с табличным значением (таблица 4) для $n_1 = n_2 = 10$ и уровня значимости 1 %, равного 19. Так как вычисленное значение критерия меньше табличного, нулевая гипотеза отвергается на выбранном уровне значимости, и различия между выборками признаются статистически значимыми с вероятностью более 99%. Таким образом, вывод о существовании различий, сделанный с помощью параметрического критерия Стьюдента, подтверждается с помощью данного непараметрического метода.

В случае попарно связанных выборок применяется **T -критерий Уилкоксона**. При этом ранжируют попарные разности — положительные и отрицательные (кроме нулевых) — в один ряд так, чтобы наименьшая абсолютная разница (без учета знака) получила первый ранг, одинаковым величинам присваивают один ранг. Отдельно вычисляют сумму рангов положительных ($T+$) и отрицательных разностей ($T-$), меньшую из двух таких сумм без учета знака считают тестовой статистикой данного критерия. Нулевую гипотезу принимают на данном уровне значимости, если вычисленная статистика превзойдет табличное значение (таблица 5) (число парных наблюдений уменьшают на число исключенных нулевых разностей). Таким образом, можно сказать, что если нулевая гипотеза верна, статистики $T+$ и $T-$ примерно равны, сравнительно малые или большие значения T статистик заставят нас отклонить нулевую гипотезу об отсутствии различий.

Пример 7.

Допустим, в результате проведения эксперимента был вычислен ряд попарных разностей между показателем эффекта в двух попарно связанных группах ($n_1=n_2=10$) (на пример, так называемая задача «до и после»):

0,2 -0,4 0,7 -0,9 1,3 1,5 -0,1 0,8 -1,0 1,1.

Ранжируем попарные разности в один ряд независимо от знака разности, получаем следующий ранжированный ряд:

-0,1	0,2	-0,4	0,7	0,8	-0,9	-1,0	1,1	1,3	1,5
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10

Рассчитаем отдельно сумму рангов положительных (Т+) и отрицательных (Т-) разностей, в нашем случае

$T+ = 2+4+5+8+9+10 = 38$, $T- = 1+3+6+7=17$. Для проверки двустороннего Т-критерия используем меньшую статистику $T- = 17$, сравним ее с табличным значением (таблица 4) для числа попарных разностей $n=10$ и уровня значимости 5 %. Такое табличное критическое значение равно 9. Рассчитанное минимальное значение Т статистики превосходит соответствующее табличное значение, а значит нулевая гипотеза остается в силе.

В случае анализа результатов клинических исследований непараметрические критерии бывают также полезны при качественной или альтернативной форме представления признаков. Этот вопрос будет рассмотрен нами подробнее в соответствующем разделе.

7. Сравнение нескольких параллельных групп и повторных (многократных) измерений

Приведенный выше критерий Стьюдента может быть использован для проверки гипотезы о различии средних только для двух независимых групп. Если схема эксперимента предполагает сравнение большего числа групп по значениям количественного признака, совершенно недопустимо сравнивать их попарно на уровне значимости 5 %, поскольку это приведет к росту вероятности ошибки I рода (проблема множественных сравнений). Для корректного решения этой задачи в случае количественных переменных применяется дисперсионный анализ ANOVA [4, 7, 9, 13, 18, 19]. Однако дисперсионный анализ позволяет проверить лишь нулевую гипотезу о равенстве всех средних (соответствующая альтернативная гипотеза — хотя бы одно среднее значение отличается от остальных). Дисперсионный анализ является параметрическим методом, кроме того, необходимо учитывать степень различий выборочных дисперсий сравниваемых выборок. Хотя дисперсионный анализ является параметрическим методом, он достаточно устойчив к отклонениям распределения показателя от нормального закона, однако получаемые с его помощью результаты могут оказаться некорректными в присутствии относительно большого числа резко отличающихся наблюдений. Если в ходе дисперсионного анализа нулевая гипотеза отвергается, этот метод не позволяет узнать, какое именно групповое среднее значение отличалось от других. Для этого на втором этапе анализа используются методы *множественного сравнения*, которые позволяют поддерживать заданное значение суммарного уровня значимости для всех выполняемых сравнений.

Среди них наиболее известны критерий Стьюдента для множественных сравнений, критерий Ньюмена-Кейлса, критерий Тьюкки, критерий Даннета.

Рассмотрим лишь некоторые из них. Еще раз обращаем внимание, что к применению этих критериев надо прибегать лишь в случае, если дисперсионный анализ показал наличие значимых различий между какими-то средними значениями выборок.

Буквой t обозначим число сравниваемых групп.

Критерий Стьюдента для множественных сравнений основан на использовании **неравенства Бонферрони** [4, 25]: если k раз применить критерий с уровнем значимости α , то вероятность хотя бы в одном случае найти различие там, где его нет, не превышает произведения k на α . Из неравенства Бонферрони следует, что если мы хотим обеспечить вероятность

ошибки $a\epsilon$, то в каждом из сравнений мы должны принять уровень значимости $a\epsilon/k$ — это и есть поправка Бонферрони (k — число сравнений). Число степеней свободы для критерия Стьюдента при множественном сравнении равно $f = m \times (n-1)$, где n — объем группы.

Этот метод хорошо работает, если число сравнений невелико, обычно не больше 8. При большом числе сравнений критерий Ньюмена-Кейлса и критерий Тьюкки дают более точную оценку вероятности $a\epsilon$ [4,7,15].

Иногда задача заключается в том, чтобы сравнить несколько групп с единственной — контрольной. Конечно, можно использовать любой из указанных выше методов: попарно сравнить все группы, а потом выбрать только те сравнения, в которых участвовала контрольная группа. Однако из-за большого числа лишних сравнений критическое значение окажется неоправданно высоким. Для решения этой задачи статистики существуют специальные методы, например, еще одна модификация критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони и критерий Даннета.

В случае *поправки Бонферрони* необходимо учесть реальное число сравнений для этой задачи (оно равно числу групп m минус один) и, соответственно рассчитать уровень значимости $a = a\epsilon / (m - 1)$ [4].

Критерий Даннета более чувствительный, чем предыдущий, особенно при большом числе групп. **Критерий Даннета** вычисляется как [4]:

$$q' = \frac{\overline{Xk} - \overline{Xc}}{\sqrt{S_{ВНУ}^2 \left(\frac{1}{nk} + \frac{1}{nc} \right)}}, \quad (18)$$

где $S_{ВНУ}^2$ — оценка внутригрупповой дисперсии, \overline{Xk} и \overline{Xc} — сравниваемые средние значения, nk и nc — численность групп.

Сначала средние значения для всех групп упорядочиваются по абсолютной величине их отличия от контрольной группы, сравнения начинают с группы, наиболее отличающейся от контроля. Вычисленное значение q' сравнивается с табличным (таблица 9) значением, и, если оно превосходит табличное, статистически значимое различие существует. Число степеней свободы для этого критерия равно $f = N - m$, где N — суммарная численность всех групп, m — число групп. Если различия с очередной группой не найдены, сравнения прекращаются.

Непараметрический **критерий Краскела–Уоллиса** для сравнения нескольких выборок является *напараметрическим* аналогом параметрического дисперсионного анализа ANOVA. Он основан на построении объединенного вариационного ряда из вариант рассматриваемых выборок и присвоении рангов всем вариантам в объединенном ряду объемом N . Далее вычисляются статистики R_i для каждой рассматриваемой выборки отдельно, равные суммам рангов в обобщенном ряду вариантов, входящих в данную i -ую выборку. При этом для каждого наблюдения в конкретной выборке мы можем указать средний ранг, равный R_i/n_i , для всех i от 1 до m . Если выполняется нулевая гипотеза и все совокупности имеют одно и тоже распределение, то можно ожидать, что все средние ранги примерно равны. А именно они примерно равны общему среднему рангу R :

$$R = (1 + 2 + \dots + N) / N = \frac{1}{2}(N + 1). \quad (19)$$

В качестве статистики критерия используется мера, которая чувствительна к отклонению выборочного R_i/n_i от теоретического значения R :

$$K = \sum \frac{R_i^2}{n_i} - \frac{N(N+1)^2}{4}. \quad (20)$$

Сумма берется по всем m выборкам.

Проверить статистику Краскела–Уоллиса можно по специальным таблицам [9, 12, 15]. Однако, если почти все $n_i > 5$, то удобна аппроксимация, которая основана на том, что

статистика $\frac{12K}{N(N+1)}$ имеет распределение Хи-квадрат с $m-1$ степенью свободы при усло-

вии справедливости нулевой гипотезы. Таким образом, рассчитав значение статисти-
ки K , его сравнивают с критическим значением распределения Хи-квадрат (таблица 2),

умноженным на коэффициент $\frac{\chi^2 \times N(N+1)}{12}$. Если вычисленное значение K превосходит

скорректированное критическое, нулевая гипотеза отвергается на уровне значимости $a\%$ и различия считаются статистически значимыми.

Для анализа *повторных измерений* может применяться специальный вариант дисперсионного анализа ANOVA с повторными измерениями (параметрический подход), при этом тестируется нулевая гипотеза о равенстве всех средних значений показателя во всех точках повторных измерений (альтернативная гипотеза — хотя бы одно такое среднее значение в какой-то временной точке отличается от остальных). В качестве непараметрического аналога такого дисперсионного анализа может применяться критерий Фридмана [4, 18, 19]. Если нулевую гипотезу удастся отвергнуть, то на втором этапе анализа сравнение между парами временных точек проводится с помощью подходящих параметрических или непараметрических парных статистических тестов. Хотя не во всех исследованиях результаты такого подхода могут быть корректно интерпретированы. Если позволяет дизайн и цель исследования, могут применяться подходящие обобщенные меры, характеризующие динамику показателя: наклон индивидуальной регрессионной зависимости, время до достижения пика, площадь под кривой и т.п.

Пример 8.

Применение критериев множественного сравнения проиллюстрируем на примере результатов эксперимента из примера 1, относящихся к содержанию креатинфосфата в ткани сердца животных групп 1, 2 и 3 (столбцы 1–3 таблицы 11). Группу 1 будем считать контрольной и сравним полученные в этой группе результаты с результатами в группах 2 и 3 с помощью критерия Даннета. Прежде всего, вычислим для этих групп средние значения и дисперсии: $X_1 = 13,1$; $X_2 = 8,4$; $X_3 = 11,0$; $Dx_1 = 3,2$; $Dx_2 = 2,28$; $Dx_3 = 3,1$. Рассчитаем величины отклонений средних значений групп 2 и 3 от среднего значения контрольной группы 1, эти отклонения равны соответственно 4,7 и 2,1. Таким образом, сначала будем определять значения критерия Даннета для сравнения контрольной группы с группой 2, а затем, если статистически значимое различие будет установлено, с группой 3. Поскольку предполагается, что дисперсии сравниваемых групп одинаковы (критерий Фишера), величина внутригрупповой дисперсии $S_{вну}^2$ может быть определена как среднее арифметическое дисперсий сравниваемых групп. Тогда $S_{вну}^2$ оценивается как 2,86. Критерии Даннета для сравнения контрольной группы с группой 2 и 3 соответственно равны:

$$q' = \frac{13,1 - 8,4}{\sqrt{2,86 \left(\frac{1}{10} + \frac{1}{10} \right)}} = 6,21; \quad q' = \frac{13,1 - 11,0}{\sqrt{2,86 \left(\frac{1}{10} + \frac{1}{10} \right)}} = 2,78.$$

Число степеней свободы в данном случае равно $30 - 3 = 27$, уровень значимости выберем равным 5% , тогда по таблице 9 критическое значение равно 2,33. Вычисленные значения критерия превосшли критическое табличное, значит, различия между контрольной и двумя другими группами можно признать статистически значимыми на выбранном уровне значимости.

Критерий Стьюдента с поправкой Бонферрони. По-прежнему сравниваем 2-ю и 3-ю группы с контрольной 1-й. Для этих двух сравнений рассчитываем по формулам 7 и 9

значения критерия Стьюдента (аналогично примеру 4). Получаем значения $t=6,35$ для сравнения со второй группой и $t=2,65$ для сравнения с третьей. Однако в данном случае уровень значимости выбираем из расчета $0,05/2 = 0,025$, число степеней свободы равно $f=3 \times (10-1)=27$. Соответствующее значение в таблице распределения Стьюдента приблизительно равно 2,5 (для сравнения – без учета поправок оно было бы равно 2,05). Рассчитанные нами значения t -критерия превзошли *выбранное* критическое значение, а значит, нулевая гипотеза отвергается и различия признаются статистически значимыми на уровне значимости (для всего критерия) 5%. В данном случае мы не делаем заключения о различии групп 2 и 3 между собой.

Для сравнения этих трех групп применим непараметрический подход, для этого проанализируем эти же данные с помощью критерия Краскела–Уоллиса. Как и для критерия Уилкоксона–Манна–Уитни мы будем использовать ранги вариант в объединенной совокупности. Как и раньше одинаковым вариантам присваиваем средний ранг так, чтобы последнее значение ранга было равно объему объединенного ряда.

Группа 1: 12 13 14 15 14 13 13 10 11 16

Ранги 19,5 24 27,5 29 27,5 24 24 12,5 15,5 30 $R_1 = 233,5$

Группа 2 8 8 9 10 7 7 9 9 11 6

Ранги 5 5 9 12,5 2,5 2,5 9 9 15,5 1 $R_2 = 71$

Группа 3 8 9 9 11 12 12 13 13 12 11

Ранги 5 9 9 15,5 19,5 19,5 24 24 19,5 15,5 $R_3 = 160,5$.

Как и раньше сумма всех рангов должна быть равна $0,5 \times N \times (N+1)$, где N – объем обобщенного ряда. В нашем случае сумма рангов должна быть равна 465. Рассчитываем статистику Краскела–Уоллиса:

$$K = \frac{(233,5)^2}{10} + \frac{(71)^2}{10} + \frac{(160,5)^2}{10} - \frac{30(30+1)^2}{4} = 5452,2 + 504,1 + 2576,0 - 7207,5 = 1324,8.$$

Тестовая статистика $\frac{12}{30(30+1)} K = 17,1$; критическое значение критерия χ^2 для 2 степе-

ней свободы и уровня значимости 5% (таблица 2) равно 5,99. Поскольку вычисленное значение критерия превзошло соответствующее табличное на уровне значимости 5%, нулевая гипотеза отвергается и различия между всеми тремя группами признаются статистически значимыми.

8. Альтернативная форма учета реакций

Всестороннее изучение картины действия исследуемого лекарственного препарата требует выделения сопоставимых параметров. Эта задача решается, например, если из всей массы наблюдений использовать для статистического анализа только наблюдения за исходами в дихотомической форме, например, погибло животное или выжило. Так при изучении наркотических средств можно учитывать реакцию по тому, перешло или не перешло животное в «боковое положение»; при изучении противосудорожных средств – предотвращена или нет судорожная реакция и т.д. Все эти примеры иллюстрируют способ учета реакции в альтернативной форме, то есть реакции, которая или наступает, или нет. Альтернативное распределение – это распределение элементов совокупности на две части (две альтернативы) по какому-либо признаку, чаще всего по качественному. Эти признаки не связаны между собой никакими арифметическими соотношениями, упорядочить их невозможно. Единственный способ описания качественных признаков состоит в том, чтобы подсчитать число объектов, имеющих одно и то же значение или долю от общего числа объектов, которая приходится на то или иное значение. Надо сказать, что качественные переменные могут иметь число градаций больше двух, тогда для их анализа применяются статистические методы сравнения распределений.

В случае качественной классификации невозможно ввести такие количественные параметры, как математическое ожидание, дисперсия и др. Тем не менее можно указать

определенный численный параметр, имеющий вполне точный и объективный смысл: доля вариант одного типа. Так для альтернативного распределения доля

$$p = \frac{n_1}{n_1 + n_2} = \frac{n_1}{n}, \quad (21)$$

где n_1, n_2 – численности альтернатив; $N=n_1+n_2$ – численность всей совокупности. Кроме того, доля может быть выражена в процентах:

$$p = \frac{n_1}{n_1 + n_2} \times 100\% = \frac{n_1 \times 100}{n} \%. \quad (22)$$

В отношении доли вариант в альтернативном распределении возникают те же статистические задачи, что и для параметров, представленных в количественной форме:

– оценка доли p в генеральной совокупности по выборочным данным, нахождение доверительного интервала для p ;

– выявление различия между генеральными долями p_1 и p_2 двух совокупностей по выборочным данным, т.е. сравнение двух выборочных долей вариант.

Формулы (21–22) позволяют рассчитать выборочную оценку генеральной доли p . Поскольку в эксперименте участвует ограниченное количество животных, возникает вопрос об определении доверительного интервала для p . Строго эта задача решается с использованием биномиального распределения [4, 7, 12, 19, 21]. Соответствующие расчеты очень громоздки, поэтому составлены таблицы [12] и номограммы [19], в которых можно сразу найти 95 % и 99 %-ные доверительные границы для выборочной доли. Ввиду большого объема этих таблиц они обычно приводятся лишь в специальных справочниках. Поэтому на практике часто пользуются различными приближенными методами. Как правило, применяется нормальное приближение, то есть аппроксимация биномиального распределения нормальным. Из *центральной предельной теоремы* следует, что при достаточно большом объеме выборки выборочная оценка доли приблизительно подчиняется нормальному закону распределения, имеющему генеральное среднее и стандартное отклонение, равное стандартной ошибке доли σ_p .

При таком подходе доверительные границы для генеральной доли определяются как $p \pm z_\alpha \times \sigma_p$, где σ_p – стандартная ошибка доли, задается соотношением:

$$\sigma_p \approx \sqrt{\frac{p(1-p)}{n}}, \quad (23)$$

а z_α – определяется по значению доверительной вероятности по таблице 7 (обычно в случае доклинических исследований $P=95\%$ и соответствующее значение $Z=1,96$).

При малых объемах выборок нормальное приближение дает слишком неточные результаты. Условием применимости аппроксимации с помощью нормального распределения в данном случае является выполнение соотношения $n \times p < 5$. В случае невыполнения этого условия для исправления положения Р. Фишер предложил пользоваться *угловой трансформацией*, или, проще говоря, вспомогательной величиной j , связанной с p равенством:

$$\varphi = 2 \arcsin \sqrt{p}. \quad (24)$$

Эта величина имеет распределение, близкое к нормальному. Порядок действий предполагается следующий: для получения доверительных границ для доли вариант сначала

нужно найти значение j и вычислить интервал $\varphi \pm z_\alpha / \sqrt{n}$. Затем по формуле $p = \sin^2 \varphi / 2$

пересчитать полученные для j значения границ, вернувшись снова к значениям p . Конечно, переход от p к j и обратно с применением таблицы тригонометрических функций до-

статочно неудобен. Поэтому была составлена специальная таблица, которая непосредственно связывает значения p и j (таблица 6).

Еще одна задача возникает при анализе выборочных долей и требует внимания. При значениях p , близких к 0 или 1 (то есть при нулевом или 100 % эффекте) в случае малого объема выборки условия центральной предельной теоремы нарушаются, и при этом нужно несколько изменить процедуру построения доверительных интервалов.

8.1. Статистические оценки нулевого и 100 % эффекта

Очевидно, что любой признак, наблюдавшийся в 100 % случаев, у группы, состоящий из 10 вариантов, может в большой мере объясняться случайным совпадением и не воспроизводиться в дальнейшем при продолжении исследований. Тот же признак, наблюдаемый в 100 % случаев у группы, состоящей из 1000 вариантов, имеет гораздо большую достоверность. Поэтому даже в случае появления в исследовании 0 или 100 % долей, эти результаты должны быть скорректированы.

Для этого можно пользоваться следующим подходом: рассматривать возможный процент противоположного эффекта при дальнейшем увеличении числа подобных наблюдений и его стандартную ошибку:

$$p = \frac{a+1}{n+2} \times 100; \quad (25)$$

$$\sigma p = \sqrt{\frac{p(100-p)}{n+3}}, \quad (26)$$

где a — полученный в эксперименте обобщенный показатель (0 %), p — скорректированное значение этого показателя в %.

Доверительный интервал для скорректированного значения доли задается соотношением: $a \pm t \times \sigma p$, где t определяется по таблице 1 для выбранного уровня значимости и объема выборки.

Пример 9.

Лабораторным животным вводили гепатопротектор, и о его эффективности судили по действию гексенала (40 мг/кг), который вызывает у животных сон. Контрольная группа состояла из 36 животных, а получавшая гепатопротектор — из 25. Если животное перешло в состояние сна — будем обозначать такой исход как «ДА».

Таблица 14

Исходы	Сон		Всего
	да	нет	
Получавшая гепатопротектор группа (n_o)	9	16	25
Контрольная группа (n_k)	28	8	36
Всего	37	24	61

Таким образом, доля животных перешедших в состояние сна, например, в получавшей гепатопротектор группе, равна $p=9/25=0,36$ или 36 %. Ошибка выборочной доли в данном случае равна $\sigma p=0,096$ или 9,6 %. Соответствующий 95 % доверительный интервал для выборочной доли заключается между 0,17 и 0,55 или, другими словами, между 17 % и 55 %. Рассчитаем доверительный интервал для выборочной доли с учетом угловой трансформации. По таблице 6 находим для доли 0,36 значение $j=1,287$. Границы 95 % доверительного интервала задаются соотношением

$$\varphi \pm \frac{z_\alpha}{\sqrt{n}},$$

и в нашем случае получаем диапазон от 0,9 до 1,68 (значение $z_{\alpha} = 1,96$ определяем по таблице 7 для уровня значимости 5 %). Теперь по таблице 6 по рассчитанным граничным значениям j определяем значения p , соответствующие границам доверительного интервала, получаем диапазон от 0,19 до 0,55. И хотя этот интервал достаточно широк, он имеет практическое значение.

Проиллюстрируем ситуацию с возникновением в получавшей гепатопротектор группе так называемого нулевого эффекта. Допустим, что в таблице 14 в получавшей гепатопротектор группе ни одно животное из 25 не перешло в сон (0%).

$$\text{Тогда} \quad p = \frac{0+1}{25+2} \times 100 = 3,7; \quad \sigma p = \sqrt{\frac{3,7 \times 96,3}{25+3}} = 3,57.$$

95 % доверительный интервал для этой выборочной доли заключен между значениями $0 \% \div 0 + 2,06 \times 3,57 \%$ (так как доля не может иметь отрицательное значение) или можно записать, что доля животных в получавшей гепатопротектор группе, перешедших в сон, равна $0 \pm 3,57 (0 \div 7,35) \%$. Таким образом, несмотря на нулевой эффект в исследовании с использованием 25 животных, с вероятностью более 95 % можно утверждать, что при продолжении исследований доля животных, переходящих в сон, будет заключена в пределах от 0 % до 7,35 % случаев. При этом с вероятностью более 95 % можно сказать, что при продолжении исследований доля противоположных исходов будет не менее чем 92,65 % животных.

8.2. Оценка разности между долями

Поскольку выборочная доля аналогична выборочному среднему, задача оценки разности между долями решается аналогично задаче оценки разности между средними значениями. При этом также можно использовать различные параметрические и непараметрические методы сравнения.

Рассмотрим параметрический критерий Стьюдента для сравнения долей в двух параллельных группах. Рассчитываемая тестовая статистика t представляет собой отношение разности выборочных долей к стандартной ошибке разности выборочных долей:

$$t = \frac{p_1 - p_2}{\sigma dp}, \quad (27)$$

где p_1, p_2 — сравниваемые выборочные доли, σdp — стандартная ошибка разности выборочных долей.

Нулевая гипотеза в данном случае состоит в том, что $p_1 = p_2$. И ее отвергают, если рассчитанная статистика t превзойдет табличное значение, выбранное в соответствии с заданным уровнем значимости α и числом степеней свободы $f = n_1 + n_2 - 2$.

Ошибка разности между долями, взятыми из приблизительно равновеликих выборок (объем выборок отличается менее чем на 25%), вычисляется по формуле:

$$\sigma dp = \sqrt{\sigma p_1^2 + \sigma p_2^2} = \sqrt{\frac{p_1(1-p_1)}{n_1} + \frac{p_2(1-p_2)}{n_2}}. \quad (28)$$

В случае, когда сравнивают доли из неравновеликих выборок и при $75\% \geq p \geq 25\%$, ошибку разности долей определяют по формуле:

$$\sigma dp = \sqrt{p(1-p) \frac{(n_1 + n_2)}{n_1 \times n_2}}, \quad (29)$$

где p определяют как средневзвешенную из p_1 и p_2 долей:

$$p = \frac{p_1 \times n_1 + p_2 \times n_2}{n_1 + n_2}. \quad (30)$$

Если доли выражают в процентах от n , то в приведенных формулах вместо $1-p$ нужно брать $100-p$.

Описанный выше критерий проверки равенства долей в двух выборках применим при не слишком больших и не слишком малых значениях p ($25\% \leq p \leq 75\%$). Особенно это важно учитывать в случае малых выборок. Свободным от подобного рода ограничений и более универсальным оказывается способ проверки равенства долей, основанный на j -преобразовании Фишера. Для компенсации ошибок вводится специальная *поправка Йейтса*, называемая также *поправкой на непрерывность*, равная $1/(2 \times n)$. Эту поправку вычитают из большей и прибавляют к меньшей доле. Затем исправленные доли в % трансформируют с помощью таблицы 6. С учетом этой поправки величина критерия определяется формулой:

$$t = (\varphi_1 - \varphi_2) \sqrt{\frac{n_1 \times n_2}{n_1 + n_2}}, \quad (31)$$

φ — угловая трансформация частоты, задаваемая формулой (24).

Повторим, что условием для неприятия нулевой гипотезы служит превышение рассчитанным значением статистики t соответствующего табличного значения (таблица 1 критерия Стьюдента) для выбранного уровня значимости и числа степеней свободы $f = n_1 + n_2 - 2$.

8.3. Таблицы сопряженности: критерий Хи-квадрат

При проведении исследований для оценки значимости расхождения частот какого-либо явления в двух параллельных группах животных может быть использован непараметрический статистический метод, который носит название критерия χ^2 . Этот критерий может быть применен, например, при сравнении в эксперименте двух групп животных — получавших исследуемое вещество и контрольной; двух групп животных, получавших два различных сравниваемых по своей активности вещества; двух групп животных, получавших различные дозы изучаемого препарата или одну и ту же дозу различными путями введения и т.д. Для описания результатов такого эксперимента удобно применять *таблицы сопряженности*, в которой для каждой из групп указывается число животных с каждым из двух альтернативных значений признака. Таким образом, для двух рассматриваемых групп и для двух возможных исходов получается таблица размерности 2×2 .

Допустим, в результате проведения исследования было определено, что % погибших животных в получавшей исследуемое вещество группе ниже (или выше), чем в контрольной, но является ли это различие значимым? Для ответа на этот вопрос вычисляется величина статистики χ^2 , которая является показателем максимально возможных при данном уровне значимости отклонений частот.

Как обычно для анализа таблицы сопряженности выдвигается нулевая гипотеза: отсутствует влияние изучаемого препарата на исход эксперимента. Исходя из нулевой гипотезы, можно посчитать, какова была бы смертность в каждой из групп, если бы смертельные исходы по частоте равномерно распределились в обеих группах. Результаты эксперимента в двух группах объединяются, и определяется процент «хороших» и «плохих» исходов по суммарным результатам в двух группах. При этом рассчитываются *таблицы ожиданий*, то есть результаты, которые можно было бы ожидать в обеих группах, при правильности нулевой гипотезы и равномерности распределения частот различных исходов в обеих группах. На основании сопоставления таблиц сопряженности и таблиц ожидания составляется *таблица отклонений* наблюдавшихся частот pn от ожидаемых po . Для расчета величины χ^2 из абсолютной величины каждого отклонения вычитают 0,5 (поправка Йейтса), полученную разность возводят в квадрат и результат делят на соответствующее ожидание. Поправка применяется только для таблиц сопряженности 2×2 . Статистика χ^2 представляет собой сумму полученных величин.

$$\chi^2 = \sum \frac{pn - po \left(-\frac{1}{2} \right)^2}{po}. \quad (32)$$

Вычисленное значение χ^2 сопоставляют с табличными значениями (таблица 2) для разных уровней вероятности. Для таблиц сопряженности 2x2 (число степеней свободы равно 1) критические значения для χ^2 равно 3,84 (для $a=0,05$) и 6,63 (для $a=0,01$). Нулевая гипотеза отвергается, если вычисленное значение превосходит табличное при данном уровне значимости.

Следует подчеркнуть, что в таком виде данный критерий может быть использован только при сопоставлении данных, представленных в альтернативной форме. Кроме того, правомерность его применения ограничивается в соответствии с *условием Кокрена*. Рекомендация Кокрена для таблиц 2x2 состоит в следующем: если сумма четырех частот меньше 20, следует использовать точный критерий Фишера. Если сумма между 20 и 40 и наименьшая ожидаемая частота меньше 5, то следует использовать точный критерий Фишера. Если сумма равна 40 и более, то можно применять критерий χ^2 с поправкой на непрерывность [19].

Критерий Хи-квадрат может применяться к таблице сопряженности произвольной размерности (для множественных сравнений независимых групп при альтернативном распределении или в случае сравнения качественного признака с числом градаций больше 2) в случае, если все ожидаемые числа не меньше 1 и доля клеток с ожидаемыми числами меньше 5 не превышает 20 %. Подробнее об этом в [7, 13, 17–19, 21].

8.4. Точный критерий Фишера

Когда число наблюдений невелико и в таблицах ожиданий встречаются клетки со значениями, меньшими 5, критерий χ^2 не применим. В этом случае используют другой непараметрический критерий — *точный критерий Фишера*. Он основан на переборе всех возможных вариантов заполнения таблицы сопряженности при данной численности групп, поэтому чем она меньше, тем проще его применять. Критерий Фишера позволяет получать точные значения вероятности событий, столь же или еще менее вероятных, чем те, которые наблюдались в действительности. Подробнее с этим методом можно познакомиться, например, в книгах [4, 7, 17–19].

Нулевая гипотеза состоит в том, что между воздействием препарата и исходом нет никакой связи, а значит, показатели получавшей препарат и контрольной групп совпадают. Тогда вероятность P_f получить некоторую таблицу 2x2 вида:

$$\begin{array}{ccc|c} n_{11} & n_{12} & & n_{1.} \\ n_{21} & n_{22} & & n_{2.} \\ \hline n_{.1} & n_{.2} & & N \end{array}$$

равна

$$P_f = \frac{n_{1.}!n_{.1}!n_{2.}!n_{.2}!}{n_{11}!n_{12}!n_{21}!n_{22}!N!}, \quad (33)$$

где $n_{1.}$ и $n_{2.}$ — суммы по строкам (число животных в получавшей препарат и контрольной группах), $n_{.1}$ и $n_{.2}$ — суммы по столбцам (число животных с первым и вторым исходом в обеих группах), N — общее число наблюдений, ! обозначает факториал ($n! = 1 \times 2 \times \dots \times (n-1) \times n$; $0! = 1$). Построив все остальные варианты заполнения таблицы, возможные при данных суммах по строкам и столбцам, по этой же формуле рассчитывают их вероятность. Вероятности, которые не превосходят вероятность исходной таблицы (включая саму эту вероятность), суммируют. Надо заметить, что числитель данной формулы и величина $N!$ зависят только от величин сумм по строкам и столбцам, которые остаются постоянными при изменении варианта заполнения таблицы, поэтому их значения можно не пересчитывать каждый раз. Другой способ уменьшить объем вычислений: выписать в числителе и знаменателе вместо факториалов соответствующие им произведения натуральных чисел, а затем произвести очевидные сокращения сомножителей.

Таким образом, алгоритм точного критерия Фишера может быть сформулирован следующим образом:

- по полученной в эксперименте таблице сопряженности вычислить вероятность получить эту таблицу;
- рассмотреть все остальные возможные варианты заполнения таблицы при неизменных суммах по строкам и столбцам (для этого в одной из клеток надо поставить все числа от нуля до максимально возможного, пересчитывая числа в остальных клетках так, чтобы суммы по строкам и столбцам сохранялись);
- вычислить вероятность для всех полученных таблиц;
- просуммировать вероятность получить исходную таблицу и все вероятности, которые ее не превышают.

Вычисленное значение Pf соответствует p -значению, обсуждавшемуся в разделе о проверки гипотез. А значит, данная гипотеза отвергается на заданном уровне значимости α при значении $Pf < \alpha$. Необходимо обратить внимание на то, что предложенный в некоторых книгах по биометрии вариант данного критерия, учитывающий лишь вероятность получения исходной таблицы, дает заниженное значение Pf . А это, в свою очередь, приводит к тому, что делается вывод о наличии значимых различий в то время, когда их на самом деле нет. Кроме того, надо предупредить, что в различных учебниках и справочниках предложены различные модификации данного критерия [4, 7, 17, 19, 21].

Для примера рассмотрим таблицу сопряженности 2×2 вида.

Исходы	Да	Нет	Всего
Группа животных, получавшая исследуемое вещество (n_o)	1	6	7
Контрольная группа (n_k)	5	8	13
Всего	6	14	20

Так как некоторые значения в клетках таблицы меньше 5, пользоваться критерием χ^2 невозможно. Для точного критерия Фишера существует односторонний и двусторонний варианты критерия. Рассмотрим односторонний вариант критерия. Рассчитаем вероятность при тех же значениях сумм по строкам и столбцам получить такой же набор чисел в клетках, что и в исходной таблице:

$$Pf = \frac{7!13!6!14!}{20!1!6!5!8!} = 0,23.$$

Возьмем наименьшее из чисел в клетках, это единица на пересечении первой строки и первого столбца. Уменьшим это значение на 1, числа в остальных клетках изменим так, чтобы суммы по строкам и столбцам сохранялись. Получим таблицу следующего вида.

Исходы	Да	Нет	Всего
Группа животных, получавшая исследуемое вещество (n_o)	0	7	7
Контрольная группа (n_k)	6	7	13
Всего	6	14	20

Для этой таблицы вероятность заполнения равна:

$$Pf = \frac{7!13!6!14!}{20!0!7!6!7!} = 0,044.$$

Наименьшее из чисел в таблице равно нулю, продолжать процесс уменьшения невозможно. Таким образом, односторонний вариант критерия дает значение вероятности $Pf = 0,23 + 0,044 = 0,274$. Мы получили точное значение вероятности событий, столь же или менее вероятных, чем те, которые в действительности наблюдались. Рассчитанное зна-

чение вероятности достаточно высокое (если принять $a=0,05$), данные следует считать согласующимися с нулевой гипотезой, согласно которой распределения двух совокупностей одинаковы.

Чтобы воспользоваться двусторонним вариантом критерия, нужно было бы перебрать все остальные варианты заполнения таблицы при сохранении неизменными сумм по строкам и столбцам. В нашем случае, например, надо было бы увеличивать элемент на пересечении первой строки и первого столбца, пересчитывая все остальные клетки таблицы, пока какой-либо другой элемент таблицы не обратится в 0. При этом появляются еще **5 вариантов** (кроме двух, показанных выше) заполнения таблицы, из которых только 3 дают вероятность заполнения соответствующей таблицы, меньше вероятности заполнения исходной таблицы. Суммарная вероятность в данном случае $Pf=0,35$. Таким образом, сделанный с помощью одностороннего критерия статистический вывод подтверждается.

Пример 10.

Сравним результаты в получавшей исследуемое вещество и контрольной группе из примера 9. Данные примера 9 представлены в альтернативной форме, и мы можем рассчитать соответствующие значения долей. Таблица 14 называется таблицей сопряженности 2×2 .

Попробуем использовать критерий Стьюдента для проверки разности между выборочными долями 0,36 и 0,78 получавшей исследуемое вещество и контрольной групп (неравновеликие параллельные группы из таблицы 14). Определим средневзвешенную долю $p=(9+28)/(25+36) = 0,61$. Ошибка выборочной доли равна $\sigma p=0,13$ (по формуле 29). Значение критерия $t=(0,36-0,78)/0,13 = -3,23$. По таблицам критерия Стьюдента для числа степеней свободы $f=61-2=59$ и уровня значимости 5 % определяем критическое значение, равное 2,001. Нулевая гипотеза о равенстве долей отвергается, так как рассчитанная нами статистика по модулю превосходит критическое табличное значение ($p<0,05$).

Применим поправку на непрерывность (угловая трансформация). Для значений долей 0,36 и 0,78 определим соответствующие значения j ($j_1=1,287$; $j_2=2,165$). Разность между значениями j_1, j_2 равна $-0,878$; значение критерия t в этом случае будет $-3,37$ (формула 31). Оно также по модулю превышает соответствующее табличное значение для 5% уровня значимости, а значит, нулевая гипотеза может быть отвергнута ($p<0,05$).

Проверим полученные выводы с помощью критерий χ^2 для таблиц сопряженности. Всего в получавшей исследуемое вещество и контрольной группе (таблица 14, объем двух групп $N=61$) в состоянии сна перешло 37 животных или 61%. Если бы гепатопротектор не оказывал влияния, животные переходили бы в состояние сна с равной частотой в обеих группах. Рассчитав, сколько составляет 61% от 25 и 36 животных в разных группах, определим ожидаемые доли при справедливости нулевой гипотезы. Ожидаемая таблица сопряженности будет иметь вид:

Таблица 15

Исходы	Сон		Всего
	да	нет	
Группа животных, получавшая исследуемое вещество (n_o)	15,25	9,75	25
Контрольная группа (n_k)	21,96	14,04	36
Всего	37,21	23,79	61

Для каждой из четырех клеток исходов найдем разницы между наблюдаемыми и ожидаемыми значениями (разницу между соответствующими значениями в таблицах 14 и 15). По формуле 32 рассчитаем величину статистики $\chi^2=9,14$ (с учетом поправки). Табличное значение критерия (таблица 2), соответствующее одной степени свободы и

уровню значимости 5 % , равно 3,84. Рассчитанное нами значение тестовой статистики превзошло критическое табличное, поэтому с вероятностью более 95 % мы отклоняем нулевую гипотезу об отсутствии влияния гепатопротектора. Результаты согласуются с полученными ранее с помощью критерия Стьюдента.

Задача сравнения результатов в случае связанных пар наблюдений для альтернативного распределения решается с помощью критерия Мак-Нимара [4, 17, 18], множественные сравнения повторных дихотомических измерений выполняются с помощью критерия Кокрена [4, 17, 18].

9. Построение доверительного интервала для значений измеряемого признака

Все рассмотренные выше процедуры позволяли строить доверительные интервалы для различных параметров распределения: средних значений или долей. Однако часто возникает необходимость построить доверительный интервал для самих значений измеряемого признака. Например, наиболее известная задача: оценить диапазон, в который попадают 95% всех значений совокупности. Если речь идет о нормальном распределении и объем выборки достаточно большой, этот диапазон задается выборочным средним, плюс-минус два стандартных отклонения. Правило же трех сигм (выборочное среднее плюс-минус три стандартных отклонения) задает интервал, в который попадают практически все значения совокупности. В случае малых выборок для решения этой задачи надо брать более широкий диапазон, границы которого задаются соотношением $\bar{X} \pm Ka \times Sx$, где \bar{X} – выборочное среднее, Sx – выборочное стандартное (или среднее квадратичное) отклонение, Ka – коэффициент, который зависит от доли членов совокупности, которые должны попасть в интервал, от выбранной вероятности, что они туда действительно попадут $1-a$, и от объема выборки № Таблицу для значений коэффициента Ka можно найти, например, в [12], а графики для Ka представлены в [4]. Так для вычисления 95 % доверительного интервала ($a=0,05$), в который должно попадать 90 % членов совокупности, по выборке объемом 10–20 значение Ka равно 2,3–2,8. А 95 % интервал по выборке того же объема, в который должны попадать 99 % членов совокупности, определяется значениями Ka , равными 3,7–4,4. Если несколько увеличить объем выборки $n=20-30$, то для 95 % доверительного интервала ($a=0,05$), в который должно попадать 90 % членов совокупности Ka равно 2,14–2,3. А 95 % интервал по выборке того же объема, в который должны попасть 99 % членов совокупности, определяется значениями Ka , равными 3,4–3,7. Видно, что с ростом объема выборки значения коэффициентов убывают и в пределе (при бесконечно больших значениях n) стремятся к критическим значениям для стандартного нормального распределения.

При расчете доверительных интервалов для значений признака нужно обратить внимание, что в расчетную формулу входит именно выборочная дисперсия, а не стандартная ошибка среднего арифметического. Ошибочная подстановка в формулу стандартной ошибки среднего приводит к построению другого интервала, а именно интервала, в который с вероятностью 95 % попадет генеральное среднее совокупности.

10. Анализ корреляций

Одним из важных разделов статистики является *корреляционный анализ*. Понятие *корреляции* отражает главным образом степень выраженности линейной связи между вариационными рядами. Наглядно эта связь может быть отражена графически. На координатной плоскости по оси абсцисс откладывают значения одного вариационного ряда, а по оси ординат – другого. Совокупность таких точек на координатной плоскости (их число равно числу наблюдений) создает общую картину корреляции и обычно позволяет построить некоторую усредненную кривую (чаще – прямую) взаимозависимости параметров, составляющих оба вариационных ряда. В данном случае эти два вариационных ряда для нас равноправны в причинном смысле. Характеристикой тесноты связи между

двумя случайными величинами X_1 и X_2 , имеющими нормальное распределение, является коэффициент корреляции Пирсона:

$$r = \frac{\sum_{i=1}^n (X_{1i} - \bar{X}_1) \times (X_{2i} - \bar{X}_2)}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_{1i} - \bar{X}_1)^2 \times (X_{2i} - \bar{X}_2)^2}}, \quad (34)$$

где X_{1i} и X_{2i} — соответствующие значения параметра в i наблюдении, \bar{X}_1 , \bar{X}_2 — средние значения рядов, состоящих из n наблюдений. Вычисленный коэффициент корреляции является выборочной оценкой генерального коэффициента корреляции совокупности, а значит, как и любая случайная величина, имеет ошибку sr . Отношение выборочного коэффициента корреляции к своей ошибке является критерием для проверки нулевой гипотезы о равенстве нулю генерального коэффициента корреляции совокупности (или соответственно о независимости случайных величин X_1 и X_2):

$$tr = r \times \sqrt{\frac{n-2}{1-r^2}}. \quad (35)$$

Число степеней свободы для проверки критерия равно $f=n-2$, гипотезу проверяют по таблицам распределения Стьюдента (таблица 1) в соответствии с выбранным уровнем значимости. Если вычисленное значение превзойдет или окажется равным соответствующему табличному, нулевую гипотезу отвергают.

Существуют и другие формулы для вычисления коэффициента корреляции, а также эти формулы могут уточняться по отношению к большим и малым выборкам [7, 9, 13, 18–20]. Так, было установлено, что при выборках малых объемов ($n < 30$) расчет коэффициента по этим формулам дает заниженные оценки соответствующего генерального параметра. Для корректировки можно применять, например, z-преобразование Фишера:

$$z = \frac{1}{2} \ln \frac{1+r}{1-r}. \quad (36)$$

Значения z принимают свои значения в интервале от плюс до минус бесконечности, распределение этой величины приближенно нормальное. Тогда критерием достоверности является показатель:

$$tz = z \times \sqrt{n-3}. \quad (37)$$

По таблице распределения Стьюдента (таблица 1) для выбранного a и числа степеней свободы $f=n-2$ проверяют нулевую гипотезу о том, что в генеральной совокупности этот параметр равен 0. Гипотезу отвергают на выбранном уровне значимости, если tz превзойдет соответствующее табличное значение.

Однако независимо от способа вычисления коэффициент корреляции обладает определенными свойствами. Величина коэффициента корреляции всегда заключена в пределах $-1 \leq r \leq 1$. Если $r < 0$, то это означает, что с увеличением в вариационном ряду наблюдаемых величин X_1 соответствующие им значения X_2 второго вариационного ряда в среднем уменьшаются. Если $r > 0$, то с увеличением одного параметра другой параметр также в среднем возрастает. Если $r = 0$, то это означает, что параметры X_1 и X_2 абсолютно независимы. При $r = 1$ между параметрами существует прямо пропорциональная функциональная зависимость (в медико-биологических исследованиях крайне редкий случай). Чем больше абсолютная величина коэффициента корреляции, тем при данном объеме выборки, больше достоверная вероятность того, что характер связи действительно соответствует полученному коэффициенту корреляции.

В медико-биологических приложениях часто встречаются случаи, когда характеристики взаимосвязанных структур оцениваются лишь качественно. При этом приходится оперировать так называемыми ранговыми коэффициентами корреляции [6, 7, 9, 18–20]. Кроме того, такой непараметрический подход применяется в случае малых выборок. Так, например, коэффициент корреляции рангов, предложенный К. Спирменом, вычисляется по формуле:

$$rs = 1 - \frac{6 \times \sum_{i=1}^n di^2}{n(n^2 - 1)}, \quad (38)$$

di — разность между рангами сопряженных признаков в обобщенном ряду, n — число парных членов ряда. При полной связи ранги признаков (при расстановке их в обобщенном ряду) совпадут, и разность между ними будет равна 0, соответственно, коэффициент корреляции будет равен 1. Если же признаки варьируются независимо, коэффициент корреляции получится равным 0.

Аналогично коэффициент корреляции рангов является оценкой соответствующего генерального параметра, его значимость оценивается с помощью статистики:

$$rst = \frac{z_\alpha}{\sqrt{n-1}} \left(1 - \frac{m}{n-1}\right), \quad (39)$$

где z_α и m связаны соотношениями с уровнем значимости: для $\alpha=5\%$ $Z=1,96$ и $m=0,16$; для $\alpha=1\%$ $Z=2,58$, $m=0,69$. Нулевую гипотезу об отсутствии корреляции (коэффициент корреляции равен нулю) отвергают, если полученное значение rs превзойдет или окажется равным рассчитанному критическому значению rst .

В биометрии, кроме того, известны задачи, в которых требуется оценить зависимость некоторого признака Z сразу от нескольких других признаков: x_1, x_2, \dots, x_m . Эти задачи решаются методами многомерного регрессионного анализа [7, 9, 13, 18, 19].

Важно понимать, что коэффициент корреляции Пирсона (а именно он подразумевается, когда говорят «коэффициент корреляции») удовлетворительно характеризует лишь *связи, не слишком отклоняющиеся от прямолинейных (линейная зависимость)*. Первоначально оценить к какому типу относится данная связь: прямолинейному или криволинейному можно, построив *эмпирическую линию регрессии*. Более точно допустима степень отклонения связи от прямолинейной определяется при помощи критериев криволинейности. Если изучаемая связь является криволинейной, силу такой связи можно оценивать с помощью корреляционных отношений дисперсий или методами дисперсионного анализа. Подробнее с соответствующими формулами можно познакомиться в справочниках или книгах [7, 9, 19].

Мы хотим обратить внимание читателей на принципиальные ошибки, которые достаточно часто возникают при оценке корреляционных зависимостей. Одна из наиболее распространенных ошибок — отсутствие проверки статистической значимости рассчитанного коэффициента корреляции. Часто имеющихся объемов выборок недостаточно для получения статистически значимого выборочного коэффициента корреляции. Если соответствующий критерий показал отсутствие значимости оцененного коэффициента корреляции, можно для полученного значения r оценить объем выборки n , достаточный для окончательного решения вопроса о статистической значимости выборочного коэффициента корреляции (то есть для опровержения нулевой гипотезы об отсутствии корреляции, если корреляция действительно существует):

$$n = \frac{z_\alpha^2}{z^2} + 3, \quad (40)$$

где величина z_α задается по принятому уровню значимости (предельные точки распределения Стьюдента — таблица 1), а z — преобразование рассчитанного коэффициента корреляции r (формула 36).

Однако при обнаружении статистически достоверной корреляции между явлениями часто возникает другая ошибка — желание связать их непосредственной причинной связью. Неверная логическая цепочка выводов при этом приводит к ошибочному заключению: раз явления А и В находятся в тесной корреляционной связи и явление В возникает во времени позднее А, следовательно А является причиной В. Однако явления А и В могут быть не только не связаны друг с другом причинно-следственной связью, но и не иметь единой первопричины.

Пример 11.

Изучали зависимость между содержанием креатинфосфата в ткани сердца и уровнем концентрации молочной кислоты в крови лабораторных животных (пример 1, 2-й и 7-й столбец таблицы 11). Прежде всего, построили линию регрессии для изучаемых параметров и убедились, что данная зависимость хорошо аппроксимируется прямой, то есть связь является линейной (рисунок 4). Для оценки тесноты такой связи рассчитаем коэффициент корреляции (параметрический). Так, значение коэффициента корреляции, оцененного по формуле 34, равно $r = -0,91$. Знак минус означает, что большим значениям одного признака соответствуют меньшие значения другого. Оценим значимость рассчитанного коэффициента корреляции, значение статистики $tr = -6,17$. Проверяем данную статистику по таблицам распределения Стьюдента (таблица 1) для числа степеней свободы $f = 10 - 2 = 8$ и уровня значимости 5 %. Рассчитанное значение статистики ($tr = -6,17$) по модулю превосходит соответствующее табличное значение (2,31). Таким образом, нулевую гипотезу отвергают на уровне значимости 5 %, и рассчитанный коэффициент корреляции признается статистически значимым. Проверим нулевую гипотезу в отношении z преобразованного коэффициента корреляции. Преобразование Фишера для рассчитанного коэффициента корреляции $z = -1,53$; соответствующее значение статистики $tz = -4,05$. Это рассчитанное значение по модулю превосходит соответствующее табличное 2,31 (таблица 1, $f = 8, a = 0,05$). А значит, вывод о статистической значимости коэффициента корреляции подтверждается.

Оценим для нашего примера коэффициент корреляции рангов. Если бы отдельные варианты ряда не повторялись, их рангами были бы натуральные числа от 1 в порядке возрастания. Но одинаковым значениям вариант присваиваются ранги, равные средним арифметическим их рангов. Величина d_i представляет собой попарные разности рангов изучаемых выборок. В качестве правила для проверки правильности ранжирования используют равенство 0 суммы d_i .

Таблица 16

Параметр X1	Параметр X2	Ранг RX1	Ранг RX2	$d_i = RX1 - RX2$	d_i^2
8	4	4,5	5	-0,5	0,25
8	5	4,5	8,5	-4,0	16,0
9	4	7	5	2,0	4,0
10	3,5	9	2,5	6,5	42,25
7	5	2,5	8,5	-6,0	36,0
7	5	2,5	8,5	-6,0	36,0
9	3,5	7	2,5	4,5	20,25
9	4	7	5	2,0	4,0
11	2	10	1	9	81,0
6	5	1	8,5	-7,5	56,25

(По данным таблицы 11 из примера 1).

Сумма d_i^2 равна 296, по формуле 38 для $n=10$ получаем ранговый коэффициент корреляции $rs=-0,82$. Критическая точка, рассчитанная по формуле 39 для уровня значимости 5% ($z_\alpha = 1,96$; $m=0,16$) равна 0,64. Так как значение рангового коэффициента корреляции по модулю превосходит соответствующее критическое значение, с вероятностью более 95% можно утверждать, что между сравниваемыми параметрами существует отрицательная корреляционная связь.

11. Задачи статистической обработки кривых «доза–эффект»

Для изучения влияния различных доз препарата в доклинических исследованиях обычно используется альтернативный способ описания данных эксперимента. При этом, как правило, исследование планируют так, чтобы дозы принимали определенные значения из изучаемого диапазона, такие значения дозы являются аргументом функции «доза–эффект». Значения такой функции, или «ответы» при альтернативном способе могут принимать лишь два противоположных значения — наличие или отсутствие эффекта (гибель, судороги, изменение положения, появление определенных симптомов и т.д.). Доля p тест-объектов, дающих положительный ответ, рассматривается как оценка вероятности реагирования при данной дозе. Эта доля может изучаться методами, описанными выше: построение доверительного интервала для доли, выяснение значимости различий долей для сравниваемых групп и т.д. Однако исследователя может интересовать связь между вероятностью реагирования p и интенсивностью воздействия (доза D). Обычно доля p возрастает с увеличением D , принимая значения от 0 до 1. Данная зависимость называется *кривой эффекта* или *кривой «доза–эффект»* и изображается несимметричной S-образной кривой (рисунок 5). Эта кривая может быть построена и в логарифмических координатах $\lg(D)-p$.

Анализ кривой «доза–эффект» заключается в оценке с ее помощью обобщенных численных характеристик, отражающих наиболее существенные стороны изучаемого явления. Одной из таких характеристик может служить доза, вызывающая эффект у 50% тест-объектов. Ее называют *50%-ной эффективной дозой* и обозначают $ЭД_{50}$. Для некоторых лекарственных препаратов может употребляться показатель *50%-ная летальная доза* $ЛД_{50}$. Показателем широты фармакологического действия является индекс, равный отношению $ЛД_{50}$ к $ЭД_{50}$, подробнее об этом в [2]. Существует достаточно много методов оценки $ЭД_{50}$ (метод Рида и Менча, метод Кербера, метод Беренса, формула Г.Н. Першина, графические методы пробит-анализа и другие), каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки. Детальное изложение этих методов содержится в [2, 21]. Мы остановимся лишь на некоторых из них. Надо обратить внимание, что независимо от выбранного метода расчета величина $ЭД_{50}$ оценивается по выборочным данным, поэтому для нее необходимо строить доверительные интервалы.

Метод Рида и Менча — один из наиболее простых и часто используемых методов определения $ЭД_{50}$, однако условием его применения является изучение равноотстоящих доз в серии исследований и одинаковой численности тест-объектов для каждой дозы. Метод Кербера, например, свободен от этих недостатков, но имеет свои ограничения. Точность этого метода снижается из-за ошибок при вычислении площадей методом трапеций и из-за неточного экспериментального определения значения дозы, при которой приближенно достигается 100% положительный результат.

От указанных ограничений и недостатков можно избавиться, если допустить, что кривая «доза–эффект» генеральной совокупности после логарифмического преобразования координат приближенно описывается нормальным законом распределения. Это предположение и лежит в основе так называемого *пробит-метода*. Тогда доли p положительных ответов можно приравнять к накопленным частотам z нормального распределения, которые задаются соотношением:

$$z = \Phi \left(\frac{x - M}{\sigma} \right), \quad (41)$$

где Φ — интеграл вероятностей, M и s — параметры нормального распределения.

В дальнейшем при описании данного метода будем обозначать буквой l величину $\lg(D)$ и для простоты называть ее дозой, тогда l_{50} — доза, при которой половина тест-объектов дают положительный ответ. Эта величина и позволяет в дальнейшем оценить искомое значение $\mathcal{E}D_{50}$.

Заменяя в этой формуле z на p , x на l , и M на l_{50} , получаем:

$$p = \Phi\left(\frac{l - l_{50}}{\sigma}\right). \quad (42)$$

Нам нужно получить зависимость доли p от дозы l , для этого будем строить график, откладывая по оси ординат вместо значений p значения

$$y' = Y(p), \quad (43)$$

где Y — функция, обратная интегралу вероятностей F , то есть $p = F(y')$, ее значения определяются по специальным таблицам [12, 13, 19]. Таким образом

$$y' = \frac{l - l_{50}}{\sigma} = \frac{1}{\sigma} \times l - \frac{l_{50}}{\sigma}, \quad (44)$$

то есть получаем уравнение прямой линии. Значит, если откладывать по оси абсцисс значения l , а по оси ординат — значения $y' = Y(p)$, то точки будут представлять прямую линию с углом наклона $1/s$. При значениях $p < 0,5$ соответствующие значения y' будут меньше нуля. Для исправления этой ситуации производится корректировка значений y' :

$$y = Y(p) + 5. \quad (45)$$

Получаемые значения y и называют *пробитами*. Обратим внимание, что значения пробитов для $p=0$ и $p=1$ нельзя найти по такой формуле. На практике часто применяют замену $p=0$ на $p = 1/5m$, а $p=1$ на $p = 1 - 1/5m$.

Поскольку в доклинических исследованиях численность тест-объектов в группах невелика, удобно пользоваться специальной таблицей, в которой пробит для данного исследования находится непосредственно по общему числу тест-объектов в исследовании и числу положительных ответов (таблица 8), и уйти от использования таблиц интеграла вероятностей.

Значение l_{50} задается абсциссой точки, ордината которой равна 5 (соответствует $p=0,5$). Приблизительно эту точку можно найти графически, проведя через нанесенные на график экспериментальные точки наилучшим образом описывающую их прямую. Известны более сложные методы определения значения l_{50} , и они очень подробно разобраны, например, в [2].

Известны также различные методы оценки стандартной ошибки l_{50} , так достаточно точной считается формула:

$$\sigma l_{50} = \frac{\sigma}{\sqrt{n'/2}}, \quad (46)$$

где n' — число тест-объектов, для которых значения пробитов находятся в пределах от 3,5 до 6,5. Величина σ задается выражением и оценивается по построенному графику:

$$\sigma = 1/2 \times (l(y=6) - l(y=4)). \quad (47)$$

Известны методы оптимизации, позволяющие достаточно точно построить распределение вероятности того, что случайно отобранное из совокупности животное дает положительную реакцию на данную дозу. Например, оценив с помощью метода макси-

мального правдоподобия параметры такого распределения, можно рассчитывать дозы, необходимые для получения любого заданного значения отклика [19].

Среди упрощенных методов, позволяющих осуществлять графический пробит-анализ при необходимости даже на обычной миллиметровой бумаге без использования логарифмически-пробитной сетки, широкое распространение получил *метод Литчфилда и Уилкоксона*. Этот метод и его модификация З. Ротом детально изложены в [2], там же даны необходимые для расчетов номограммы и разобраны приемы вычислений. Мы лишь коротко рассмотрим основные принципы метода.

На первом этапе для каждой испытанной дозы заполняют соответствующую строку рабочей таблицы для последующей проверки критерия s^2 . Структура рабочей таблицы такова [2]:

Таблица 17

Дозы, мг/кг	Наблю- давшийся эффект	Наблю- давшийся эффект в %	Ожидаемый эффект в %	Разность между ожидае- мым и наблюдавшимся эффектом в %	Слагаемые для s^2
1	2	3	4	5	6

Если в исследовании несколько доз не вызвали эффекта ни у одного животного или, наоборот, вызвали эффект у всех животных в группе, то в таблицу вносят не более чем две такие дозы. Однако в исследовании доходить до таких доз не обязательно.

На втором этапе на логарифмически-пробитную сетку наносят точки, используя данные 1–3 столбцов таблицы, при этом точки с 0 и 100 % эффектом не наносятся. С помощью прозрачной линейки нанесенные точки соединяются прямой линией. На третьем этапе по проведенной кривой оценивают % эффекта, соответствующего каждой из испытанных доз, получаются ожидаемые эффекты для столбца 4 таблицы. В таблицу не вносят ожидаемые эффекты, если они меньше 0,01 или больше 99,9 %. Эффекты для неэффективных доз или доз со 100 % эффектом корректируются с помощью специальных таблиц [2], а исправленные значения вносят в 3 колонку таблицы и на построенный график.

Далее проверяют, соответствует ли проведенная прямая новым точкам. В случае несоответствия прямая проводится заново. После этого пересчитывают и ожидаемые, и исправленные значения.

Четвертый этап начинается после того, как вы убедитесь зрительно, что точки на графике достаточно хорошо описываются проводимой прямой. Математически это соответствие проверяется по критерию s^2 по формуле, аналогичной формуле (32). Однако в данном случае величина критерия рассчитывается как сумма (по всем занесенным в таблицу 17 строкам) квадрата разности % ожидаемого и наблюдаемого эффектов (квадрат значения из столбца 5), деленного на произведение ожидаемого эффекта (столбец 4) и эффекта, обратного ожидаемому (100 % минус значение из столбца 4). Без дополнительных вычислений слагаемые для требуемой тестовой статистики могут быть оценены с помощью специальных номограмм [2]. Тогда величиной статистики критерия s^2 будет сумма этих слагаемых для каждой дозы, умноженная на среднее число животных в группе. Число степеней свободы для проверки данной гипотезы равно количеству доз на графике минус 2, обычно уровень значимости принимается равным 5 %. Статистику проверяют по таблицам распределения s^2 (таблица 2). Проведенная прямая соответствует данным эксперимента, если рассчитанное значение меньше табличного. В противном случае прямую пытаются провести иначе. Если такие попытки не приводят к лучшей аппроксимации, формулы для дальнейших расчетов будут несколько отличаться [2].

Если же прямая достаточно хорошо описывает данные, следующий этап связан с определением $ЭД_{50}$ и ее доверительных границ. Для этого из графика находят дозы,

ожидаемый эффект которых равен 16, 50 и 84 %. Буквой p обозначим общее количество животных, которые участвовали в испытании доз, давших ожидаемый эффект в диапазоне 16–84% (соответственно величина пробитов в диапазоне 4–6). Далее вычисляется величина S :

$$S = 0,5 \times (\text{ЭД}_{84} / \text{ЭД}_{50} + \text{ЭД}_{50} / \text{ЭД}_{16}) \quad (48)$$

и величина фактора $f\text{ЭД}_{50}$ (также может быть определена по номограмме [2]):

$$f\text{ЭД}_{50} = S^{2,77\sqrt{n}}. \quad (49)$$

95 % доверительные границы для величины ЭД_{50} вычисляются так: нижняя граница задается соотношением $\text{ЭД}_{50} / f\text{ЭД}_{50}$, а верхняя — соотношением $\text{ЭД}_{50} \times f\text{ЭД}_{50}$.

Данный метод отличается не только простотой вычисления, он хорош еще и тем, что позволяет вычислять величины не только ЭД_{50} , но и ЭД любой частоты наступления эффекта [2]. Кроме того, интересны методы сравнительной оценки фармакологической активности двух соединений, результаты которых были обработаны по методу Литчфилда и Уилкоксона. Для такого сравнения обычно используют параметры ЭД_{50} , $f\text{ЭД}_{50}$, S и т.п. Эти методы также представлены в [2] наряду с методами расчета *среднего эффективного времени*, требуемого для наступления определенного фармакологического эффекта. В той же работе проанализированы особенности обработки данных с помощью обычной миллиметровой сетки, что обычно не приводит к снижению точности метода.

12. Кривая выживаемости

Специальные статистические методы анализа результатов воздействия используют понятие *выживаемости* и представление данных в виде *таблиц* и *кривых выживаемости* [4, 5, 25].

Выживаемость $S(t)$ — это вероятность прожить более t с момента начала наблюдения. А *кривая выживаемости* отражает вероятность пережить любой из моментов времени t после некоторого начального события. Надо сказать, что подход и математический аппарат, которые относятся к анализу выживаемости, могут успешно применяться для анализа других показателей эффекта, например, продолжительности до появления опухоли или метастазов и т.д. Но для простоты изложения в дальнейшем мы будем говорить только в терминах выживаемости и продолжительности жизни. Типичная кривая выживаемости представлена на рисунке 6. В начальный момент выживаемость равна 1, затем кривая постепенно понижается и приближается к 0. Время, до которого доживает половина совокупности, называется *медианой выживаемости*. Этот метод оценивает время до появления анализируемого события. Если бы это событие за период наблюдения, одинаковый для всех субъектов, обязательно происходило у всех испытуемых, время до его наступления анализировалось бы традиционными методами анализа количественных показателей. Особенностью метода анализа выживаемости является возможность корректной оценки времени до наступления события в группе, если за период наблюдения оно происходит только у части испытуемых. При этом в анализе учитывается время наблюдения за субъектами, у которых это событие не произошло — цензурирование. Таким образом, анализ выживаемости позволяет анализировать данные с разными периодами наблюдения за субъектами, а также учитывать информацию субъектов, у которых событие за период наблюдения не происходит.

Как и в случае выборочного среднего и оцениваемых по выборке статистических характеристик, в данной задаче существует понятие кривой выживаемости для совокупности и ее выборочной оценки по результатам эксперимента. Если бы не возможное выбывание в процессе эксперимента, выборочная оценка выживаемости $S(t)$ определялась бы как отношение числа переживших момент t к объему выборки n .

Для учета выбывания при построении таблиц выживаемости используется, например, *моментальный метод*. В общем виде математическое выражение для него задается следующей формулой:

$$S(t) = \prod \left(1 - \frac{dt_i}{nt_i} \right), \quad (50)$$

где dt — число умерших в момент t , nt — число наблюдавшихся к моменту t . Символ произведения означает, что нужно перемножать значения $(1 - dt/nt)$ для всех моментов времени, когда произошла хотя бы одна смерть, в период от 0 до t .

Полученные результаты расчетов представляются в виде таблицы, строки которой соответствуют моментам времени, в которые происходила хотя бы одна смерть, а также в виде графика. Точки на графике также соответствуют моментам, когда умер хотя бы один из наблюдавшихся. Эти точки соединяются ступенчатой линией, и этот график и будет выборочной оценкой кривой выживаемости. Кроме того, построенную кривую можно охарактеризовать и обобщенным показателем, например, медианой. Для этого надо найти точку, в которой кривая выживаемости впервые опускается ниже 0,5. Если в эксперименте число умерших было меньше половины, найти медиану невозможно. При этом обобщенным показателем может быть любой другой перцентиль (меньше 50 %). По таблицам выживаемости более точно, чем при использовании общепринятого расчета среднего значения может быть определен и показатель, называемый *средней продолжительностью жизни*. Для расчета выборочной таблицы и кривой выживаемости, а также получения ее статистических характеристик часто применяется метод Каплана–Майера.

Допустим, что в исследовании на 10 животных были получены следующие результаты: 8 животных умерли через 3, 5, 7 (2 животных), 8, 11, 12 (2 животных) часов после начала опыта. Кроме того, в связи с нарушениями условий опыта 2 животных выбыли из эксперимента через 6 и 9 часов (в таблице эти события обозначим знаком —). Построим таблицу выживаемости для таких результатов.

Таблица 8

Момент времени, t	Наблюдалось к моменту t , nt	Умерло к моменту t , dt	Доля переживших момент t , $1 - dt/nt$	Выживаемость, $S(t)$
3	10	1	0,9	0,9
5	9	1	0,889	0,8
6 –				
7	7	2	0,71	0,57
8	5	1	0,8	0,46
9 –				
11	3	1	0,67	0,31
12	2	2	0	0

Если кривую выживаемости построить в логарифмической системе координат ($t - \ln S(t)$), то наклон кривой в каждой конкретной временной точке будет показывать *уровень летальности* среди выживших животных в данный период времени.

Как всегда при исследовании выборки, выборочная кривая выживаемости представляет собой оценку кривой выживаемости для совокупности. При этом для каждой точки на кривой можно, например, по формуле Гринвуда, определить оценку точности приближения или стандартную ошибку выживаемости:

$$\sigma s(t) = S(t) \times \sqrt{\sum \frac{dti}{nti(nti - dti)}}, \quad (51)$$

где сумма берется по всем моментам времени от 0 до t включительно.

Строить доверительные интервалы для выживаемости можно аналогично построению такого интервала для выборочной доли. Такой доверительный интервал для каждого момента t задается соотношением $S(t) \pm z_{\alpha} \times \sigma s(t)$, где z_{α} — двустороннее критическое значение для стандартного нормального распределения (в случае 95 % интервала $z_{\alpha} = 1,96$, для других значений см. таблицу 7). Более точный метод построения доверительного интервала для выживаемости представлен в [4].

В доклинических исследованиях часто возникает необходимость сравнивать выживаемость различных групп или, другими словами, сравнивать кривые выживаемости. Если, скажем, в сопоставленных группах получена одинаковая выживаемость, но при этом в одной из них большая часть животных погибает в более ранние сроки, по сравнению со второй, эти различия будут наглядно продемонстрированы при построении кривых выживаемости и скрыты при оценке эффекта прямым методом.

12.1. Сравнение кривых выживаемости

Существуют методы множественного сравнения кривых выживаемости, но эти методы требуют большого количества вычислений, они подробно рассмотрены в [4, 5]. Мы покажем, как это можно сделать в случае сравнения двух групп. Нулевая гипотеза в данном случае состоит в том, что выживаемость в группах одинакова. Статистические методы для решения данной задачи также делятся на параметрические и непараметрические. Среди непараметрических методов для сравнения кривых выживаемости, построенных моментальным методом, наиболее известны логранговый критерий и критерий Гехана, они применимы, если число наблюдений в каждой группе не менее 10.

12.1.1. Логранговый критерий

Данный предполагает, что функции выживаемости связаны соотношением $S_2(t) = [S_1(t)]^{\psi}$ и, в случае соблюдения этого предположения, данный критерий предпочтительнее. Проверить соблюдение данного условия можно, нарисовав графики этих двух функций в осях t, $\ln[-\ln S(t)]$: если они параллельны, условие выполняется [4]. Пересечение говорит о нарушении данного условия. Величина ψ называется отношением смертности. Если ψ равно 1, кривые совпадают; если меньше 1, животные во 2 выборке умирают позже, чем в 1 и наоборот.

Для проверки этого критерия для каждого момента времени в таблице выживаемости рассчитываем ожидаемое число умерших по обеим таблицам совместно (аналогично анализу таблиц сопряженности). При этом определяем возможный процент смертности по двум группам вместе при условии справедливости нулевой гипотезы. Далее рассчитываем ожидаемое число умерших в каждой группе при условии отсутствия различий между группами. Критерий проверяется по степени близости реальных значений в таблицах выживаемости к ожидаемым, оцененным при условии соблюдения нулевой гипотезы.

Ожидаемое число умерших в 1 группе в каждый момент времени t, когда какое-либо животное погибло хотя бы в одной группе (вычисления проводятся для одной из групп, и не имеет значения, для какой):

$$E1t = n1t \times dtot / ntot,$$

где $n1t$ — число наблюдавшихся в этой группе к этому моменту, $dtot$ — общее число смертей в этот момент в обеих группах, $ntot$ — общее число наблюдавшихся к этому моменту.

Сумма разностей наблюдаемого и ожидаемого числа умерших берется по всем моментам времени, когда хотя бы одна смерть наступала в какой-либо группе, в результате по-

лучается статистика U_l . Эта статистика приближенно подчиняется нормальному закону распределения со стандартным отклонением:

$$\sigma U_l = \sqrt{\frac{\sum n1t \times n2t \times dtot \times (ntot - dtot)}{ntot^2 \times (ntot - 1)}}. \quad (52)$$

Статистика z для проверки критерия получается при делении значения U_l на его стандартную ошибку. Эта статистика распределена приближенно по нормальному закону. Как обычно, рассчитанное значение сравнивается с критическим значением для стандартного нормального распределения (таблица 7 с учетом уровня значимости). Если рассчитанное значение больше табличного, нулевая гипотеза об отсутствии различий отклоняется на выбранном уровне значимости.

В данном случае также приходится делать поправку, связанную с нормальной аппроксимацией, поправка Йейтса в данном случае также позволяет скорректировать статистику:

$$z = \frac{|U_l| - 0,5}{\sigma U_l}. \quad (53)$$

12.1.2. Критерий Гехана представляет собой обобщенный критерий Уилкоксона [4, 5]. Коротко идея метода состоит в анализе продолжительности жизни, при этом каждое животное из наибольшей по численности группы сравнивают с каждым из другой группы. Результату сравнения присваивают +1, если животное из первой группы наверняка прожило дольше, в противном случае ставится -1, 0 – если сделать такое заключение наверняка невозможно. Последняя ситуация может возникнуть, если оба выбыли, если одно животное выбыло до того, как другое умерло и если продолжительность жизни одинакова.

Результаты сравнения для каждого животного суммируются, обозначим эту сумму v . Степень отличия величины v от 0 в ту или иную сторону является мерой оценки достоверности различий между эффектом в сравниваемых группах.

В свою очередь сумма всех v дает величину wg , стандартная ошибка которой вычисляется по формуле:

$$\sigma wg = \sqrt{\frac{n1 \times n2 \times \sum v^2}{(n1 + n2)(n1 + n2 - 1)}}. \quad (54)$$

Как и в случае прошлого критерия, статистика z для проверки данного теста вычисляется как отношение величины wg к ее стандартной ошибке wg . Полученное значение сравнивается с критическим значением стандартного нормального распределения (таблица 7). Аналогично в данном случае применяется и поправка Йейтса.

Мы дали лишь упрощенное представление об основных подходах к оценке эффекта с помощью кривых выживаемости. Более детально с другими методами построения таких кривых, их статистического анализа и сравнения можно познакомиться, например, в [4,5].

13. Представление результатов статистического анализа

Дадим некоторые общие рекомендации по представлению полученных результатов:

– Если статистические характеристики количественной переменной представляют в виде $a \pm b$, необходимо указать математический смысл записи и уточнить, является ли величина b стандартным отклонением Sx или стандартной ошибкой среднего значения σx .

– Если для количественной переменной с помощью специальных тестов или графически выявлено значительное отклонение распределения от нормального закона и для ее анализа использовался непараметрический подход, в качестве описательной статистики для этой переменной должны быть представлены не только среднее значение и стандартное отклонение, но и такие показатели, как медиана, мода, размах, квартили и т.п.

— Если целью исследования была оценка среднего значения в группе, должна быть представлена не только его точечная оценка, но и 95 %-ный доверительный интервал для среднего значения.

— Если целью исследования было сравнение средних значений, должна быть представлена оценка средней разницы и 95%-ный доверительный интервал для этих различий. Если сравнение проводилось в рамках непараметрической статистики, должны быть также представлены медиана, квартили и т.п. для наблюдавшихся различий.

— Если при тестировании статистической гипотезы статистическая значимость не выявлена, это должно быть сформулировано в отчете с указанием соответствующего p -значения ($p=...$).

— Если показатель является дихотомической переменной и результаты представляются в виде доли, должно быть указано число субъектов, включенных в оценку этой доли, а также 95 %-ный доверительный интервал для доли.

— Если целью исследования было сравнение долей, должны быть представлены оценки долей, число испытуемых, включенных в их оценку, разницы (отношение) между долями, 95 %-ный интервал для этой разницы (отношения).

14. Некоторые вопросы планирования эксперимента

Вопросы экономики и этики требуют внимательного отношения к планированию исследований лекарственных препаратов. Этот вопрос достаточно сложен в математическом плане, особенно в случаях, когда при статистической обработке проведенного исследования необходимо проверять несколько статистических гипотез [4, 15, 26, 27], или при невозможности использования для сравнения показателей эффекта равночисленных групп [5]. Поэтому в рамках данной работы мы познакомим лишь с общими подходами и приведем несколько наиболее простых приближенных формул для оценки необходимой численности сравниваемых групп.

Особенностью планирования доклинических исследований является то, что используемые в них лабораторные животные составляют однородные популяции, в большей или меньшей степени различающиеся между собой. Различие особей влечет за собой необходимость статистического оценивания. Исследователь никогда не имеет в своем распоряжении всей популяции (генеральной совокупности) для постановки опытов и обычно имеет дело лишь с выборкой из этой совокупности. При этом особую важность приобретает задача планирования, например, определения объема выборки, при котором она отражает свойства генеральной совокупности достаточно точно. На практике часто на этапе планирования исследования эта задача не решается строго, а планируемый объем назначается на основе прошлого опыта проведения сходных исследований. К сожалению, о важности решения этой задачи вспоминают, как правило, когда исследование уже закончено и начинается процесс статистической обработки полученных результатов. При этом может оказаться, что полученных данных недостаточно для статистически достоверного ответа на вопросы, ради которых и проводилось исследование. Неэтичными являются исследования как имеющие чрезмерно большой объем испытуемых, так и исследования слишком малого объема. Какими сложными не были бы цели и задачи исследования, на основе декомпозиции их можно выразить с помощью одной или нескольких статистических гипотез. Далее можно вычислить объем выборок, которые дают определенную вероятность выявить желаемый эффект (или различия в эффекте).

Чтобы ответить на вопросы, поставленные перед доклиническим исследованием препарата, с помощью различных критериев приходится проверять нулевую гипотезу об отсутствии эффекта, сравнивая при этом выборочные средние, доли, кривые выживаемости и т.п. Вывод об отсутствии таких различий тесно связан с понятием *чувствительность* критерия. Чувствительностью критерия называется как раз его способность обнаружить различия. Чтобы оценить чувствительность критерия, нужно задать величину различий, которые он должен выявлять. Если в результате проверки гипотезы о суще-

ствовании различий был сделан вывод об их отсутствии, необходимо проверить, была ли чувствительность критерия достаточной для обнаружения таких различий (80–90%). Чувствительность зависит от величины различий, разброса данных и объема выборки. При этом наиболее важным параметром является объем выборки: чем он больше, тем меньшие различия окажутся статистически значимыми. Таким образом, появляется возможность заранее оценивать численность выборок, необходимых для выявления желаемого размера эффекта. Надо заметить, что вопросы чувствительности важны и при использовании методов корреляционного, регрессионного, дисперсионного анализа и др. методов статистики [4, 19, 20].

Чувствительность критерия связана с вероятностью *ошибки II рода* (β). Вероятность обнаружить различия, то есть чувствительность, или мощность критерия, равна $1-\beta$. При прочих равных условиях, тот критерий имеет преимущество, который имеет меньшую вероятность ошибки II рода. Эту ситуацию иллюстрирует рисунок 8, на котором схематично представлены распределения нулевой (А) и альтернативной (Б) гипотез для проверки одностороннего теста о наличии статистически значимых различий.

Таким образом, на чувствительность критерия различные факторы влияют следующим образом [4]:

- уровень значимости α — чем меньше α , тем ниже чувствительность;
- отношение величины различий к стандартному отклонению — чем оно больше, тем больше чувствительность (для количественного определения признака); частота события — чем больше число (или доля) событий, тем выше чувствительность (для учета реакции в альтернативной форме);
- объем выборки — чем он больше, тем больше чувствительность.

Подробнее этот вопрос рассмотрен в [1, 4, 9, 15].

Надо заметить, что в большинстве случаев параметрические критерии являются более мощными, чем их непараметрические аналоги, и, если соблюдаются все предпосылки использования параметрического критерия, замена его соответствующим непараметрическим может привести к увеличению вероятности ошибки второго рода. Подробнее об этом можно узнать в [17].

Кроме того, надо обратить внимание, что для различных критериев чувствительность вычисляется по-разному. Соответственно по-разному решается и обратная задача: при выбранных значениях вероятности ошибок I и II рода (заданной чувствительности) и желаемой величине различий между эффектами оценить требуемый объем выборок для получения статистически достоверных результатов сравнения. Существуют графики, номограммы [4, 27] и таблицы [5], связывающие чувствительность с величиной различий для наиболее часто встречающихся значений α и различных объемов выборок. Мы приведем лишь некоторые формулы для наиболее часто используемых критериев. Приведенные ниже формулы являются приближенными и применимы при объемах выборок больше 20.

Если критериями эффекта служат количественные признаки, выражаемые статистическими средними величинами, то формула расчета минимального объема групп для сравнения двух показателей с учетом вероятности ошибок I и II рода имеет вид (равновеликие группы):

$$n = (Z\alpha + Z\beta)^2 \frac{Sx_0^2 + Sxk^2}{\Delta^2}, \quad (55)$$

где Sx_0 и Sxk — стандартные отклонения сравниваемых показателей в опытной и контрольной группах; Δ — требуемая величина (клинически значимая) различий между средними значениями сравниваемых групп; $Z\alpha$ и $Z\beta$ — критические значения нормального распределения, соответствующие установленным уровням ошибок α и β , определяются по таблицам (таблица 7). В случае ошибок I рода значение в таблице выбирается в зависимости от последующего использования одностороннего или двустороннего варианта статистического теста.

При альтернативной форме описания эффекта с помощью частот (или долей) P_0 и P_k необходимое число наблюдений при равных по численности опытной и контрольной группах определяется по формуле:

$$n = (Z\alpha + Z\beta)^2 \frac{p_0(100 - p_0) + pk(100 - pk)}{\Delta^2}, \quad (56)$$

где Δ – величина разности между частотами $P_0 - P_k$. Такой метод дает достаточно точные результаты при 25 % < P < 75 %. При других значениях частот для корректировки возникающих искажений, как говорилось выше, вводится поправка $\varphi = 2 \times \arcsin \sqrt{p}$ (таблица 6). Объем выборки вычисляется при этом как:

$$n = \frac{2(Z\alpha + Z\beta)^2}{(\varphi_0 - \varphi_k)^2}. \quad (57)$$

Финансовые, этические или другие соображения могут требовать формирования различных по численности опытной и контрольной групп, численность групп при рандомизации 1 : k ($n_1 = k \times n_2$) может быть оценена по следующим формулам.

В случае количественного представления признаков эта формула выглядит так:

$$n_2 = (Z\alpha + Z\beta)^2 \frac{Sx^2 \left(1 + \frac{1}{k}\right)}{\Delta^2}, \quad (58)$$

где Sx – стандартное отклонение признака.

Для альтернативного представления признаков:

$$n_2 = (Z\alpha + Z\beta)^2 \frac{p_1(100 - p_1) / k + p_2(100 - p_2)}{\Delta^2}. \quad (59)$$

Данные формулы предполагают использование одностороннего теста (показатель одной группы отличается от показателя другой только в одну сторону – исследования типа «преимущество» или «не хуже»). В случае необходимости «улавливать» различия в эффекте в обе стороны применяется двусторонний тест. Приведенные формулы для расчета при этом не меняются, но значение уровня значимости α заменяется на $\alpha/2$. Подробнее эти вопросы рассмотрены в [5, 26, 27].

Однако на практике при использовании этих достаточно простых формул могут возникнуть проблемы. Дело в том, что для некоторых исследований заранее может быть неизвестна величина дисперсии (или среднее квадратичного отклонения) признака. Обычно эта проблема решается с помощью использования вместо этой величины ее аналога, известного из проведенных ранее похожих экспериментов, или используются литературные данные. Кроме того, уже на этапе планирования исследований расчеты могут показать, что необходимые объемы контрольной и тестируемой групп для констатации требуемых различий при желаемых уровнях ошибок I и II рода превышают реально возможные для проведения таких исследований. Однако объемы групп можно попробовать снизить, варьируя желаемые значения вероятностей ошибок I и II рода или величины ожидаемых различий между группами. Если и это не приводит к желаемому результату, надо отдавать себе отчет в ограниченных возможностях такого эксперимента. Это также является сигналом к более внимательному отношению к результатам «негативных» испытаний (различия не были найдены) с малым объемом выборки, поскольку именно недостатки в планировании эксперимента могли привести к тому, что изучавшиеся методы лечения, возможно, имеющие клинически важный эффект, были забракованы.

Если в исследовании наблюдается одна группа, а целью является определение того, будет или нет происходить определенное событие, причем даже одно событие у испытуемых представляет интерес для исследователя, тогда оценка необходимого объема выборки может быть сделана по формуле [28]:

$$n = \frac{\log \beta}{\log(p)}, \quad (60)$$

где p – ожидаемая доля интересующего события.

Например, если целью исследования была проверка присутствия патогена в группе животных, по формуле (60) можно оценить число животных, которое необходимо протестировать. Предполагая, что доля инфицированных животных в группе порядка 30%, то в предположении чувствительности теста 90 % по формуле (60) необходимый объем выборки может быть оценен как:

$$n = \frac{\log \beta}{\log(p)} = \frac{\log 0,1}{\log 0,7} = 6,5 \approx 7.$$

Обращаем внимание, что в формуле в качестве доли p присутствует доля неинфицированных животных. Если бы предполагалась меньшая распространенность инфекции, например, 10 % вместо 30 %, то объем выборки нужно было бы значительно увеличить $n = 21,8 \approx 22$.

Если целью экспериментов в одной группе является проверка гипотезы, что доля интересующего события ненулевая или что доля интересующего события статистически значимо отличается от заранее заданного референсного значения, расчеты могут проводиться на основе следующей формулы:

$$n = (Z\alpha + Z\beta)^2 \frac{po(100 - po)}{\Delta^2},$$

где Δ – величина разности между частотами $Po - Pk$, Po – постулируемое значение доли в эксперименте, а Pk – равно 0 или заранее заданному референсному значению.

Известны также формулы для планирования исследований в случае применения методов анализа выживаемости.

Проблема усложняется, если в ходе планируемого исследования должны быть получены ответы на несколько вопросов о различных параметрах эффекта, что соответственно потребует статистической проверки нескольких статистических критериев, эта проблема подробно освещена, например, в [4, 27].

Детальный анализ ошибок планирования исследований, которые привели в свою очередь к сомнительным выводам в результате статистической обработки экспериментальных данных, проведен авторами [26], и их выводы, безусловно, имеют теоретическую и практическую ценность.

Заключение

Использование методов математической статистики в доклинических исследованиях позволяет правильно выбрать дизайн (параллельные группы, перекрестный дизайн, факториальные планы и т.д.) и оценить необходимое число животных для получения статистически значимых выводов. Дизайн исследования, его цель и тип выбранных показателей определяют выбор процедур и методов статистического анализа данных.

Литература

1. Айвазян С.А., Енюков И.С., Мешалкин Л.Д. Основы моделирования и первичная обработка данных. – М.: Финансы и статистика, 1983.
2. Беленький М.Л. Элементы количественной оценки фармакологического эффекта. – Л.: Гос. из-во мед. литературы, 1963.
3. Браунли К.А. Статистическая теория и методология в науке и технике. – М.: Наука, 1977.
4. Стентон Г. Медико-биологическая статистика. – М.: Практика, 1999.
5. Двойрин В.В., Клименков А.А. Методика контролируемых клинических испытаний. – М.: Медицина, 1985.
6. Зайцев Г.Н. Методика биометрических расчетов. – М.: Наука, 1973.

7. Кендалл М., Стьюарт А. Многомерный статистический анализ и временные ряды. — М., 1976.
8. Кокс Д., Снелл Э. Прикладная статистика. Принципы и примеры. — М.: Мир, 1984.
9. Лакин Г.Ф. Биометрия. — М.: Высшая школа, 1990.
10. Митропольский А.К. Техника статистических вычислений. — М., 1971.
11. Мэйндоналд Дж. Вычислительные алгоритмы в прикладной статистике. — М.: Финансы и статистика, 1988.
12. Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. Таблицы по математической статистике. — М.: Финансы и статистика, 1982.
13. Поллард Дж. Справочник по вычислительным методам статистики. — М.: Финансы и статистика, 1982.
14. Поляков И.В., Соколова Н.С. Практическое пособие по медицинской статистике. — Л.: Медицина, 1975.
15. Рафалес-Ламарка Э.Э., Николаев В.Г. Некоторые методы планирования и математического анализа биологических экспериментов. — Киев: Наукова Думка, 1971.
16. Рокицкий П. Ф. Биологическая статистика. — Минск: В. ш., 1973.
17. Рунион Р. Справочник по непараметрической статистике. — М.: Финансы и статистика, 1982.
18. Сергиенко В.И., Бондарева И.Б. Математическая статистика в клинических исследованиях. — М.: Геотар медицина, 2000.
19. Справочник по прикладной статистике / под ред. Э. Ллойда, У. Ледермана. — М.: Финансы и статистика, 1989.
20. Справочник по теории вероятностей и математической статистике / под ред. В.С. Королюка, Н.И. Портенко и др. — М.: Наука, 1985.
21. Урбах В.Ю. Статистический анализ в биологических и медицинских исследованиях. — М., 1976.
22. Черныш В.И., Напалков А.В. Математический аппарат биологической кибернетики. — М., 1976.
23. Festing MFW, Altman DG. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. — ILAR Journal, 2002, 43(4): 244–258.
24. Lee T.L., Wang J.W. «Statistical Methods for Survival Data Analysis», Third Edition, Wiley-Interscience, John Wiley & Sons, 2003.
25. Medical Uses of Statistics. — Edited by Bailar J.C., Mosteller F. // NEJM Books, 1986.
26. Senn S. Statistical Issues in Drug Development // John Wiley & Sons, 1997.
27. Dell R.B., Holleran S., Ramakrishnan R. Sample Size Determination // ILAR Journal 43(4): 207–213, 2002.

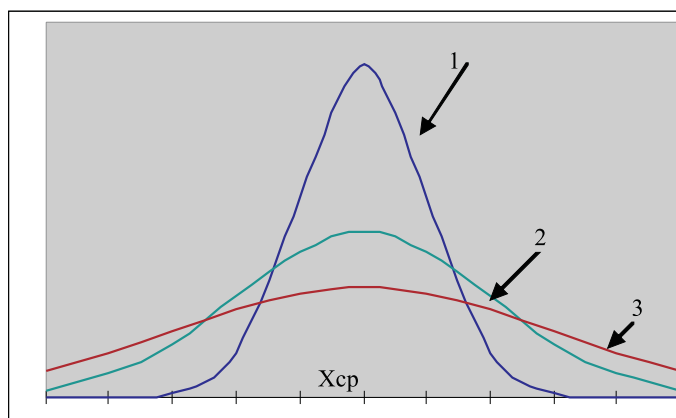


Рисунок 1.

Кривые нормального распределения при различных значениях среднего квадратичного отклонения: значения среднего квадратичного отклонения у каждой представленной кривой больше, чем у предыдущей

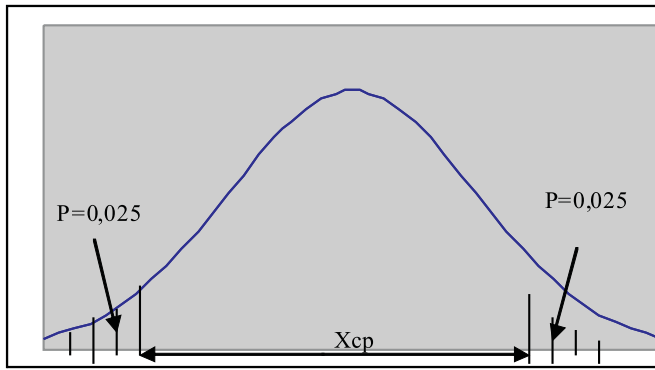


Рисунок 2. Двусторонний 95 %-ный доверительный интервал для средней арифметической

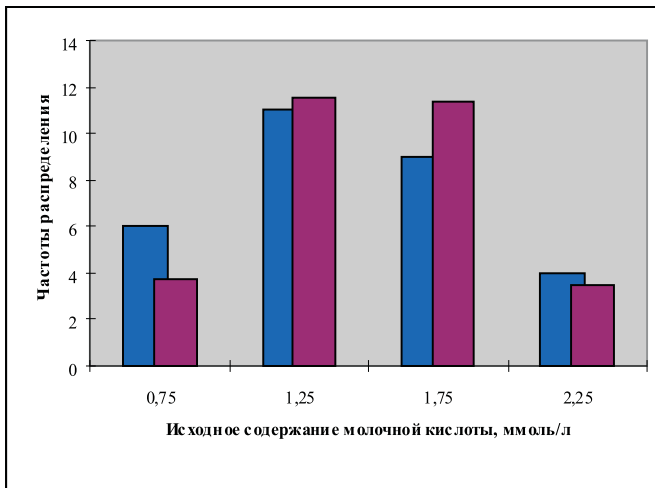


Рисунок 3. Распределение фактических и теоретических частот для примера использования критерия согласия

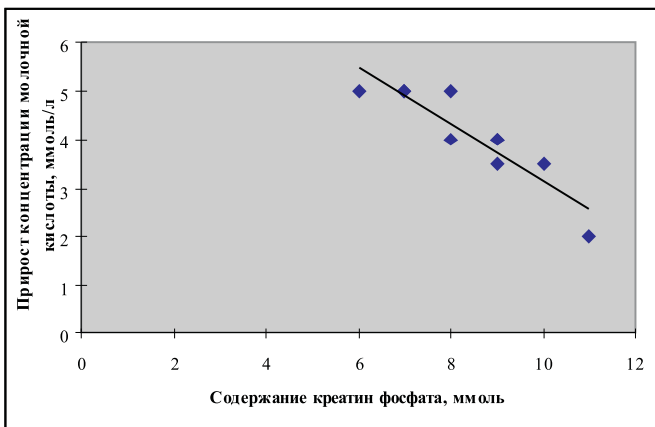


Рисунок 4. Графическое представление регрессионной зависимости между изучаемыми параметрами

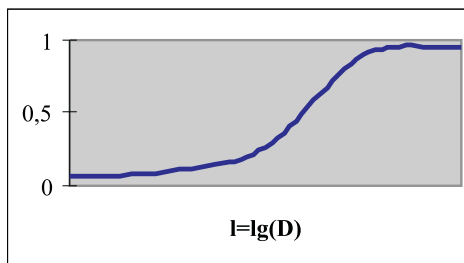
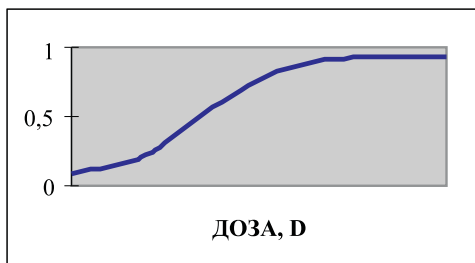


Рисунок 5. Кривая (кумулятивная) «доза–эффект»:
 а – обычные координаты; б – логарифмические координаты

Приложение

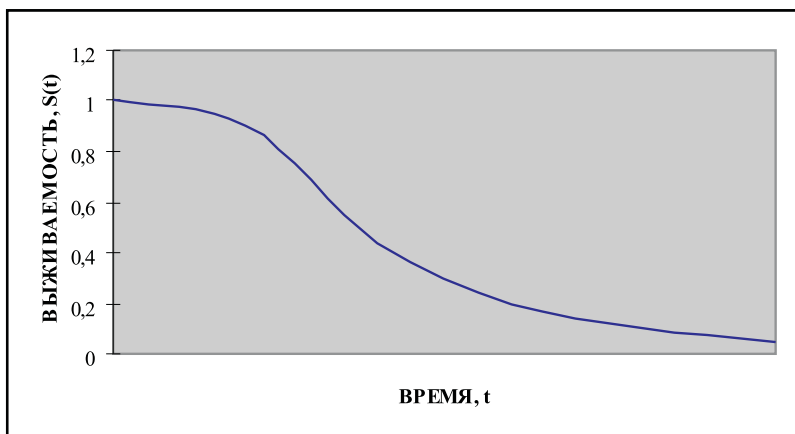


Рисунок 6. Типичная кривая выживаемости

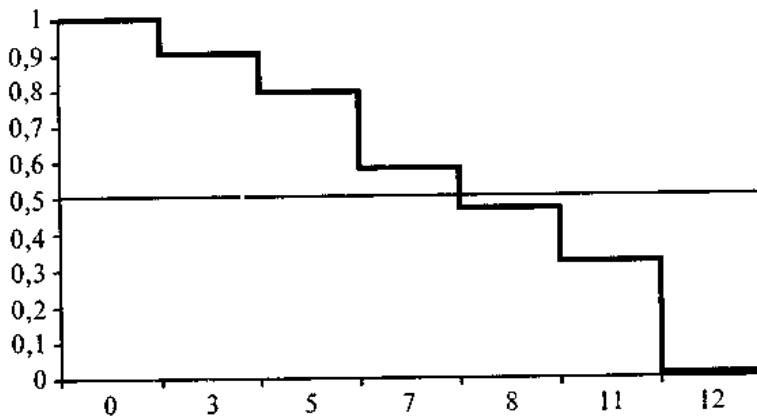
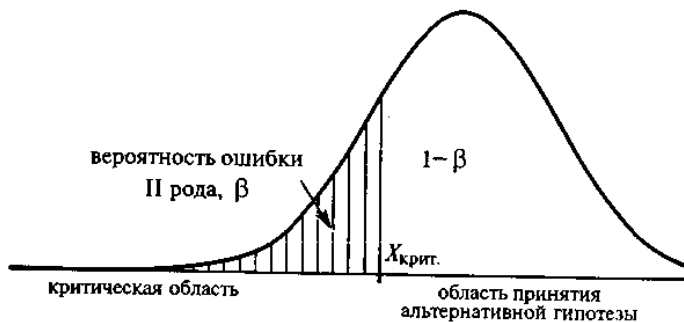


Рисунок 7. Кривая выживаемости $S(t)$ для примера, ход вычислений показан в таблице 18. Кривая представляет собой ступенчатую линию, каждая ступень соответствует моменту смерти хотя бы одного испытуемого. Горизонтальная линия – медиана выживаемости



а



б

Рисунок 8. Односторонний тест для проверки гипотезы о равенстве средних значений:
А – распределение нулевой гипотезы, Б – распределение альтернативной гипотезы.

Таблица 1

Критические точки двустороннего *t*-критерия Стьюдента.
Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. Таблицы
по математической статистике. – М.: Финансы и статистика, 1982

Число степеней свободы <i>f</i>	α , %			Число степеней свободы <i>f</i>	α , %		
	5	1	0,1		5	1	0,1
1	12,71	63,66	64,60	18	2,10	2,88	3,92
2	4,30	9,92	31,60	19	2,09	2,86	3,88
3	3,18	5,84	12,92	20	2,09	2,85	3,85
4	2,78	4,60	8,61	21	2,08	2,83	3,82
5	2,57	4,03	6,87	22	2,07	2,82	3,79
6	2,45	3,71	5,96	23	2,07	2,81	3,77
7	2,37	3,50	5,41	24	2,06	2,80	3,75
8	2,31	3,36	5,04	25	2,06	2,79	3,73
9	2,26	3,25	4,78	26	2,06	2,78	3,71
10	2,23	3,17	4,59	27	2,05	2,77	3,69
11	2,20	3,11	4,44	28	2,05	2,76	3,67
12	2,18	3,05	4,32	29	2,05	2,76	3,66
13	2,16	3,01	4,22	30	2,04	2,75	3,65
14	2,14	2,98	4,14	40	2,02	2,70	3,55
15	2,13	2,95	4,07	60	2,00	2,66	3,46
16	2,12	2,92	4,02	120	1,98	2,62	3,37
17	2,11	2,90	3,97	∞	1,96	2,58	3,29

*Критические значения критерия согласия χ^2 .
Справочник по прикладной статистике / под ред. Э. Ллойда,
У. Ледермана – М.: Финансы и статистика, 1989*

f	Уровень значимости α							
	0,5	0,25	0,10	0,05	0,025	0,01	0,005	0,001
1	0,455	1,323	2,706	3,841	5,024	6,635	7,879	10,828
2	1,386	2,773	4,605	5,991	7,378	9,210	10,597	13,816
3	2,366	4,108	6,251	7,815	9,348	11,345	12,838	16,266
4	3,357	5,385	7,779	9,488	11,143	13,277	14,860	18,467
5	4,351	6,626	9,236	11,070	12,833	15,086	16,750	20,515
6	5,348	7,841	10,645	12,592	14,449	16,812	18,548	22,458
7	6,346	9,037	12,017	14,067	16,013	18,475	20,278	24,322
8	7,344	10,219	13,362	15,507	17,535	20,090	21,955	26,124
9	8,343	11,389	14,684	16,919	19,023	21,666	23,589	27,877
10	9,342	12,549	15,987	18,307	20,483	23,209	25,188	29,588
11	10,341	13,701	17,275	19,675	21,920	24,725	26,757	31,264
12	11,340	14,845	18,549	21,026	23,337	26,217	28,300	32,909
13	12,340	15,984	19,812	22,362	24,736	27,688	29,819	34,528
14	13,339	17,117	21,064	23,685	26,119	29,141	31,319	36,123
15	14,339	18,245	22,307	24,996	27,488	30,578	32,801	37,697
16	15,338	19,369	23,542	26,296	28,845	32,000	34,267	39,252
17	16,338	20,489	24,769	27,587	30,191	33,409	35,718	40,790
18	17,338	21,605	25,989	28,869	31,526	34,805	37,156	42,312
19	18,338	22,718	27,204	30,144	32,852	36,191	38,582	43,820
20	19,337	23,828	28,412	31,410	34,170	37,566	39,997	45,315
21	20,337	24,935	29,615	32,671	35,479	38,932	41,401	46,797
22	21,337	26,039	30,813	33,924	36,781	40,289	42,796	48,268
23	22,337	27,141	32,007	35,172	38,076	41,638	44,181	49,728
24	23,337	28,241	33,196	36,415	39,364	42,980	45,559	51,179
25	24,337	29,339	34,382	37,652	40,646	44,314	46,928	52,620
26	25,336	30,435	35,563	38,885	41,923	45,642	48,290	54,052
27	26,336	31,528	36,741	40,113	43,195	46,963	49,645	55,476
28	27,336	32,020	37,916	41,337	44,461	48,278	50,993	56,892
29	28,336	33,711	39,087	42,557	45,722	49,588	52,336	58,301
30	29,336	34,800	40,256	43,773	46,979	50,892	53,672	59,703
31	30,336	35,887	41,422	44,985	48,232	52,191	55,003	61,098
32	31,336	36,973	42,585	46,194	49,480	53,486	56,328	62,487
33	32,336	38,058	43,745	47,400	50,725	54,776	57,648	63,870
34	33,336	39,141	44,903	48,602	51,966	56,061	58,964	65,247
35	34,336	40,223	46,059	49,802	53,203	57,342	60,275	66,619
36	35,336	41,304	47,212	50,998	54,437	58,619	61,581	67,985
37	36,336	42,383	48,363	52,192	55,668	59,893	62,883	69,346
38	37,335	43,462	49,513	53,384	56,896	61,162	64,181	70,703
39	38,335	44,539	50,660	54,572	58,120	62,428	65,476	72,055

Уровень значимости α								
40	39,335	45,616	51,805	55,758	59,342	63,691	66,766	73,402
41	40,335	46,692	52,949	56,942	60,561	64,950	68,053	74,745
42	41,335	47,766	54,090	58,124	61,777	66,206	69,336	76,084
43	42,335	48,840	55,230	59,304	62,990	67,459	70,616	77,419
44	43,335	49,913	56,369	60,481	64,201	68,710	71,893	78,750
45	44,335	50,985	57,505	61,656	65,410	69,957	73,166	80,077
46	45,335	52,056	58,641	62,830	66,617	71,201	74,437	81,400
47	46,335	53,127	59,774	64,001	67,821	72,443	75,704	82,720
48	47,335	54,196	60,907	65,171	69,023	73,683	76,969	84,037
49	48,335	55,265	62,038	66,339	70,222	74,919	78,231	85,351
50	49,335	56,334	63,167	67,505	71,420	76,154	79,490	86,661

Таблица 3а

Критические значения статистики t_1 для проверки сомнительных вариантов по ранжированному ряду.

Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. Таблицы по математической статистике. – М.: Финансы и статистика, 1982

n	Уровни значимости α , %		n	Уровни значимости α , %		n	Уровни значимости α , %	
	5	1		5	1		5	1
4	0,96	0,99	13	0,41	0,52	22	0,32	0,41
5	0,81	0,92	14	0,40	0,50	23	0,31	0,41
6	0,69	0,80	15	0,38	0,49	24	0,31	0,40
7	0,61	0,74	16	0,37	0,47	25	0,30	0,39
8	0,55	0,68	17	0,36	0,46	26	0,30	0,39
9	0,51	0,64	18	0,35	0,45	27	0,30	0,38
10	0,48	0,60	19	0,34	0,44	28	0,29	0,38
11	0,45	0,57	20	0,33	0,43	29	0,29	0,37
12	0,43	0,54	21	0,33	0,42	30	0,28	0,37

Таблица 3б

Критические значения статистики t_2 для проверки сомнительных вариантов по ранжированному ряду.

Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. Таблицы по математической статистике. – М.: Финансы и статистика, 1982

n	Уровни значимости α , %		n	Уровни значимости α , %		n	Уровни значимости α , %	
	5	1		5	1		5	1
4	0,76	0,89	13	0,36	0,46	22	0,29	0,38
5	0,64	0,78	14	0,35	0,45	23	0,28	0,37
6	0,56	0,70	15	0,34	0,44	24	0,28	0,37
7	0,31	0,64	16	0,33	0,43	25	0,28	0,36
8	0,47	0,59	17	0,32	0,42	26	0,27	0,36
9	0,44	0,54	18	0,31	0,41	27	0,27	0,35
10	0,41	0,53	19	0,31	0,40	28	0,27	0,35
11	0,39	0,50	20	0,30	0,39	29	0,26	0,34
12	0,38	0,48	21	0,30	0,38	30	0,26	0,34

Таблица 4

Критические значения статистики парного Т-критерия Уилкоксона
(односторонний критерий).

Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990.

Число парных наблюдений n	Уровни значимости α, %		Число парных наблюдений n	Уровни значимости α, %	
	5	1		5	1
5	0	—	14	25	16
6	2	0	15	30	19
7	3	0	16	35	23
8	5	1	17	41	28
9	8	3	18	47	33
10	10	5	19	53	38
11	13	7	20	60	42
12	17	10	21	67	50
13	21	12	22	74	56

Примечание. Для n>25 критические точки tst Т-критерия можно рассчитать по следующей формуле [9]:

$$tst = \frac{n \times (n + 1)}{4} - t \times \sqrt{\frac{n \times (n + 1) \times (2n + 1)}{24}},$$

где n – число парных наблюдений, t – предельные значения критерия Стьюдента, зависящие от уровня значимости α.

Таблица 4 (продолжение)

Критические значения статистики парного Т-критерия Уилкоксона
(двусторонний критерий) [9]

Число парных наблюдений n	Уровни значимости α, %		Число парных наблюдений n	Уровни значимости α, %	
	5	1		5	1
6	1	—	16	31	21
7	3	—	17	36	24
8	5	1	18	41	29
9	7	3	19	47	33
10	9	4	20	53	39
11	12	6	21	60	44
12	15	8	22	67	50
13	18	11	23	74	56
14	22	14	24	82	62
15	26	17	25	90	69

Таблица 5

Критические значения статистики U-критерия Уилкоксона–Манна–Уитни
(односторонний критерий, α = 0,01).

Мюллер П., Нойман П., Шторм Р. Таблицы по математической статистике. – М.: Финансы и статистика, 1982

n2 \ n1	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	n ₂
3	0	0	0	0	1	1	1	2	2	2	3	3	4	4	4	5	3
4	0	1	1	2	3	3	4	5	5	6	7	7	8	9	9	10	4

5	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	5
6		3	4	6	7	8	9	11	12	14	15	16	18	19	20	22	6
7			6	7	9	11	12	14	16	18	19	21	23	24	26	28	7
8				9	11	13	15	17	20	22	24	26	28	30	32	34	8
9					14	16	19	21	23	25	28	31	33	36	38	40	9
10						19	22	24	27	30	33	36	38	41	44	47	10
11							25	28	31	34	37	41	44	47	50	53	11
12								31	35	38	42	46	49	53	56	60	12
13									39	43	47	51	55	59	63	67	13
14										47	51	56	60	65	69	73	14
15											56	61	66	70	75	80	15
16												66	71	76	82	87	16
17													77	82	88	94	17
18														88	94	100	18
19															101	107	19
20																114	20

Таблица 5 (продолжение)

Двусторонний критерий, $\alpha = 0,01$

n2\n1	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	n2
5	0	0	0																5
6	0	0	1	2															6
7	0	0	1	3	4														7
8	0	1	2	4	6	7													8
9	0	1	3	5	7	9	11												9
10	0	2	4	6	9	11	13	16											10
11	0	2	5	7	10	13	16	19	21										11
12	1	3	6	9	12	15	18	21	24	23									12
13	1	4	7	10	13	17	20	24	27	31	34								13
14	1	4	7	11	15	18	22	26	30	34	38	42							14
15	2	5	8	12	16	20	25	29	33	37	42	46	51						15
16	2	5	9	13	18	22	27	31	36	41	46	50	55	60					16
17	2	6	10	15	19	24	29	34	39	44	49	54	60	65	70				17
18	2	6	11	16	21	26	31	37	42	47	53	59	64	70	75	77	81		18
19	3	7	12	17	22	28	34	39	45	51	57	63	69	75	81	87	93		19
20	3	8	13	18	24	30	36	42	48	54	60	67	73	79	86	92	99	105	20
21	3	8	14	19	25	32	38	44	51	58	64	71	78	84	91	98	105	112	21
22	4	9	14	21	27	34	40	47	54	61	68	75	82	89	97	104	111	118	22
23	4	9	15	22	29	36	43	50	57	64	72	79	87	94	102	109	117	125	23
24	4	10	16	23	30	37	45	52	60	68	76	83	91	99	107	115	123	131	24
25	5	10	17	24	32	39	47	55	63	71	79	88	96	104	113	121	129	138	25

Таблица 6

Таблица угловой трансформации $\phi = 2 \arcsin \sqrt{p}$.
 Двойрин В.В., Клименков А.А. Методика контролируемых
 клинических испытаний. – М.: Медицина, 1985

P	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0	0,000	0,200	0,284	0,348	0,403	0,451	0,495	0,536	0,547	0,609
1	0,644	0,676	0,707	0,738	0,767	0,795	0,823	0,850	0,876	0,902
2	0,927	0,952	0,976	1,000	1,024	1,047	1,070	1,093	1,115	1,137
3	1,159	1,182	1,203	1,224	1,245	1,266	1,287	1,308	1,328	1,349
4	1,369	1,390	1,410	1,430	1,451	1,471	1,491	1,511	1,531	1,551
5	1,571	1,591	1,611	1,631	1,651	1,671	1,691	1,711	1,731	1,752
6	1,772	1,793	1,813	1,834	1,855	1,875	1,897	1,918	1,939	1,961
7	1,982	2,004	2,026	2,049	2,071	2,094	2,118	2,141	2,165	2,190
8	2,214	2,240	2,265	2,292	2,319	2,346	2,375	2,404	2,434	2,465
9	2,494	2,532	2,568	2,606	2,647	2,691	2,739	2,793	2,858	2,941

Таблица 7

Критические значения Z стандартного нормального распределения

Уровень значимости α	0,005	0,01	0,012	0,02	0,025	0,05	0,1	0,2
Односторонний тест	2,567	2,326	2,257	2,054	1,960	1,645	1,282	0,842
Двусторонний тест	2,807	2,576	2,513	2,326	2,242	1,960	1,645	1,282

Таблица 8

Значения пробитов

Число тест- объек- тов в группе	Число тест-объектов, у которых наблюдается изучаемый эффект															
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
3	3,50	4,57	5,43	6,50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	3,36	4,33	5,00	5,67	6,64	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	3,25	4,16	4,75	5,25	5,84	6,15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	3,16	4,03	4,57	5,00	5,43	5,91	6,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	3,10	3,93	4,43	4,82	5,18	5,51	6,07	6,90	-	-	-	-	-	-	-	-
8	3,04	3,85	4,33	4,68	5,00	5,32	5,67	6,15	6,96	-	-	-	-	-	-	-
9	2,99	3,78	4,23	4,57	4,86	5,14	5,43	5,77	6,22	7,01	-	-	-	-	-	-
10	2,95	3,72	4,16	4,48	4,75	5,00	5,25	5,52	5,84	6,28	7,01	-	-	-	-	-
11	2,90	3,67	4,09	4,40	4,65	4,89	5,11	5,35	5,60	5,91	6,33	7,10	-	-	-	-
12	2,88	3,61	4,03	4,33	4,57	4,19	5,00	6,21	5,43	5,67	5,97	6,39	7,12	-	-	-
13	2,84	3,57	3,98	4,26	4,50	4,11	4,90	5,10	5,29	5,50	5,74	6,02	6,43	7,16	-	-
14	2,81	3,53	3,93	4,21	4,43	4,63	4,82	5,00	5,18	5,31	5,51	5,19	6,07	6,47	7,19	-
15	2,18	3,50	3,89	4,16	4,38	4,57	4,15	4,92	5,08	5,25	5,43	5,62	5,84	6,11	6,50	7,22

Таблица 9

Критические значения статистики q' критерия Даннета ($\alpha = 0,05$).
 Dunnett C.W. *New Tables for Multiple Comparisons with a Control* //
Biometrics. — 1964. — Vol 20. — P. 482–491

Интервал сравнения l														
f	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	21
5	2,57	3,03	3,29	3,48	3,62	3,73	3,82	3,90	3,97	4,03	4,09	4,14	4,26	4,42
6	2,45	2,86	3,10	3,26	3,39	3,49	3,57	3,64	3,71	3,76	3,81	3,86	3,97	4,11
7	2,36	2,75	2,97	3,12	3,24	3,33	3,41	3,47	3,53	3,58	3,63	3,67	3,78	3,91
8	2,31	2,67	2,88	3,02	3,13	3,22	3,29	3,35	3,41	3,46	3,50	3,54	3,64	3,76
9	2,26	2,61	2,81	2,95	3,05	3,14	3,20	3,26	3,32	3,36	3,40	3,44	3,53	3,65
10	2,23	2,57	2,76	2,89	2,99	3,07	3,14	3,19	3,24	3,29	3,33	3,36	3,45	3,57
11	2,20	2,53	2,72	2,84	2,94	3,02	3,08	3,14	3,19	3,23	3,27	3,30	3,39	3,50
12	2,18	2,50	2,08	2,81	2,90	2,98	3,04	3,09	3,14	3,18	3,22	3,25	3,34	3,45
13	2,16	2,48	2,65	2,78	2,87	2,94	3,00	3,06	3,10	3,14	3,18	3,21	3,29	3,40
14	2,14	2,46	2,63	2,75	2,84	2,91	2,97	3,02	3,07	3,11	3,14	3,18	3,26	3,36
15	2,13	2,44	2,61	2,73	2,82	2,89	2,95	3,00	3,04	3,08	3,12	3,15	3,23	3,33
16	2,12	2,42	2,59	2,71	2,80	2,87	2,92	2,97	3,02	3,06	3,09	3,12	3,20	3,30
17	2,11	2,41	2,58	2,69	2,78	2,85	2,90	2,95	3,00	3,03	3,07	3,10	3,18	3,27
18	2,10	2,40	2,56	2,68	2,76	2,83	2,89	2,94	2,98	3,01	3,05	3,08	3,16	3,25
19	2,09	2,39	2,55	2,66	2,75	2,81	2,87	2,92	2,96	3,00	3,03	3,06	3,14	3,23
20	2,09	2,38	2,54	2,65	2,73	2,80	2,86	2,90	2,95	2,98	3,02	3,05	3,12	3,22
24	2,06	2,35	2,51	2,61	2,70	2,76	2,81	2,86	2,90	2,94	2,97	3,00	3,07	3,16
30	2,04	2,32	2,47	2,58	2,66	2,72	2,77	2,82	2,86	2,89	2,92	2,95	3,02	3,11
40	2,02	2,29	2,44	2,54	2,62	2,68	2,73	2,77	2,81	2,85	2,87	2,90	2,97	3,06
60	2,00	2,27	2,41	2,51	2,58	2,64	2,69	2,73	2,77	2,80	2,83	2,86	2,92	3,00
120	1,98	2,24	2,38	2,47	2,55	2,60	2,65	2,69	2,73	2,76	2,79	2,81	2,87	2,95
∞	1,96	2,21	2,35	2,44	2,51	2,57	2,61	2,65	2,69	2,72	2,74	2,77	2,83	2,91

Таблица 9 (продолжение)

Критические значения статистики q' критерия Даннета ($\alpha = 0,01$).
 Dunnett C.W. *New Tables for Multiple Comparisons with a Control* //
Biometrics. — 1964. — Vol 20. — p. 482–491

Интервал сравнения l														
f	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	21
5	4,03	4,63	4,98	5,22	5,41	5,56	5,69	5,80	5,89	5,98	6,05	6,12	6,30	6,52
6	3,71	4,21	4,51	4,71	4,87	5,00	5,10	5,20	5,28	5,35	5,41	5,47	5,62	5,81
7	3,50	3,95	4,21	4,39	4,53	4,64	4,74	4,82	4,89	4,95	5,01	5,06	5,19	5,36
8	3,36	3,77	4,00	4,17	4,29	4,40	4,48	4,56	4,62	4,68	4,73	4,78	4,90	5,05
9	3,25	3,63	3,85	4,01	4,12	4,22	4,30	4,37	4,43	4,48	4,53	4,57	4,68	4,82
10	3,17	3,53	3,74	3,88	3,99	4,08	4,16	4,22	4,28	4,33	4,37	4,42	4,52	4,65
11	3,11	3,45	3,65	3,79	3,89	3,98	4,05	4,11	4,16	4,21	4,25	4,29	4,30	4,52
12	3,05	3,39	3,58	3,71	3,81	3,89	3,96	4,02	4,07	4,12	4,16	4,19	4,29	4,41
13	3,01	3,33	3,52	3,65	3,74	3,82	3,89	3,94	3,99	4,04	4,08	4,11	4,20	4,32
14	2,98	3,29	3,47	3,59	3,69	3,76	3,83	3,88	3,93	3,97	4,01	4,05	4,13	4,24
15	2,95	3,25	3,43	3,55	3,64	3,71	3,78	3,83	3,88	3,92	3,95	3,99	4,07	4,18

Интервал сравнения <i>l</i>														
f	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	16	21
16	2,92	3,22	3,39	3,51	3,60	3,67	3,73	3,78	3,83	3,87	3,91	3,94	4,02	4,13
17	2,90	3,19	3,36	3,47	3,56	3,63	3,69	3,74	3,79	3,83	3,86	3,90	3,98	4,08
18	2,88	3,17	3,33	3,44	3,53	3,60	3,66	3,71	3,75	3,79	3,83	3,86	3,94	4,04
19	2,86	3,15	3,31	3,42	3,50	3,57	3,63	3,68	3,72	3,76	3,79	3,83	3,90	4,00
20	2,85	3,13	3,29	3,40	3,48	3,55	3,60	3,65	3,69	3,73	3,77	3,80	3,87	3,97
24	2,80	3,07	3,22	3,32	3,40	3,47	3,52	3,57	3,61	3,64	3,68	3,70	3,78	3,87
30	2,75	3,01	3,15	3,25	3,33	3,39	3,44	3,49	3,52	3,56	3,59	3,62	3,69	3,78
40	2,70	2,95	3,09	3,19	3,26	3,32	3,37	3,41	3,44	3,48	3,51	3,53	3,60	3,68
60	2,66	2,90	3,03	3,12	3,19	3,25	3,29	3,33	3,37	3,40	3,42	3,45	3,51	3,59
120	2,62	2,85	2,97	3,06	3,12	3,18	3,22	3,26	3,29	3,32	3,35	3,37	3,43	3,51
∞	2,58	2,79	2,92	3,00	3,06	3,11	3,15	3,19	3,22	3,25	3,27	3,29	3,35	2,42

Таблица 10

Плотность стандартного нормального закона распределения $p(t)$, $p(t) = \frac{1}{\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{t^2}{2}\right\}$

(результат в таблице задан цифрами после запятой).

Лакин Г.Ф. Биометрия. – М.: Высшая школа, 1990

t	Сотые доли t									
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
0,0	3989	3989	3989	3988	3986	3984	3982	3980	3977	3973
0,1	3970	3965	3961	3956	3951	3945	3939	3932	3925	3918
0,2	3910	3902	3894	3885	3876	3867	3857	3847	3836	3825
0,3	3314	3802	3790	3778	3765	3752	3739	3726	3712	3697
0,4	3683	3668	3653	3637	3621	3605	3589	3572	3555	3538
0,5	3521	3503	3485	3467	3448	3429	3410	3391	3372	3352
0,6	3332	3312	3292	3271	3251	3230	3209	3187	3166	3144
0,7	3123	3101	3079	3056	3034	3011	2989	2966	2943	2920
0,8	2897	2874	2850	2827	2803	2780	2756	2732	2709	2685
0,9	2661	2637	2613	2589	2565	2541	2516	2492	2468	2444
1,0	2420	2396	2371	2347	2323	2299	2275	2251	2227	2203
1,1	2179	2155	2131	2107	2083	2059	2036	2012	1989	1965
1,2	1942	1919	1895	1872	1849	1826	1804	1781	1758	1736
1,3	1714	1691	1669	1647	1626	1604	1582	1561	1539	1518
1,4	1497	1476	1456	1435	1415	1394	1374	1354	1334	1315
1,5	1295	1276	1257	1238	1219	1200	1182	1163	1145	1127
1,6	1109	1092	1074	1057	1040	1023	1006	0989	0973	0957
1,7	0940	0925	0909	0893	0878	0863	0848	0833	0818	0804
1,8	0790	0775	0761	0748	0734	0721	0707	0694	0681	0669
1,9	0656	0644	0632	0620	0608	0596	0584	0573	0562	0551
2,0	0540	0529	0519	0508	0498	0488	0478	0468	0459	0449
2,1	0440	0431	0422	0413	0404	0396	0387	0379	0371	0363
2,2	0356	0347	0339	0332	0325	0317	0310	0303	0297	0290
2,3	0283	0277	0270	0264	0258	0252	0246	0241	0235	0229

**РУКОВОДСТВО
ПО ПРОВЕДЕНИЮ
ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ
ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

Часть первая

Формат 70x100/16. Печ. л. 59.25.
Бумага офсетная. Печать офсетная.
Тираж 500 экз. Заказ № 98.

Отпечатано в ЗАО «Гриф и К»
300062, г. Тула, ул. Октябрьская, 81-а.
Тел.: (4872) 47-08-71, тел./факс: (4872) 49-76-96
E-mail: grif-tula@mail.ru, <http://www.grif-tula.ru>

