

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

**Тема занятия: «Актуальность и проблемы создания новых лекарственных
средств (ЛС)»**

Цель занятия:

Научиться анализировать проблемы создания новых лекарственных средств, а также актуализировать вопросы разработки современных лекарственных препаратов.

Задачи занятия:

- сформировать понятия о современных проблемах фармакологии;
- сформировать общие представления о методах современной фармакологии;
- сформировать представление об истории развития фармакологии как науки;
- разобраться в основных исторических аспектах фармакологии;
- разобрать основные достижения фармакологии в XX-XXI веке;
- разобраться в актуальности и проблеме создания новых лекарственных средств.

Перечень практических навыков:

самостоятельно оценивать актуальность и проблему развития современной фармакологии.

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Разобрать основные понятие темы, изучить историю развития фармакологии, отметить основные проблемы и методы современной фармакологии, указать основные достижения фармакологии в XX-XXI века, разобрать историю кафедры фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя.

Разбор теоретического материала

1 История фармакологии

Длительное накопление наблюдений за действием отдельных лечебных средств предшествовало возникновению фармакологии как научной дисциплины.

В древней Месопотамии знали о лекарственном значении ряда веществ растительного, минерального и даже животного происхождения, зависимости лечебного действия от лекарственной формы (микстура, отвар, паста, ванна, клизма и др.).

Один из древнейших папирусов, сохранившихся в Египте, — это «Сборник рецептов при различных заболеваниях животных и человека». В сборнике упоминаются такие лекарственные вещества, как мак, касторовое масло, белена и др.

Период греческой культуры связан с дальнейшим развитием медицины и лекарствоведения. Гиппократ (460—377 гг. до н. э.) считал болезнь сочетанием гуморально-патологических расстройств организма. В зависимости от расстройств Гиппократ рекомендовал и медикаментозное лечение, рассматривая его как помощь «природной силе», а не как самодовлеющую силу.

В папирусах египетских жрецов указывалось, что приготовленные из них порошки и прочие лекарственные формы должны помогать при болезнях соответствующих частей тела или органов.

Следующей задокументированной вехой можно считать период учения Гиппократа наиболее полно развитое Клавдием Галеном (131—201). Лечение по Галену сводилось к применению средств, действующих противоположно симптомам болезни. Лекарственные вещества Гален делил на простые — действующие холодом, теплом, влажностью, сухостью и т. п., сложные, действующие как кислые, горькие, сладкие, пряные и т. п., и специфические — противовоспалительные, слабительные, закрепляющие и т. п. Особенно велика заслуга Галена в том, что он показал, что кроме лечебных они содержат также балластные вещества.

Влияние восточной культуры на развитие лекарствоведения ярко выражено в трудах Авиценны (Абу Али Ибн-Сина, 980—1037), в частности сочинение

«Канон врачебной науки» — капитальный труд в пяти томах. В «Каноне» приводятся данные о 764 лекарственных средствах. Подробно описываются их свойства, признаки доброкачественности, токсичность, показания и противопоказания к применению.

Из Китая были получены первые сведения о многих препаратах растительного и животного происхождения. Глубоко изучены их лечебные и ядовитые свойства.

Накопленный, в начале Средних веков, материал по лекарствоведению послужил основой для нового направления в фармакологии — ятрохимии (врачебной химии).

Один из наиболее крупных представителей ятрохимии — Парацельс (Филипп Ауреол Теофраст Бомбаст фон Гогенгейм, 1493— 1541) положил начало глубокому анализу состава лекарственных веществ и химического состава организма.

Одним из следующих этапов становления фармакологии стало испытание разрабатываемых лекарственных средств. Иногда это делали сами их изготовители. Вошел в историю медицины Ф. Сертюрнер, который в 1806 г. попробовал выделенный им из опия морфин и погиб из-за передозировки.

Со второй половины XVIII в. интенсивно стала развиваться экспериментальная фармакология, направленная на изучение механизма действия лекарственных веществ и выяснение условий наиболее эффективного их применения.

В середине XIX в. фармакология сформировалась как самостоятельная наука, когда появились экспериментальные методы исследования.

Основоположники экспериментальной фармакологии — Франсуа Мажанди (исследовал эффекты стрихнина) и Клод Бернар (установил механизм влияния кураре на нервно-мышечную передачу).

Годом рождения экспериментальной фармакологии считают 1867-й, когда Рудольф Бухгейм — профессор университета в г. Дерпте (ныне г. Тарту, Эстония) приступил к систематическим испытаниям существовавших тогда лекарств на животных. Первоначально методы испытаний были очень просты,

но и они исключили из списка лекарств большое количество неэффективных или токсичных (ядовитых) веществ.

В 1849 г. профессор Дерптского университета (современный Тарту в Эстонии) Рудольф Бухгейм (1820 — 1879) создал первую в мире лабораторию экспериментальной фармакологии.

В России А. А. Иовский (1796—1844) и другие ученые создали первые оригинальные руководства по фармакологии и фармакогнозии (наука о лекарственных растениях). Разрозненные отечественные исследования по изучению действия и применению лекарственных веществ обобщены А. А. Иовским в руководстве «Начертание общей фармакологии» (1835 г.).

Основы экспериментальной фармакологии заложили А. А. Соколовский (1822—1891), В. И. Дыбковский (1830—1870), О. В. Забелин (1834—1875) и др. Широкие исследования действия лекарственных веществ не только в условиях лабораторий, но и в клинике проводили Н. И. Пирогов, А. М. Филамофитский, И. М. Сеченов, С. П. Боткин. Новым видом лекарственных веществ явились витамины, которые были открыты Н. И. Луниным в 1880 г.

Исключительное влияние на развитие экспериментальной фармакологии оказал И. П. Павлов (1849—1936). Его научная деятельность имеет особенно большое значение для фармакологии: во-первых, потому что она базируется на данных физиологии; во-вторых, потому что И. П. Павлов непосредственно занимался вопросами фармакологии. Основные фармакологические работы И. П. Павлова и его учеников можно разделить на три группы: касающиеся сердечно-сосудистой системы, системы пищеварения и центральной нервной системы.

2 Основные достижения в фармакологии в XX веке

Ученик Бухгейма выдающийся ученый Освальд Шмидеберг (1838 — 1921) руководил кафедрой фармакологии в Немецком институте г. Страсбурга. Он открыл, что камфора выводится из организма в виде глюкуронида. Это стало первым свидетельством химических превращений лекарственных средств в организме. В 1869 г. Шмидеберг совместно с Р. Коппе выделил из мухомора

мускарин и установил сходство действия этого яда и эффектов возбуждения блуждающего нерва.

Появление средств для ингаляционного наркоза — азота закиси (Хорас Уэллс, 1844), эфира (Уильям Мортон, 1846), хлороформа (Джеймс Симпсон, 1847), а также антисептиков — хлорной извести (Игнац Филипп Земмельвейс, 1847) и фенола (Джозеф Листер, 1867) стимулировало интенсивное развитие хирургии. В 1879 г. английский терапевт Уильям Мэррил впервые назначил таблетки нитроглицерина под язык для купирования приступа стенокардии.

Пауль Эрлих (1854 — 1915) описал тучные клетки, доказал существование гематоэнцефалического барьера, разработал оригинальные методы бактериологических и гистологических исследований. Начиная с 1891г. П. Эрлих предложил новые методы фармакотерапии инфекционных болезней, основанные на избирательном действии химиотерапевтических средств на патогенных возбудителей.

Выдающимися достижениями фармакологии стали:

- установление роли дефицита витаминов в патогенезе заболеваний нидерландским врачом Христианом Эйкманом (1890 — 1898) и выделение первого витамина —(тиамин) польским биохимиком Казимиром Функом (1911);
- открытие гепарина американскими физиологами Уильямом Генри Хауэллом и Джейм Мак-Леном (1916) и антикоагулянтов непрямого действия врачом К. Линком (1939);
- создание противоаритмического средства хинидина немецким кардиологом Карлом Фридрихом Венкебахом (1918);
- выделение и применение инсулина для лечения сахарного диабета канадскими физиологами Фредериком Бентингом и Чарльзом Бестом и шотландским физиологом Джоном Маклеодом (1921— 1922);

- открытие пенициллина английским микробиологом Александром Флемингом (1929) и сульфаниламидных средств немецким врачом Герхардом Домагом (1935);
- внедрение бензилпенициллина в медицинскую практику в Великобритании Говардом Флори и Эрнстом Чейном (1940) и в СССР З. В. Ермольевой (1942);
- применение миорелаксанта d-тубокурарина в хирургии канадскими анестезиологами Гарольдом Гриффитом и Джорджем Джонсоном (1942);
- открытие гипогликемического действия производных сульфонилмочевины Марселем Жанбоном и Огюстом Лубатье во Франции (1942 — 1947);
- выделение и установление структуры кортизона швейцарским химиком Тадеушем Райхштейном, получение тироксина и ряда глюкокортикоидов американским биохимиком Эдвардом Кенделлом, применение кортизона при ревматоидном артрите американским врачом Филиппом Хенчем (1943— 1949);
- открытие противотуберкулезного антибиотика стрептомицина американским микробиологом Зельманом Ваксманом (1944);
- исследование первого психотропного средства — нейрорептика хлорпромазина (аминазин) и применение его в практике психиатрии во Франции Анри Лабори, Жаном Делеем и Пьером Деникером (1950 — 1952);
- создание β -адреноблокатора пропранолола (анаприлин) для лечения кардиологических заболеваний и средства терапии язвенной болезни — блокатора гистаминовых H₂-рецепторов циметидина английским фармакологом Джеймсом Блэком (1960-е гг.).

В 1980 — 2004 гг. были открыты изоферменты цитохрома P-450, новые циторесепторы, нейромодуляторы. Больших успехов достигли клеточная инженерия (гибридная технология) и генная инженерия (метод рекомбинантных ДНК).

Иван Петрович Павлов (1849 — 1936) создал физиологические методы, которые позволили исследовать лечебное действие ЛС на системы организма. В 1904 г. исследования И.П. Павлова были удостоены Нобелевской премии.

Николай Павлович Кравков основоположник отечественной фармакологии член-корреспондент Российской АН (1920), академик Военно-медицинской академии (1914), основатель отечественной промышленной токсикологии, эволюционной и сравнительной фармакологии, впервые изучал действие лекарственных средств на эндокринную систему.

3 История отечественной фармакологии

Разобрать историю отечественной фармакологии (приложение 3), а также рассказать об истории кафедры фармакологии и биоинформатики ВолГМУ (Приложение 4)

4 Проблемы и методы современной фармакологии.

Фармакология, с одной стороны, - самостоятельная наука, а с другой - неотъемлемая часть современной терапии, объединяющая теоретические знания и практическую медицину. Фармакология - среда активного информационного обмена между естественнонаучной основой медицины (биологией, химией, физиологией и морфологией) и клиническими дисциплинами (фитотерапией, фармацией и токсикологией).

Значение фармакологии, как связующего звена научных и клинических дисциплин, огромно. Исследование механизмов действия ЛВ помогает расширить представления о химической сущности процессов, происходящих в живых клетках, а также о механизмах функционирования всех систем человеческого организма. В этом случае ЛВ выступают в роли фармакологических «зондов», помогающих оценить наличие, направленность и выраженность ответных реакций со стороны клеток, тканей, органов и систем.

При изучении взаимодействия веществ (любого происхождения) с биологическими системами на различных уровнях организации (молекулярном, субклеточном, клеточном, тканевом, органном, на уровне функциональных

систем и целостного организма) сначала используют экспериментальные модели, а затем приступают к тестированию в человеческом организме.

Цели фармакологии:

1. Создание новых лекарств и обоснование их рационального применения.
2. Изучение новых свойств уже известных лекарств.

Главная задача фармакологии - изыскание новых эффективных и безопасных лекарственных средств.

Основные задачи фармакологии - создание лекарственных средств (ЛС) и обоснование рационального их применения.

Выделяют теоретическую, экспериментальную и клиническую фармакологию. Теоретическая и экспериментальная фармакология составляют фундаментальный раздел науки.

Экспериментальная фармакология - связующее звено между теоретической и клинической фармакологией.

Основные задачи экспериментальной фармакологии.

- Моделирование механизмов взаимодействия ЛС и биологических систем (организм человека или экспериментальная модель) на различных уровнях (субклеточный, тканевой, органной или системный).
- Изучение эффектов взаимодействия организма и вещества.

Существуют три основных методических подхода экспериментальной фармакологии (как основы для решения задач фармакологической науки): биохимический; физиологический; морфологический.

Используя биохимический подход, фармакологи изучают природу реакций взаимодействия между ЛВ и биологическими молекулами. Физиологический и морфологический подходы применяют для анализа вызываемых фармакологическим воздействием изменений функционирования и строения органов и систем.

Самостоятельная работа студентов:

1. Самостоятельная работа студентов с интернет ресурсами содержащими информацию о истории фармакологии.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме (Приложения 2-4).

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Доцент

Д.В. Мальцев

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим досиупа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Приложение 2

Хронология медицины и медицинской технологии

XX век

- 1901: Карл Ландштейнер обнаруживает существование различных групп крови человека.
- 1901: Алоис Альцгеймер идентифицирует первый случай болезни, получившей название: болезнь Альцгеймера.
- 1906: Фредерик Хопкинс указывает на существование витаминов и полагает, что недостаток витаминов является причиной цинги и рахита.
- 1907: Пауль Эрлих разрабатывает химиотерапевтические лекарства от сонной болезни.
- 1908: Виктор Хорсли и Роберт Кларк изобрели метод стереотаксиса и аппарат Хорсли-Кларка.
- 1915: Джесси Макклендон впервые исследовал кислотность желудочного сока человека *in vivo*, сделав, тем самым, первую внутрижелудочную рН-метрию.
- 1917: Юлиус Вагнер-Яурегг применил «лихорадочную» (шоковую) терапию для лечения прогрессирующего паралича.
- 1921: Эдвард Мелланбай открыл витамин D и показал, что его дефицит в организме вызывает рахит.
- 1921: Фредерик Бантинг и Чарльз Бест обнаружили инсулин — важное вещество в лечении диабета.
- 1922: Уолтер К. Альварес впервые сделал электрогастрографию животных и человека.[19]
- 1923: Первая вакцина против дифтерии.
- 1926: Первая вакцина против коклюша.
- 1927: Первая вакцина против туберкулёза.
- 1927: Первая вакцина против столбняка.
- 1928: Александр Флеминг открывает пенициллин.
- 1929: Ганс Бергер открыл электроэнцефалографию человека.
- 1932: Герхард Домагк разрабатывает химиотерапевтическое лечение стрептококка.
- 1933: Манфред Сакель открыл инсулинокоматозную терапию.
- 1935: Ладислас Медуна открыл шоковую терапию с применением пентилентетразола.
- 1935: Первая вакцина против жёлтой лихорадки.
- 1936: Эгаш Мониш разработал префронтальную лоботомию для лечения психических заболеваний.
- 1938: Уго Черлетти и Лючио Бини открыли электросудорожную терапию.
- 1943: Виллем Колфф построил первый аппарат для диализа почек.

1947: Николаев Н.И., Федоринов Д.А. и Горохов В.И. по итогам исследований, проведённых в НИИЭГ, впервые в мире используют стрептомицин для лечения чумы.

1949: Гарольд Ридли имплантировал первый в мире искусственный хрусталик.

1952: Йонас Солк разработал первую вакцину против полиомиелита.

1957: Уильям Грей Уолтер изобрёл электроэнцефалографическую топографию мозга (топоскоп).

1960: Внедрение кардиопульмонарного воскрешения (сердечно-лёгочная реанимация).

1960: Первые комбинированные оральные контрацептивы, одобренные FDA

1962: Первые оральные поливакцины.

1964: Первая вакцина против кори.

1965: Франк Пантридж устанавливает первый портативный дефибриллятор.

1965: Первый коммерческий аппарат УЗИ.

1967: Первая вакцина против эпидемического паротита.

1967: Кристиан Барнард произвёл первую трансплантацию сердца человеку.

1970: Первая вакцина против краснухи.

1971: Годфри Хаунсфилд изобрёл первый коммерческий компьютерный томограф.

1972: Джэймс Блэк создал первый блокатор H₂-гистаминовых рецепторов

1974: Манёвр Хеймлиха (процедура оказания экстренной помощи, используемая для удаления инородных тел из дыхательных путей пациентов, подавившихся едой)

1976: Первый коммерческий позитронно-эмиссионный томограф.

1978: Грэм Кларк установил первый кохлеарный имплантат.

1978: Последний смертный случай от натуральной оспы.

1980: Реймонд Дамадьян построил первый коммерческий магнитно-резонансный томограф.

1981: Первая вакцина против вируса гепатита В

1982: Искусственное сердце: Роберт Джарвик (разработка и имплантация практической модификации Jarvic-7 на базе опытных образцов)

1982: Созданы ингибиторы ангиотензин-превращающих ферментов

1983: Уоренн и Маршалл описывают связь *Helicobacter pylori* с развитием язвенной болезни.

1984: Разработана ударно-волновая терапия

1986: Создан оптический пинцет, Стивен Блок, Говард Берг

1987: Бенджамин Карсон (англ.), руководитель медицинского коллектива из 70 человек в Германии, впервые разделил затылочных (краниопагус) сиамских близнецов.

1987: Разработан первый статин (лекарственный препарат для снижения уровня холестерина).

1989: Синтезирован силденафил (Виагра): Питер Данн, Альберт Вуд

1990: Первая импеданс-рН-метрия пищевода, Дж. Силни

1992: Первая вакцина против вируса гепатита А.

XXI век

2003: Сотрудник международной организации «Врачи без границ» Карло Урбани предупредил ВОЗ об угрозе вируса атипичной пневмонии, запустив самую грандиозную в истории систему мер по борьбе с эпидемией. Урбани сам умер от этой болезни менее чем через месяц.

2006: Получена первая вакцина против вируса папилломы человека.

2006: Разработана вторая вакцина против ротавирусной инфекции (первая была отменена).

Приложение 2

История отечественной фармакологии

На Руси готовили лекарства и лечили болезни знахари, а позже монахи. Они использовали минералы, настои и отвары растений. Со временем в монастырях начали собирать и систематизировать сведения о лечебных травах, создавать рукописные труды по лекарствоведению, например травник «Изборник Святослава» (1073).

В конце XV в. возникло феодальное Московское государство, объединившее разрозненные русские княжества. Во многих городах открыли учреждения аптечного типа - зелейные лавки. Владельцы этих лавок, зелейники, готовили и продавали порошки, мази, настойки и другие лекарства. Нередко это были высокообразованные люди, прекрасно знавшие свойства и действия ЛС, в основном растений. Их знания систематизированы в рукописных книгах-травниках, или зелейниках, а также в вертоградах (вертоград - цветник, сад). Наибольшую известность получил «Благопрохладный вертоград» (1534).

В 1581 году по указу царя Ивана IV в Москве была открыта первая аптека, которая обслуживала только царя и его придворных. Для руководства медицинским делом в начале XVII в. был создан Аптекарский приказ. В функции приказа входили заготовка лекарственных растений; обучение лекарей и специалистов по приготовлению лекарств; обеспечение армии медицинской и лекарственной помощью; проверка медицинских знаний у докторов и аптекарей, приезжавших в Россию. Во многих городах появились аптекарские огороды, где выращивали лекарственные растения.

В эпоху Петра I в фармакологии и аптечном деле произошли существенные изменения: повсеместное открытие аптек, зарождение фармацевтической промышленности, базирующейся на аптекарских огородах в Петербурге на Аптекарском острове, в Лубнах, около Полтавы.

В 1701 году Петр I издал указ о закрытии зелейных лавок и открытии в Москве 8 частных аптек. Одновременно государство ввело монополию на аптеки, устраняя конкуренцию. В XVIII в. наряду с вольными, частными аптеками продолжали существовать и расширяться государственные. Только в аптеках была разрешена продажа ЛС. В 1707 году Аптекарский приказ преобразовали сначала в Аптекарскую канцелярию, а затем - в Медицинскую коллегия и Медицинскую канцелярию. При Аптекарском приказе обучали ремеслу и практическим навыкам лекарей, костоправов, аптекарей. При госпиталях были организованы медицинские школы, в которых изучали медицинские предметы и аптекарское дело.

В 1719 году в Санкт-Петербурге открыт Аптекарский сад, где выращивали лекарственные растения. На государственном уровне стали осуществлять мероприятия по изысканию новых отечественных ЛС.

В 1720-1721 гг. в Санкт-Петербурге создан первый в России завод «казенных врачебных заготовлений» - первое государственное производство по изготовлению ЛС из отечественного сырья.

Первым русским профессором-фармакологом можно считать К.И. Щепина (1728-1770), преподавателя московской госпитальной школы, защитившего диссертацию о лечебных свойствах хлебного кваса.

Иоганн Христиан Керштенс, доктор медицины и философии, профессор химии и минералогии, - первый профессор медицинского факультета Московского университета. 13 августа 1758 года он официально открыл медицинский факультет. Керштенс читал курс о врачебных веществах, так называемое врачебное веществословие и гигиену, а в следующем учебном году - курс химии и натуральную историю простых аптекарских лекарств, освещая происхождение и химические свойства ЛВ, относящиеся главным образом к неорганическим соединениям.

В 1778 году в России была издана на латинском языке первая государственная Фармакопея, а в 1866 году - на русском языке.

Профессор Н.М. Максимович-Амбодик (1744-1812) написал первый учебник по врачебному лекарствоведению (веществословию) «Врачебное веществословие или описание целительных растений», изданный в 1783-1788 гг. в СПб.

В 1835 году заведующий кафедрой врачебного веществословия Московского университета А.А. Иовский (1796-1884) издал учебники «Начертание общей фармакологии» (1835) и «Начертания фармации» (1838). В учебнике «Начертание общей фармакологии» он отмечает, что предмет фармакологии включает все, что охватывает врачебное веществословие: фармакогнозию, фармацевтическую химию, рецептуру во всем ее объеме, фармакодинамику и фармакотерапию. По его мнению, краеугольный камень фармакологии - изучение болезни и организма человека для успешного оказания помощи ЛС при заболевании.

Зарубежные ученые Мажанди (Mageandie), Орфилла Бернард (Orfilla Bernard), исследуя действия ЛВ, положили начало научной фармакологии. В середине XIX в. благодаря внедрению экспериментального метода фармакология стала самостоятельной наукой. Экспериментальная фармакология впервые возникла в Юрьевском университете в 1847 году: Р. Бухгейм (1820-1879) создал первую в мире лабораторию экспериментальной фармакологии.

В дальнейшее развитие науки внесли значительный вклад русские ученые: А.П. Нелюбин, И.А. Двигубский, Е.В. Пеликан, А.А. Соколовский, И.В. Забелин, В.И. Дыбковский, И.М. Сеченов, И.П. Павлов, Н.П. Кравков.

Профессор фармации Императорской медико-хирургической академии Александр Петрович Нелюбин (1785-1858) был сторонником экспериментального изучения действия лекарств и ядов на животных. Он определял фармакологию как систему точных знаний, основанную на изучении химических и физических свойств ЛВ, методов синтеза, приготовления лекарственных форм и их действия в зависимости от состояния организма. И предложил раздельное преподавание фармакологии и фармации, в 1827 году написал руководство по лекарствоведению «Фармакография, или Химико-врачебное предписание приготовления и употребления новейших лекарств», выдержавшее 5 изданий.

Профессор Московского университета Иван Алексеевич Двигубский (1772-1839) способствовал формированию русской ботанической терминологии, развитию отечественного лекарствоведения, внедрению в лечебную практику отечественных лекарственных растений. Главная его работа - «Изображение растений преимущественно российских, употребляемых в лекарствах, и таких, которые наружным видом с ними сходны и часто за них принимаются, но лекарственных сил не имеют» (ч. I, II, 1823, 1829).

Профессор Евгений Венцеславович Пеликан (1824-1884) на кафедре судебной химии и токсикологии Санкт-Петербургской медико-хирургической академии изучал действие кураре и строфанта. Ему принадлежат такие труды, как «Опыт приложения современных физико-химических исследований к учению о ядах», «Исследование о спорынье» (1865), «Руководство к токсикологии» (1879).

Развитию фармакологии помогли труды одного из основоположников отечественной экспериментальной физиологии Алексея Матвеевича Филомафитского (1807-1849). Он первым ввел лекционные демонстрации опытов на животных, утверждая экспериментальный метод в изучении физиологических и патологических процессов. В это время медицинский факультет Московского университета исследовал физиологические действия наркотических средств для выработки показаний, противопоказаний и техники применения. А.М. Филомафитский изучал действие эфира и хлороформа. Анализ механизма действия наркотических веществ посвящена его важнейшая как для фармакологов, так и для клиницистов, работа «Физиологический взгляд на употребление эфиров, хлороформа и бензина как притупляющих нервную деятельность». Здесь рассмотрена последовательность выключения функций различных отделов нервной системы при постепенном усилении наркоза вплоть до наступления смерти. В марте 1847 года под председательством А.М. Филомафитского создан Наркозный комитет, состоявший из двух комиссий: экспериментальной и клинической. В его деятельности участвовали: фармакологи Т.П. Анке и Т.Е. Ляковский, хирурги В.А. Басов, Ф.И. Иноземцев, А.И. Поля, терапевты И.В. Варвинский, А.И. Овера, акушер М.В. Рихтер, химик Г.А. Гивартовский и др. Труды

комитета повлияли на развитие общей анестезии в нашей стране, послужили основой для большой исследовательской работы, проведенной медицинским факультетом во второй половине XIX в.

В 1814 году видный терапевт Устин Евдокимович Дядьковский (1784-1841) стал преподавать курс ботаники и фармакологии при Московской медико-хирургической академии, а двумя годами позже защитил докторскую диссертацию «Рассуждение об образе действия лекарств на человеческое тело». Одновременно он читал лекции по общей патологии, терапии, фармакологии и рецептуре. Ученый утверждал: при определенных внешних влияниях и реакциях организма и яд может оказаться лекарством, и лекарство - ядом.

Талантливый ученик У.Е. Дядьковского адъюнкт К.В. Лебедев также читал курс фармакологии и рецептуры на медицинском факультете. Именно он считал, что лечить надо не болезни, а больного; свои взгляды на медицину изложил в книге «Практическая фармакология» (1842-1848). Хирург Н.И. Пирогов (1810-1881) в эксперименте изучал наркотическое действие эфира, а затем ввел эфирный наркоз в хирургическую практику. В.И. Дыбковский (1830-1870) в Киевском университете изучал кардиотропные вещества и положил начало экспериментальной фармакологии. Профессор кафедры фармакологии Казанского университета И.М. Догель (1830-1916) исследовал влияние ЛВ на сердечно-сосудистую систему.

Согласно «Общему уставу императорских Российских университетов» 1863 года, кафедра врачебного веществословия медицинского факультета Московского университета была разделена на две самостоятельные кафедры: кафедру фармакологии и кафедру фармакогнозии и фармации. С этого времени лекарствоведение на II курсе преподавали на кафедре фармакогнозии и фармации, а на III - на кафедре теоретической и экспериментальной фармакологии с рецептурой и учением о минеральных водах.

Первым заведующим кафедрой фармакологии Московского университета был назначен Алексей Андреевич Соколовский (1822-1891). Он сопровождал чтение лекций по фармакологии экспериментами на животных, организовав для этого специальный фармакологический кабинет, превращенный им же впоследствии в экспериментальную лабораторию, а после его смерти - в фармакологический институт. А.А. Соколовский - автор учебников «Курс органической фармакодинамики, основанной на химико-физиологических началах» (1869), «Неорганическая фармакология, основанная на химико-физиологических началах» (1871), «Руководство общей фармакологии и рецептуры» (1873), «Руководство частной фармакологии» (1875), «Основы общей и частной фармакологии» (1878).

Иван Михайлович Сеченов (1829-1905)-основоположник русской физиологии и научной психологии, выпускник медицинского факультета Московского университета, в 1860 году

защитивший докторскую диссертацию «Материалы для будущей физиологии алкогольного опьянения», затем изучавший действие нейротропных веществ на мышечную систему. В Медико-хирургической академии он заведовал кафедрой, где создал физиологическую лабораторию. И.М. Сеченов написал учебник «Физиология нервной системы», перевел учебник Германа «Основы физиологии». В 1876 году ученый был приглашен на кафедру физиологии Петербургского университета, одновременно читал лекции на Бестужевских женских курсах. В 1889 году стал приват-доцентом Московского университета. Основные труды: «Рефлексы головного мозга» (1866, переиздание 1961), «Психологические этюды: сборник статей» (1873), «Автобиографические записки» (1907), «Физиологические очерки» (1923), «Избранные труды» (1935).

Иван Петрович Павлов (1849-1936) научную деятельность начал в клинике С.П. Боткина, где в течение 11 лет руководил экспериментальной лабораторией. Он изучал действие сердечных гликозидов и жаропонижающих средств. С 1890 по 1895 год И.П. Павлов возглавлял кафедру фармакологии в Военно-медицинской академии в Санкт-Петербурге. Его научная деятельность охватывает три направления исследований: в области кровообращения, пищеварения и физиологии высшей нервной деятельности. Под руководством ученого впервые было исследовано влияние бромидов и кофеина на высшую нервную деятельность; горечей, кислот, щелочей, спирта этилового - на систему пищеварения. И.П. Павлов разработал метод «изолированного сердца», имеющий огромное значение для экспериментальной медицины. Именно он положил начало психофармакологии, а его труды изданы в шести томах «Полного собрания сочинений» (1951-1952).

Начало XX в. отмечено новыми успехами в развитии фармакологии: русскими учеными внедрен метод исследования ЛС на изолированных органах. В 1904 году профессор физиологии Томского университета А.А. Кулябко (1866-1930) в работе «Фармакологические и токсикологические исследования на вырезанном сердце» сообщил об оживлении изолированных сердец животных и человека и об их длительной работе в искусственных условиях вне организма.

Основателем отечественной фармакологии принято считать Н.П. Кравкова (1865-1924). В 1884 году, завершив обучение в гимназии, он стал студентом естественного отделения физико-математического факультета Санкт-Петербургского университета, а в 1888 году поступил на II курс Военно-медицинской академии (ВМедА). Руководство ВМедА оставило молодого выпускника для научной деятельности. Первоначально Н.П. Кравков работал в лабораториях известных ученых, И.М. Сеченова и В.В. Пашутина. В 1894 году, успешно защитив докторскую диссертацию, он был направлен руководством ВМедА в

загранкомандировку. За два года там он познакомился с работой многих лабораторий знаменитых европейских ученых. В 1898 году Н.П. Кравков получил в ВМедА звание приват-доцента (внештатного преподавателя) по общей и экспериментальной патологии, а в 1899 году его назначили экстраординарным профессором кафедры фармакологии ВМедА. И только в 1904 году он получил звание ординарного (штатного) профессора и одновременно стал заведующим кафедрой фармакологии ВМедА, которую возглавлял в течение 25 лет.

Своими фундаментальными открытиями в области фармакологии он обогатил русскую и мировую науку, внес большой вклад в развитие биологии, физиологии и патологии.

Н.П. Кравков - основатель ряда разделов фармакологии, в частности сравнительной эволюционной фармакологии патологических процессов; основоположник отечественной промышленной и военной токсикологии.

Центральные проблемы его научных поисков - изучение механизма физиологического действия лечебного вещества и соотношения такого действия с этиологией и симптоматикой патологических состояний.

В 1904 году Н.П. Кравков приступил к изучению действия фармакологических веществ на изолированных органах. Будучи глубоко убежденным, что фармаколог-экспериментатор должен знать этиологию, патогенез, течение и исход болезней не только человека, но и животных, он говорил: «обладая этими знаниями, исследователь в экспериментах может нарушать в нужном направлении нормальную жизнь животного и впоследствии ее восстанавливать».

Метод изолированных органов лег в основу теории фазового действия ЛВ. Н.П. Кравков связал воедино все стадии взаимодействия химических веществ и тканей органов, изучил и объяснил последовательность стадий. В лаборатории кафедры фармакологии ВМедА им впервые показана зависимость характера эффекта от различного фазового действия ядов, введено понятие стадий вхождения и выхода яда из организма.

Его научные работы затрагивают проблемы общей фармакологии: выяснение зависимости биологического эффекта от концентрации ЛВ, влияние температурных факторов на действие веществ. Большое внимание уделено зависимости фармакологического действия веществ от их химического строения. В лаборатории Н.П. Кравкова изучали действие наркоза и снотворных средств различных химических групп. Под руководством ученого изучено комбинированное действие ЛВ и возможность изменения чувствительности к ним, позже положенные в основу метода комбинированного наркоза.

Разработанные Н.П. Кравковым внутривенный и базисный наркоз нашли широкое применение в медицинской практике во всех странах мира. Именно в трудах этого выдающегося ученого положено начало современным методам базиснаркоза,

парентерального и внутривенного наркоза. Во всем мире внутривенный гедоналовый наркоз известен как «русский метод» обезболивания.

Последние годы своей жизни Н.П. Кравков изучал некоторые проблемы эндокринологии. Важно отметить, что первая в России диссертация о функциях щитовидной железы защищена в 1910 году именно в его лаборатории. Практический результат экспериментов Н.П. Кравкова на эндокринных железах - выделение из перфузата поджелудочной железы гормона, названного им панкреотоксином. По фармакологическим свойствам выделенный гормон подобен инсулину. Панкреотоксин был получен в сухом виде и успешно применен для лечения сахарного диабета. Следует подчеркнуть, что панкреотоксин стали использовать для практических целей еще тогда, когда не было известно о попытке получения зарубежными учеными инсулина из поджелудочной железы. И это дает основание утверждать, что Н.П. Кравков и канадские ученые Бантинг и Бест открыли инсулин независимо друг от друга. К сожалению, из-за смерти ученого многие работы в области эндокринологии не были закончены.

Педагогическая деятельность Н.П. Кравкова занимает одну из славных страниц в истории отечественной фармакологии. Его перу принадлежит двухтомное руководство «Основы фармакологии», выдержавшее 14 переизданий. Этот учебник был востребован во всех медицинских вузах страны.

Н.П. Кравков основал отечественную школу фармакологов, его учениками стали: С.В. Аничков, В.В. Закусов, М.П. Николаев и др. Ведущие направления научной школы Н.П. Кравкова - изучение и поиск новых ЛВ, средств симптоматической и патогенетической терапии. В 1926 году Н.П. Кравкову посмертно присуждена премия им. В.И. Ленина.

С.В. Аничков (1892-1981) был известным фармакологом. Посещая лекции И.П. Павлова в ВМедА, он заинтересовался экспериментальной работой и фармакологией, позже заведовал кафедрами фармакологии в ВМедА им. С.М. Кирова и Ленинградского санитарно-гигиенического института. Под его руководством развернулись систематические исследования по фармакологии вегетативной нервной системы. Он возглавлял отдел фармакологии в институте экспериментальной медицины АМН СССР (1948-1981). Основное направление работ его научной школы - создание и изучение новых фармакологических препаратов на основе их структурного сходства с природными соединениями.

Василий Васильевич Закусов (1903-1986) работал на кафедре фармакологии ВМедА им. С.М. Кирова. В 1936 году защитил докторскую диссертацию «Рефлексы на дыхание при действии ядов на сосуды различных сосудистых областей», заведовал кафедрами фармакологии I и III Ленинградских медицинских институтов, Куйбышевской военно-медицинской академии, I ММИ им. И.М. Сеченова. На протяжении 25 лет был директором основанного им Института

фармакологии АМН СССР, в 1948 году избран членом-корреспондентом, а в 1952 году - действительным членом АМН СССР.

В.В. Закусов создал синаптическую теорию действия фармакологических веществ, успешно развиваемую в работах его многочисленных учеников и сотрудников, - фундамент современных представлений этой области науки. За цикл исследований по фармакологии синаптической передачи В.В. Закусов (совместно с С.В. Аничковым) удостоен в 1976 году Ленинской премии. Большинство работ В.В. Закусова разрабатывают два направления: фармакологию нервной и сердечно-сосудистой системы.

Ближайший ученик и последователь профессора В.В. Закусова - академик РАМН Дмитрий Александрович Харкевич, автор многочисленных трудов в области фармакологии нейротропных средств. С 1964 по 1998 год Д.А. Харкевич возглавлял кафедру фармакологии лечебного и медико-профилактического факультетов I ММИ, затем ММА им. И.М. Сеченова.

В.В. Николаев (1871-1950) посвятил фармакологии 55 лет жизни. В 1895 году он с отличием окончил медицинский факультет Казанского университета и стал работать лаборантом на кафедре фармакологии. Склонность к научной работе он обнаружил еще в студенческие годы. Начинать он в 1892 году в физиологической лаборатории, а спустя год в фармакологической лаборатории провел свою первую экспериментальную работу «К вопросу об иннервации сердца лягушки», подтвердившую гипотезу профессора Юрьевского университета Ф.Г. Биддера о том, что парасимпатический нерв сердца имеет двухнейронное строение и в толще миокарда есть особые структуры, названные впоследствии парасимпатическими ганглиями. В 1921 году В.В. Николаев был избран профессором на кафедре фармакологии в Московском государственном университете, в 1922 году он стал заведующим кафедрой фармакологии лечебного факультета.

Расширению сферы научных интересов Владимира Васильевича Николаева способствовали его зарубежные научные командировки. В начале 30-х годов он работал в лабораториях фармакологии профессоров Шмидеберга в Страсбурге и Томса в Берлине, изучал методы преподавания фармакологии у известных немецких профессоров Штрауба и Тренделенбурга, Гойбнера, Фюнера, Борнштейна и др.

В 1922 году возглавил только что организованное Московское научное общество фармацевтов. При его участии вышли VI, VII и VIII издания Государственной Фармакопеи, в которой ему принадлежат «Таблицы противоядий и пособий при отравлениях», «Список ядовитых и сильнодействующих веществ». В.В. Николаев был ответственным редактором раздела «Фармакология» 1-го издания БМЭ и главным редактором журнала «Фармация и фармакология». Он организовал кафедру фармакологии Смоленского медицинского

института (1923-1928), III Московского медицинского института (1934-1939), Московского стоматологического института (1937-1939). В открытом в 1936 году Московском фармацевтическом институте (в настоящее время фармацевтический факультет ММА им. И.М. Сеченова) В.В. Николаев создал кафедру фармакологии и стал первым ее заведующим (1936-1937 гг.).

В.В. Николаев изучал седативные свойства синюхи, кардиотоническое действие желтушника, фармакологические эффекты хлороформа, атропина, мускарина, никотина, бромидов. С целью дальнейшего развития отечественной фармакологической школы и значительного увеличения объема педагогической работы в 1936 году В.В. Николаев пригласил работать на кафедру М.П. Николаева (1893-1949). Он переведен на кафедру фармакологии I Московского медицинского института из Ленинградской ВМедА им. С.М. Кирова в качестве заведующего кафедрой фармакологии санитарно-гигиенического факультета, где он работал профессором до конца своих дней. Одновременно он получает назначение на заведывание отделом фармакологии и токсикологии ВИЭМ им. А.М. Горького.

Михаил Петрович Николаев - ученик и последователь основоположника отечественной фармакологии Н.П. Кравкова. В 1910 году, после окончания с золотой медалью гимназии, он поступил в ВМедА в Петербурге. Будучи студентом, М.П. Николаев принимал активное участие в работе руководимого Н.П. Кравковым «Кружка теоретической медицины» и в 1912-1913 гг. выполнил там свою первую экспериментальную работу «Влияние питуитрина на рост саркомы у мышей». М.П. Николаевым было написано более 140 работ, посвященных фармакологии сердечно-сосудистых и эндокринных препаратов, а также патологической фармакологии. Он - автор ряда ценных научных работ и двух руководств «Экспериментальные основы фармакологии и токсикологии» (1941) и «Учебник фармакологии» (1948) для студентов фармацевтических факультетов. Он был также редактором журнала «Фармакология и токсикология». По инициативе М.П. Николаева в 1937 году под его председательством была организована первая Всесоюзная конференция фармакологов и токсикологов. С 1940 по 1946 год М.П. Николаев возглавлял кафедру фармакологии фармацевтического факультета.

Большой вклад в дело подготовки провизоров внесла профессор М.М. Николаева. Прекрасный педагог и организатор учебно-методической работы, она много сил и энергии отдала совершенствованию учебного процесса в фармацевтическом институте. М.М. Николаева окончила высшие женские курсы в Петербурге, а в 1925 году I Ленинградский медицинский институт. После окончания института она работала под руководством видного фармаколога В.В. Савича в отделе фармакологии Института экспериментальной медицины в

течение 12 лет, занимая должности препаратора, врача-лаборанта, младшего и старшего научного сотрудника.

С 1943 года М.М. Николаева преподавала на кафедре I ММИ им. И.М. Сеченова, а с 1950 года и до ухода на пенсию руководила кафедрой фармакологии фармацевтического факультета и участвовала в совершенствовании высшего фармацевтического образования в нашей стране. Профессор М.М. Николаева - автор 45 научных работ. Она провела оригинальное научное исследование о локализации действия снотворных и наркотических веществ в центральной нервной системе (ЦНС). Под ее руководством впервые в нашей стране стали изучать влияние ЛВ на процесс свертывания крови.

Большой вклад в развитие фармакологии и фармацевтического образования внес талантливый ученик В.В. Николаева и М.П. Николаева академик РАЕН Александр Николаевич Кудрин. Он заведовал кафедрой фармакологии фармацевтического факультета I ММИ им. И.М. Сеченова с 1961 по 1998 год.

А.Н. Кудрин разработал химико-фармацевтическое направление в фармакологии, включающее изыскание новых ЛС и теорию их целенаправленного создания; отбор наиболее активных соединений и первоначальное изучение характера и механизма их действия; биологический контроль качества и безопасности применения ЛС. Он написал учебник для фармацевтических факультетов «Фармакология с основами патофизиологии» (1977) и учебник «Фармакология» (1991).

В последнее время основы клеточной и молекулярной фармакологии разрабатывают не только фармакологи, но и представители самых различных наук и специальностей: физиологи, биологи, математики, генетики.

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

**Тема занятия: «Методы поиска биологически активных веществ,
влияющих на различные рецепторы»**

Цель занятия:

Научиться анализировать проблемы поиска новых биологически активных веществ, влияющих на различные рецепторы и используемые для этого методы.

Задачи занятия:

- сформировать понятия о биохимической классификации молекулярных мишеней;
- сформировать общие представления о поиске новых ЛС;
- сформировать представление об агент-направленной стратегии поиска;
- разобраться в понятиях активные вещества и соединения-лидеры;
- разобраться в агент-направленной и мишень-направленной стратегии поиска;
- разобрать понятия агонист и антагонист.

Перечень практических навыков:

самостоятельно оценивать методы поиска биологически активных веществ, влияющих на различные рецепторы.

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Разобрать основные понятие темы: биохимическая классификация молекулярных мишеней; активные вещества; соединения-лидеры; агент-направленная и мишень-направленная стратегии поиска; природные и синтетические антагонисты; естественные агонисты и их аналоги.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя.

Разбор теоретического материала

Самостоятельная работа студентов:

По оценкам ведущих фармацевтических компаний процесс создания принципиально нового лекарства(от НИР до серийного производства) в настоящее время занимает не менее 12-15 лет.

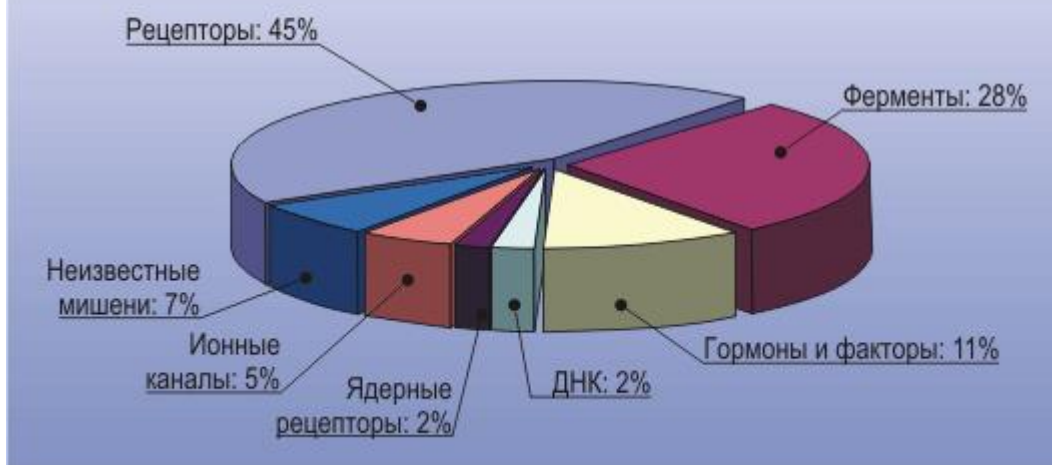
Ускорить процесс и частично сократить огромные затраты можно только на первоначальных этапах НИР, связанных с нахождением новых биологически активных веществ- прототипов будущего лекарства. Последующие этапы проекта, связанные с доклиническими и клиническими испытаниями, в значительной степени регламентированы государственными законами и правилами, что фактически исключает возможность сокращения сроков и материальных затрат.

В последние 10-15 лет при создании новых лекарств наряду с экспериментальными подходами активно стали использовать новейшие биоинформационные технологии.

В качестве мишеней лекарственных средств выступают *рецепторы, ионные каналы, ферменты, транспортные системы, гены.*

Рецепторами называют активные группировки макромолекул субстратов, с которыми взаимодействует вещество.

Биохимическая классификация мишеней, используемых в современной фармацевтической промышленности (всего: 483)



Замена части реальных экспериментов на виртуальные, моделируемые на компьютере, нацелена в первую очередь на ускорение и оптимизацию процесса нахождения веществ-прототипов новых лекарств.

Одним из самых современных направлений является создание структур-прототипов на основе моделирования взаимодействия низкомолекулярного лиганда с белком-мишенью (компьютерное конструирование лекарств на основе структуры макромолекулы-мишени). На текущий момент число известных белков-мишеней, на которые действуют существующие лекарства, составляет несколько сотен.

Биохимическая классификация исследуемых в настоящее время биологических мишеней и их численное соотношение представлены на рисунке. Особо следует отметить, что большую (>60%) долю рецепторов составляют мембранные G-белок сопряженные рецепторы (GPCR, G-protein coupled receptors), а суммарный объем продаж лекарств, направленных на взаимодействие с ними, равняется 65 млрд. долл. ежегодно, и продолжает расти.

Биологически **активные вещества** (сокращено - БАВ) - это особые химические **вещества**, которые обладают при небольшой концентрации высокой активностью к определенным группам организмов (человек, растения, животные, грибы) или к определенным группам клеток.

Соединение-лидер – это структурный прототип будущего лекарства, т.е. **соединение**, обладающее определенной физиологической активностью, на базе которого будет создаваться лекарство.

Рассмотреть вопрос «Рационального дизайна лекарств» можно на примере работы акад. Н.С. Зефирова (Приложение 2)

Направленный поиск заключается в теоретическом предсказании биологической активности вещества на основе исследования ее связи с химической структурой. Поиск ведется с широким использованием методов математического моделирования и заложенных в ЭВМ банков данных об известных ПАВ. Однако современный уровень развития науки не позволяет пока прогнозировать создание новых ЛВ за счет направленной модификации

структур веществ. Слишком сложным является характер связи между химической структурой и биологической активностью. Наши знания физиологических и патологических процессов, молекулярных механизмов действия тех или иных функциональных групп еще недостаточны для теоретически обоснованного прогнозирования терапевтической ценности синтезируемых соединений. Иными словами, пока еще не создана общая теория направленного поиска новых ЛВ.

Эмпирический поиск осуществляется классическим методом проб и ошибок. Исходя из эмпирически установленных закономерностей о влиянии тех или иных функциональных групп на биологическую активность, осуществляют синтез ряда соединений. Затем проводят предварительные испытания, отбирают наиболее активные вещества, которые подвергают всестороннему фармакологическому исследованию.

Для обоснования определения терминов рекомендуется использовать «Глоссарий русскоязычных терминов в медицинской химии» (О. Н. Зефирова с соавт., 2019; Приложение 3). В частности дать определения агент-направленной стратегия: природные и синтетические антагонисты; естественные агонисты и их аналоги.

Привести примеры препаратов, разработанные с использованием указанной стратегии (Приложение 4).

1. Самостоятельная работа студентов с интернет ресурсами содержащими информацию о методах поиска биологически активных веществ, влияющих на различные рецепторы.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме (Приложения 2-4).

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Доцент

Д.В. Мальцев

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим досиупа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Приложение 2

Рациональный дизайн лекарств

авторы: Академик РАН Н. С. Зефилов,
кандидат химических наук О. Н. Зефирова

Физиологическую активность химических соединений открывали, как правило, случайно или путём перебора: химики-органики синтезировали разнообразные типы органических соединений и передавали их биологам на тестирование. Хотя подобный подход вряд ли можно назвать научным, тем не менее с его помощью находили и находят исключительно активные структуры и удачные лекарства. Если посчитать, сколько всего структур может существовать в органической химии (перебор комбинаций атомов кислорода, углерода, водорода и азота), то получается около 10^{180} веществ. Теоретически каждое из них можно синтезировать и испытать, если для этого хватит атомов во Вселенной.

Химическая структура» — основное понятие в органической химии, у химиков-органиков есть две связанные с ним фундаментальные проблемы.

Первая — структурные манипуляции — например, получение необычных структур или умение переходить от одной структуры к другой (то есть от одного вещества к другому). Это очень непростая задача для понимания, поскольку, в отличие от многих других наук, в химии нет механических аналогий.

Вторая проблема — соотнесение структуры и свойств вещества. Ведь человека интересуют именно свойства веществ (чёрное или красное, твёрдое или пластичное, проводит ли ток), а химик-органик должен уметь синтезировать структуру, а потом проверить, обладает ли она нужным свойством.

Сегодня самая сложная задача для органической химии именно вторая — **синтез не веществ, а свойств.**

Химики научились виртуозно манипулировать структурами и могут по заказу делать достаточно сложные вещества. Сейчас уже синтезировано около 20 млн. (2×10^7) соединений. Но из всего этого многообразия дальнейшее применение в клинической практике нашла только одна десятитысячная (10^3 – 10^4 веществ). В связи с этим возникает принципиальный вопрос „Что делать дальше?“ Получать ещё 20 млн. веществ и проверять их активность? А может быть, лучше попытаться понять, какие структуры будут заведомо иметь нужную физиологическую активность, и лишь затем их синтезировать? В настоящее время методология поиска лекарственных соединений существенно изменилась. Большинство химиков пытаются предсказать свойства.

Задача это довольно сложная. Дело в том, что химики, биологи и медики говорят на совершенно разных языках. Например, медик просит сделать препарат для понижения кровяного давления, а биохимик предлагает найти ингибитор ангиотензинконвертирующего фермента, ликвидация активности которого и приведёт к снижению давления. Язык химиков — структурные формулы, поэтому для них такая постановка задачи неприемлема. В ответ они не могут предложить ни конкретную структуру, ни даже класс требуемого соединения. Чтобы создание такого лекарства стало возможным, нужен переводчик биохимической (или фармакологической) информации на язык структурных формул. Роль такого переводчика как раз и играет сформировавшаяся в последние десятилетия поддисциплина органической химии, получившая название „**медицинская химия**“ (medicinal chemistry, от английского medicine — лекарство).

Общая схема

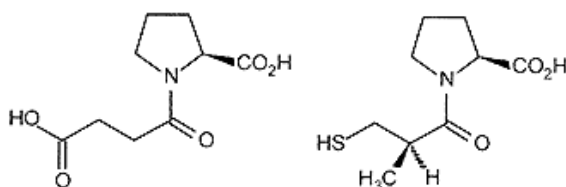


Рис. 1. N-сукцинил-пролин — соединение-лидер при создании препарата каптоприла, понижающего кровяное давление

Итак, основная задача медицинской химии — создание соединений с заранее заданной физиологической активностью, так называемый **рациональный драг-дизайн** (от англ. drug — лекарство). Как же происходит этот процесс? Стратегию рационального дизайна лекарств можно условно разбить на три стадии:

- 1) поиск или „конструирование“ соединений-лидеров,
- 2) оптимизация соединения-лидера
- 3) разработка лекарства.

Начнём по порядку.

Соединение-лидер — это химическое соединение, которое имеет желаемую, интересную, но не оптимальную активность. Это структурный прототип будущего лекарства (рис 1). На первом этапе задача создания лекарства как раз и сводится к тому, чтобы найти его прототип (если, конечно, он не был найден случайным образом).

Соединение-лидер

Чтобы искать соединение-лидер, нужно знать его **биомишень**, то есть макромолекулу в организме человека, на которую наше будущее лекарство должно воздействовать,

связываясь с ней. В подавляющем большинстве случаев такой мишенью бывает белок (обычно рецептор или фермент), но это может быть и молекула ДНК, и другие важные биомолекулы. Стратегия поиска лидеров зависит от того, что известно о его биомишени, а также от того, что известно о структурах уже существующих лигандов, которые с ней связываются (этот лиганд может, например, вырабатываться самим организмом).

Здесь возможно несколько вариантов.

1. Структуры биомишени и лиганда не известны

Если исследователю не известно ничего — ни структура биомишени, ни структура лиганда, то для поиска соединения-лидера используют метод комбинаторной химии (синтез библиотек соединений и их тестирование). Фактически это то же самое, что делали раньше, только на новом технологическом, машинном уровне. Химики синтезируют параллельно многие тысячи веществ и быстро тестируют их на биомишени с применением современной робототехники.

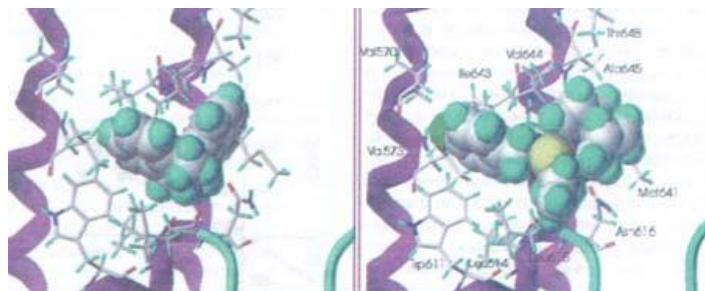


Рис. 2. Сравнительный докинг синтезированного в ИФАВ РАН нейропротектора NT 1525 и известного препарата МК801 в полости белковой молекулы-мишени (NMDA рецептор)

2. Известна структура биомишени

Когда структура мишени известна, а структуру её лиганда мы не знаем, учёные используют методику, которая называется **de novo дизайн**. Создают компьютерную пространственную модель молекулы-мишени, в том числе той её полости, с которой должно связываться лекарство. Потом на компьютере же совмещают эту полость с различными молекулами — кандидатами на роль лидера (эта процедура называется „**докинг**“, по аналогии с заходом корабля в док). При этом структуру гипотетических лидеров нужно подбирать таким образом, чтобы, во-первых, добиться хорошего совмещения размеров молекулы с размером полости, во-вторых, увеличить взаимное связывание молекулы в полости мишени (за счёт слабых взаимодействий: водородных связей, электростатического притяжения, липофильных взаимодействий и т. д.). В результате можно подобрать структуру определённого размера и геометрии, которая хорошо подходит под мишень (рис. 2). Смоделированное соединение синтезируют,

испытывают на активность и, если таковая обнаружится, берут его в качестве соединения-лидера.

3. Известна структура лиганда

Следующий вариант структура лиганда известна, а про его мишень мы ничего или почти ничего не знаем. Тогда лидером выбирают сам этот лиганд.

Конечно же, ситуация упрощается, если в нашем распоряжении есть структуры и биомишени, и воздействующего на неё лиганда. Исследователь заранее знает, для какого класса веществ ему нужно делать докинг, и фактически модифицирует в полости мишени структуру лиганда. Такой способ называется **структурно-обоснованным дизайном**.

Оптимизация

Когда соединение-лидер найдено, начинается второй этап конструирования лекарства — оптимизация. Нужно так изменить соединение-лидер, чтобы оно имело нужную активность, селективность, растворялось в том, в чём удобно, не было токсичным. Естественно, для этого надо менять его структуру. На практике химики синтезируют структурные аналоги соединения-лидера и тестируют их на определённую физиологическую активность. Основная проблема на этой стадии заключается в том, что теоретически количество возможных аналогов огромно. Это значит, что и здесь необходимо применять рациональный подход, позволяющий предсказывать, какие именно аналоги нужно синтезировать. Для этого можно использовать опять же компьютерное моделирование, то есть докинг небольшого количества аналогов соединения-лидера с известной активностью. С его помощью удаётся понять, как расположены друг относительно друга химические группы, важные для связывания с мишенью, а значит, сократить количество синтезируемых аналогов.

В том случае, когда докинг невозможен, потому что неизвестна структура мишени, а есть только информация, что у каких-то веществ есть нужная активность, обычно используют метод **QSAR** (Quantitative Structure-Activity Relationship). Это направление возникло на стыке органической химии, математического моделирования и компьютерной химии. Дословный перевод: количественное соотношение структура-свойство. В русском языке для него нет аббревиатуры, поэтому используют английское сокращение.

QSAR

Исторически всё началось с желания учёных найти количественную связь между структурой вещества и его свойствами и выразить её в виде математического уравнения. Это уравнение должно отражать зависимость одного набора цифр (свойств) от другого набора цифр (структур). Однако при этом возникает трудность. Выразить цифрой свойство достаточно просто — физиологическую активность серии веществ можно измерять количественно. Но как выразить числом структуру химического соединения? Над

этим вопросом химии и математики работали в течение многих лет. В настоящее время в QSAR используются так называемые дескрипторы химической структуры.

Дескриптор — это число (или математический параметр), которое характеризует структуру органического соединения, причём так, что подмечаются какие-то важные черты этой структуры. В принципе любое число, которое можно рассчитать из структурной формулы — молекулярный вес, число определённых атомов, связей или групп, молекулярный объём, частичные заряды на атомах, — может выступать в качестве дескриптора. Например, годится ли в качестве дескриптора (то есть характеризует ли соединение) число атомов углерода в нём? Да, и иногда это хороший дескриптор. А число нитрогрупп? Конечно: чем их больше, тем лучше взорвётся — это дескриптор для взрывчатых веществ.

Для предсказания физиологической активности в QSAR обычно используют следующие дескрипторы:

- электронные эффекты (вливают на ионизацию или полярность соединения)
- стерические особенности структуры (играют важную роль при оценке прочности связывания исследуемого соединения с биомшенью)
- липофильность (способность растворяться в жирах характеризует способность лекарства преодолевать клеточные мембраны)

Большую роль в QSAR имеют так называемые **топологические дескрипторы**. В этом методе структурная формула — чисто математическое понятие, граф. Из теории графов можно посчитать так называемые инварианты графов, которые и рассматриваются как дескрипторы. Применяются и сложные фрагментные дескрипторы, которые оценивают вклад различных частей молекулы в общее свойство. Они значительно облегчают исследователям обратное структурное конструирование неизвестных соединений с потенциально высокой активностью. Модель QSAR — это математическое уравнение, с помощью которого можно описать физиологическую активность (и вообще любое свойство).

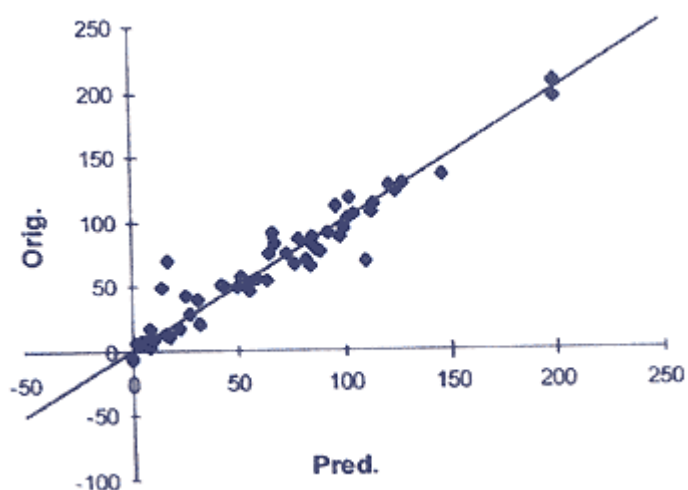


Рис. 3. Пример предсказания активности структур методом QSAR (сравнение экспериментальных и предсказанных данных по ингибированию замещенными индолами захвата Ca^{2+})

Схема работы метода QSAR

Метод QSAR работает следующим образом. Сначала группу соединений с известной структурой и известными значениями физиологической активности (полученными из эксперимента) делят на две части: тренировочный и тестовый набор. В этих наборах цифры, характеризующие активность, уже соотнесены с конкретной структурой. Далее выбираются дескрипторы — хорошие компьютерные программы способны перебирать многие сотни дескрипторов. На следующем этапе строят математическую зависимость активности от выбранных дескрипторов для соединений из тренировочного набора и получают так называемое QSAR-уравнение.

Правильность полученного QSAR-уравнения проверяют на тестовом наборе структур. Сначала вычисляют дескрипторы для каждой из тест-структур, подставляют их в QSAR-уравнение, рассчитывают значения активности и сравнивают их с уже известными экспериментальными значениями (рис. 3). Если для тестового набора наблюдается хорошее совпадение расчётных и экспериментальных значений, то данное QSAR-уравнение можно применить для предсказания свойств новых, ещё не синтезированных структур. С помощью этого метода, имея в арсенале совсем небольшое количество химических соединений с известной активностью, можно предсказать необходимую структуру и тем самым резко ограничить круг поисков.

Метод QSAR широко используют химики во всём мире. Например, если взять выпуски журналов „Chemical reviews“ за последние годы, то только в заголовках статей эта аббревиатура встретится несколько раз. Сейчас издаётся несколько специальных журналов, посвященных QSAR.

Разработка лекарства

Завершающая стадия создания лекарственного соединения — его разработка. Оптимизированный лидер ещё улучшают таким образом, чтобы он стал удобным для клинического использования и приобрёл нужные фармакокинетические характеристики. Часто на этой стадии структуру активных соединений снова изменяют. Здесь много методов с красивыми названиями: создание биоизостеров, пролекарств, пептидомиметиков и т. д. Это сугубо „медхимические“ понятия.

Пролекарства — это вещества, не обладающие выраженной физиологической активностью, но способные превратиться в лекарства уже в организме человека. Происходит это в результате либо ферментативной реакции, либо химической (без

участия белкового катализатора). Чтобы получить пролекарство, обычно модифицируют какую-то реакционноспособную группу в физиологически активном соединении так, чтобы эта связь разрушалась в организме. С помощью пролекарств можно, например, продлить действие препарата, повысить его растворимость в воде и даже изменить его вкус.

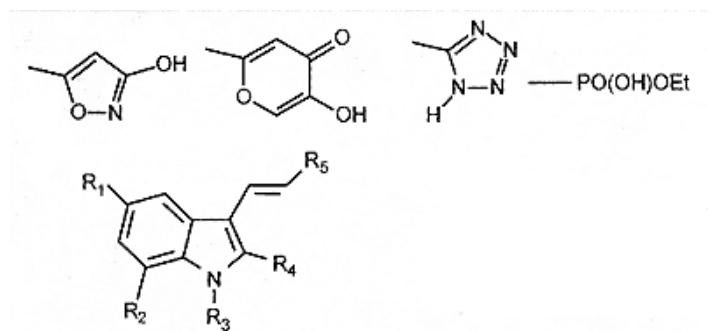


Рис. 4. Примеры группировок, которые кажутся „непохожими“ на карбоксильную группу ($-\text{COOH}$), но тем не менее часто используются вместо неё при биоизостерической замене

Важный метод этого этапа — так называемая изостерическая или **биоизостерическая замена**. Термин „изостеры“ был введён ещё Ирвингом Ленгмюром в начале XX века: „Молекулы или ионы, которые содержат одинаковое число атомов и имеют одинаковое количество и расположение электронов“. Соответственно изостерическая замена в конструируемом лекарстве — это замена атома или группы на похожую по размеру или валентности. Если при этом сохраняется физиологическая активность, то замена называется „биоизостерической“. Интересно, что термин „биоизостер“ относится и к соединениям, получающимся путём замены на совершенно „непохожие“ группировки, но с сохранением биологических свойств (рис. 4). С помощью биоизостерической замены исследователям удаётся, например, уменьшить токсичность активного соединения, повысить его устойчивость к действию ферментативных систем организма и т. д.

Нельзя не упомянуть ещё об одном важном понятии — о „**пептидомиметиках**“. Представим себе, что создаваемое нами лекарство должно подействовать на мишень, природный лиганд для которой — пептид. Этот пептид можно взять в качестве соединения-лидера, однако создавать на его основе нужно пептидомиметик — соединение, способное взаимодействовать с той же мишенью, но содержащее непептидные структурные элементы. Это делают потому, что пептиды в качестве лекарств не слишком удобны: плохо растворяются в воде, легко расщепляются ферментами организма. Хорошие же пептидомиметики лишены этих недостатков.

Естественно, каждая структурная модификация, направленная на улучшение фармакокинетических свойств вещества, приводит к созданию нового химического

соединения. А оно, конечно же, может иметь меньшую активность или вообще другой тип активности. Поэтому исследования, посвящённые разработке лекарств, часто неотделимы от стадии оптимизации с использованием QSAR и компьютерного моделирования.

Такова в настоящее время общая стратегия создания лекарств. Конечно, с появлением современных методов не исчезнут традиционные методы поиска. Однако интеллектуальная привлекательность рационального драг-дизайна, а также успехи молекулярной биологии, благодаря которым становятся известными всё больше биомишеней, привели к тому, что сейчас значительная часть мирового сообщества химиков-органиков стала заниматься синтезом структур с заранее предсказанными свойствами. В нашей стране этому направлению уделяли мало внимания, но сейчас ситуация меняется. В 1997 году на кафедре органической химии химического факультета МГУ им. М. В. Ломоносова появилась отдельная специализация „Медицинская химия“, были сформированы группы исследователей, работающих в области дизайна физиологически активных соединений. Эту дисциплину начинают преподавать и в некоторых других высших учебных заведениях России. В мае 2004 года в Москве впервые прошла Международная конференция по комбинаторной и медицинской химии под эгидой Европейского общества медицинской химии. Рациональное проектирование лекарств — чрезвычайно перспективное и интересное направление химической науки.

„Химия и жизнь — XXI век“

Приложение 2

Драг-дизайн: как в современном мире создаются новые лекарства

А.Чугунов, А. Панов, 2007.

«Индустрия направленного конструирования новых лекарственных препаратов, или, как этот процесс называют, калькируя с английского за неимением такого же короткого и удобного русского термина, драг-дизайн (drug — лекарственный препарат, design — проектирование, конструирование) — сравнительно молодая дисциплина, но все же не настолько молодая, как это принято считать.

К концу девятнадцатого века химия достигла значительной степени зрелости. Была открыта таблица Менделеева, разработана теория химической валентности, теория кислот и оснований, теория ароматических соединений. Этот несомненный прогресс дал толчок и медицине. Новые химические продукты — синтетические краски, производные смол, начали использоваться в медицине для дифференциального окрашивания биологических тканей. В 1872–1874 годах в Страсбурге, в лаборатории известного анатома Вильгельма Валдеера, студент-медик Пауль Эрлих, изучавший селективную окраску тканей, впервые выдвинул гипотезу о существовании хеморецепторов — специальных тканевых структур, специфически взаимодействующих с химическими веществами, и постулировал возможность использования этого феномена в терапии различных заболеваний. Позже, в 1905 году, эта концепция была расширена Дж. Лэнгли, предложившим модель рецептора как генератора внутриклеточных биологических импульсов, который активируется агонистами и инактивируется антагонистами.

Этот момент можно считать рождением хемотерапии и новым витком в фармакологии, и в 20-м веке это привело к беспрецедентному успеху в клинической медицине. Одним из самых громких достижений фармакологической промышленности 20-го века можно по праву назвать пенициллин, антибиотик, открытый в 1929 году Александром Флемингом и исследованный впоследствии Чейном и Флори. Пенициллин, обладающий

антибактериальным действием, сослужил человечеству незаменимую службу в годы Второй мировой войны, сохранив жизни миллионам раненых.

Пораженные успехом пенициллина, многие фармацевтические компании открыли собственные микробиологические подразделения, возлагая на них надежды по открытию новых антибиотиков и других лекарств. Последовавшие успехи биохимии привели к тому, что стало возможным теоретически предсказывать удачные мишени для терапевтического воздействия, а также модификации химических структур лекарств, дающих новые соединения с новыми свойствами. Так, антибиотик сульфаниламид в результате ряда исследований дал начало целым семействам гипогликемических, диуретических и антигипертензивных препаратов. Драг-дизайн поднялся на качественно новый уровень, когда разработка новых лекарственных соединений стала не просто плодом работы воображения химиков, а результатом научного диалога между биологами и химиками.

Новый прорыв был связан с развитием молекулярной биологии, позволившей привлечь к разработкам информацию о геноме, клонировать гены, кодирующие терапевтически важные биологические мишени и экспрессировать их белковые продукты.

Завершение ознаменовавшего начало нового тысячелетия проекта «геном человека», в результате которого была прочитана полная информация, содержащаяся в ДНК человека, явилось настоящим триумфом раздела биологической науки, получившей название «геномика». Геномика дает совершенно новый подход к поиску новых терапевтически важных мишеней, позволяя искать их непосредственно в нуклеотидном тексте генома.»

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

**Тема занятия: «Виды экспериментального скрининга биологической
активности»**

Цель занятия:

Научиться анализировать виды экспериментального скрининга биологической активности

Задачи занятия:

- сформировать понятия о видах экспериментального скрининга биологической активности новых химических веществ;
- сформировать общие представления о поиске новых ЛС;
- сформировать представление о мишень-направленной стратегии: высокопроизводительного (*in vitro*) и виртуального скрининга (*in silico*) новых веществ;
- понять роль медицинской химии в процессе разработки новых ЛС.

Перечень практических навыков:

самостоятельно различать виды экспериментального скрининга биологической активности

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Разобрать основные понятие темы: Виды экспериментального скрининга биологической активности. Мишень-направленная стратегия: высокопроизводительный (in vitro) и виртуальный скрининг (in silico). Биохимический, фармакологический скрининг. Роль медицинской химии в процессе разработки новых ЛС.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя.

Разбор теоретического материала

Самостоятельная работа студентов:

In silico (Псевдо-латынь вместо «in кремний» , ссылаясь на массовое использование кремния для компьютерных микросхем) - это выражение, означающее «выполняется на компьютере или посредством компьютерного моделирования» применительно к биологическим экспериментам. Фраза была придумана в 1987 году как намек на латинские фразы *in vivo* , *in vitro* и *in situ* , которые обычно используются в биологии и относятся к экспериментам, проводимым на живых организмах, за пределами живых организмов, и там, где они встречаются в природе, соответственно.

In vitro (с лат. — «в стекле») — это технология выполнения экспериментов, когда опыты проводятся «в пробирке» — вне живого организма. В общем смысле этот термин противопоставляется термину **in vivo** — эксперимент на живом организме (на человеке или на животной модели).

В последние десятилетия XX века актуальной проблемой научно-исследовательского сектора фармацевтической индустрии стала проблема формирования новых подходов к вопросу создания оригинальных лекарственных субстанций. В фармацевтической индустрии существуют два основных направления разработок — усовершенствование существующих и создание новых лекарственных средств. Все большее внедрение в фармацевтическую отрасль современных технологий позволяет совершенствовать методы создания лекарственных средств. К таким методам следует отнести комбинаторную химию, компьютерное моделирование молекул, виртуальный скрининг, высокоэффективный панельный скрининг. Путем скрининга и случайных наблюдений в свое время были найдены ценные препараты, вошедшие в медицинскую практику. Впервые фармакологический скрининг применил немецкий ученый Герхард Домагк, который проводил поиск антимикробных средств среди соединений, синтезированных для крашения тканей. У одного из этих красителей — красного стрептоцида и было обнаружено противомикробное действие. Так были открыты сульфаниламидные средства. Проведение скрининга — это чрезвычайно

трудоемкий и затратный процесс: для обнаружения одного лекарственного средства исследователю приходится тестировать несколько сотен или тысяч соединений. Так, Пауль Эрлих при поиске противосифилитических средств изучил около тысячи органических соединений мышьяка и висмута, и только один препарат — сальварсан (арсфенамин) оказался достаточно эффективным. Скрининг биологической активности включает в себя следующие этапы:

1. Виртуальный скрининг;
2. Синтез вещества с заданной структурой;
3. Панельный скрининг.

Виртуальный скрининг — это процесс отбора соединений, которые имеются только в электронном виде. Метод виртуального скрининга основывается на том, что ожидаемая биологическая активность напрямую связана со структурой соединения. С помощью таких методов становится возможным предсказание биологической активности как уже имеющегося набора соединений, так и еще не существующих в природе веществ, т. е. еще до синтеза прогнозировать их действие на живые организмы. Например, производные хинолина обладают противотуберкулезной активностью; производные 2–8-бензилпиримидинов используются для создания антигистаминных лекарственных средств; производные 1,5-оксадиазола проявляют гипотензивное действие. Виртуальный скрининг включает следующие этапы:

1. Подготовка модели биомишени (расстановка зарядов на атомах);
2. Подготовка баз данных структур органических соединений (расчет физико-химических свойств, моделирование пространственной структуры соединения, расчет зарядов на атомах);
3. Препроцессинг баз данных (процесс удаления структур по физико-химическим критериям: липофильности, молекулярной массе, по предсказанной токсичности и т. д.);
4. Молекулярный докинг — метод молекулярного моделирования, основанный на предсказании наиболее выгодного положения молекул в пространстве относительно друг друга;

5. Постпроцессинг сформированных баз потенциальных лигандов с помощью моделей QSAR, в результате чего мы получаем сфокусированную библиотеку потенциальных лигандов для данной биомиссии. QSAR — аббревиатура, которая является сокращением от английского Quantitative Structure Activity Relationships, что в переводе на русский язык обозначает Количественное Соотношение Структура — Активность (КССА). В методологии QSAR выделяют прямую и обратную задачи. Прямая задача QSAR заключается в предсказании активности на основе знания структуры соединения. Обратной задачей QSAR является конструирование химических структур с заданными величинами активностей. В методе QSAR структурная формула представляется в математическом виде- модели QSAR, с помощью которой можно описать как биологическую активность, так и любое свойство соединения. Модель QSAR представляет собой линейную зависимость свойство-структура. С помощью метода QSAR становится возможным синтез соединений с заданным комплексом свойств. Помимо виртуального скрининга, основанного на поиске лигандов, существует виртуальный скрининг биологической активности с использованием фармакофоров. Фармакофор — структурный элемент или фрагмент молекулы, обеспечивающий фармакологическую активность соединения. Фармакофорная модель представляет собой набор точек в пространстве с определенными физико-химическими свойствами, местами связывания и расстояниями между ними. Виртуальный скрининг с использованием фармакофорной модели предполагает отбор молекул, удовлетворяющих требованиям данной модели относительно функциональных групп и расстояний между ними. После подбора структуры соединения осуществляют синтез вещества, а затем проводят исследование его биологической активности с помощью панельного скрининга. В 60-е годы XX века разработаны методы иммуноферментного анализа, с помощью которых проводился анализ одного образца на одном биочипе. Такой процесс занимал большое количество времени. В последующие годы технология изучения биологической активности совершенствовалась: изучалось 16 образцов,

включенных в один планшет; планшеты объединили, и стало возможным изучение 64 образцов за раз. В настоящее время анализ биологической активности проводится на биочипе. Биочип — это матрица, на которую наносятся биологические макромолекулы, т. е. биомишени (ДНК, белки, в том числе и ферменты, клетки), способные избирательно связывать вещества, содержащиеся в анализируемом растворе. В качестве биомишеней могут выступать олигонуклеотиды, фрагменты геномной ДНК, РНК, белки, полипептиды, рецепторы антител, лиганды, олигосахариды и т. д. Биочип позволяет определить активность сразу 96 соединений (в отличие от ИФА). Матрицы для биочипа — это стеклянный или гелевый слайд (стандартного размера 25x75x1 мм). Биочипы объединяют в планшет, размеры которого неограничены. Рассмотрим процессы определения биологической активности с помощью ИФА и анализа на биочипе. Анализ биологической активности на иммуночипе начинается с этапа пробоподготовки путем разведения сыворотки. Затем проводят термостатирование и отмывку (для выделения участка или фрагмента молекулы). Добавляют анализируемое вещество, проводят термостатирование с конъюгатом, отмывку продукта и обработку результатов анализа. При проведении анализа с помощью биочипа отсутствуют стадии пробоподготовки, термостатирования и отмывки, т. е. на поверхность биочипа помещают уже готовую биомишень, затем добавляют вещества, биологическую активность которых необходимо изучить. Происходит связывание анализируемых веществ с биомишенью. Добавляют фосфоресцентный метчик, после чего испускается световой сигнал. По характеру свечения или его отсутствию судят о той или иной биологической активности. В качестве сигнальных реактивов или фосфоресцентных метчиков используют длительно люминесцирующие металлопорфирины и комплексоны ионов лантаноидов. Преимущества использования биочипов в анализе биологической активности. Стоимость определения биологической активности с помощью биочипа в разы ниже, чем при использовании набора для ИФА. Использование биочипов в анализе биологической активности позволяет проанализировать одновременно

большое количество соединений за короткий период времени. К недостаткам анализа с помощью биочипов следует отнести материал, из которого они изготовлены (гелевые биочипы подходят для анализа, в котором в качестве биоматериала выступает ДНК, но не белок, это связано с их структурой. Из-за этого возможны искажения результатов анализа). Описанные методы дают возможность провести следующие доклинические испытания: Провести исследования на биологическую активность:

1. Изучить токсичность, мутагенность, кардиотоксичность;
2. Исследовать анальгетическую активность;
3. Исследование протеровоспалительной активности (влияние на эффекты медиаторов воспаления).

Изучить модели заболеваний:

1. Изучение модели заболевания: Болезнь Альцгеймера, болезнь Паркинсона;
2. Изучение онкологических заболеваний (ксенографты);
3. Изучение поведенческих моделей: антидепрессантной, антипсихотической, каталептической, антиамнестической активностей Также с помощью описанных методов можно изучить свойства веществ:

1. растворимость в воде;
2. липофильность ($\log P$);
3. проницаемость через ГЭБ;
4. связывание с белками плазмы крови. Предсказание направления активности соединений имеет особое значение, так как современная фармакология работает более чем с двумя тысячами видами биологической активности. Использование методов рационального досинтетического отбора является необходимым условием успешной реализации исследовательских программ по разработке новых лекарств.

1. Самостоятельная работа студентов с интернет ресурсами содержащими информацию о видах экспериментального скрининга биологической активности.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме (Приложение 2).

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Ассистент

М.В. Мирошников

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим досиупа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Приложение 2

Драг-дизайн: как в современном мире создаются новые лекарства

А.Чугунов, А. Панов, 2007.

Один из самых ранних и самых важных этапов драг-дизайна — выбрать правильную мишень, воздействуя на которую можно специфическим образом регулировать одни биохимические процессы, по возможности не затрагивая при этом другие. Однако, такое не всегда возможно: в развитии большинства заболеваний участвует больше одного белка или гена, а в разных тканях организма нормальные и патологические процессы протекают по-разному.

С наступлением постгеномной эры, определение мишеней происходит с использованием методов сравнительной и функциональной геномики. На основании филогенетического анализа в геноме человека выявляют гены, родственные генам с уже известной функцией, и затем их выделяют (клонировать) для дальнейшего исследования. Кстати, такого рода предсказания уже удаётся довольно качественно формализовать, в результате чего подобные открытия уже под силу не учёным, а роботам.

Однако мишени, чьи функции определены лишь гипотетически, не могут служить отправной точкой для длительной и дорогостоящей разработки. Необходима тщательная экспериментальная валидация (проверка), в результате которой может быть понята конкретная биологическая функция мишени применительно к фенотипическим проявлениям исследуемой болезни.

Существует множество методов экспериментальной валидации мишеней:

Геномные методы позволяют подавлять синтез мишени в тестовой системе путем получения мутантов с генным нокаутом (в которых ген мишени попросту отсутствует) или использования РНК-антисмысловых последовательностей, «выключающих» тот или иной ген;

Инактивация мишени с помощью моноклональных антител или низкомолекулярных лигандов-ингибиторов;

Разрушение мишени, модифицированной хромофором, с помощью лазера;

«Прямая» валидация мишени — установление её взаимодействия с тем или иным соединением (например, методом плазмонного резонанса).

Уровень надёжности валидации повышается с числом модельных животных (специальных генетических линий лабораторных животных), в которых модификация мишени приводит к желаемому фенотипическому проявлению. Высшим уровнем валидации является, несомненно, демонстрация того, что модификация мишени (например, блокирование или нокаут рецептора или ингибирование фермента) приводит к клинически идентифицируемым и воспроизводимым симптомам у человека. Однако по понятным причинам такое можно наблюдать достаточно редко.

При выборе мишени не следует забывать о полиморфизме: любой ген может существовать в нескольких вариантах у разных популяций или рас людей, что может привести к разному эффекту лекарства на разных больных.

Поиск действующего вещества

Когда мишень уже найдена и её роль в развитии заболевания экспериментально подтверждена, начинаются исследования, непосредственным результатом которых являются многочисленные предсказанные структуры химических соединений — потенциальных прототипов лекарств, — лишь немногим из которых суждено стать «конечными» продуктами.

Исследование всех возможных с химической точки зрения соединений («химическое пространство») невозможно: простая прикидка показывает, что возможно не менее 1040 различных лигандов, в то время как с момента возникновения вселенной прошло лишь ~10¹⁷ секунд. Поэтому на возможную структуру лигандов накладывается ряд ограничений, который существенно сужает химическое пространство (оставляя его, тем не менее, совершенно необъятным). В частности, для сужения химического пространства накладываются условия подобия лекарству (drug-likeness), которые в простом случае можно выразить «правилом пяти» Липинского, согласно которому соединение, чтобы «быть похожим» на лекарство, должно:

Иметь менее пяти атомов-доноров водородной связи;

Обладать молекулярным весом менее 500;

Иметь липофильность ($\log P$ — коэффициент распределения вещества на границе раздела вода-октанол) менее 5;

Иметь суммарно не более 10 атомов азота и кислорода (грубая оценка количества акцепторов водородной связи).

Если для «нашей» мишени известны природные агонисты, то один из наиболее очевидных путей — поиск их аналогов, превосходящих свои природные прототипы по требуемым качествам. Однако если такой «отправной точки» нет, или она по каким-то причинам не устраивает исследователей (например, пептиды имеют очень малое «время жизни» в организме, и чаще всего не подходят на роль лекарств), поступают иначе. В качестве стартового набора лигандов в этом случае обычно используют так называемые библиотеки соединений, либо поставляемые на коммерческой основе специализирующимися на этом компаниями, либо имеющиеся в арсенале фармацевтической компании, проводящей разработку нового лекарства. Такие библиотеки могут содержать тысячи и миллионы соединений. Этого, конечно, совершенно недостаточно для тестирования всех возможных вариантов, но этого, как правило, и не требуется. Основная задача на этом этапе — выявление соединений, проявляющих хотя бы небольшую активность требуемого свойства по отношению к мишени. Эти молекулы оптимизируют для увеличения сродства и/или селективности к мишени, и получают «кандидат» — соединение, предназначенное для тестирования на животных (доклинические исследования) и на людях (клинические исследования).

Этап «просеивания» баз соединений осуществляется с помощью высокопроизводительного скрининга — экспериментального (*in vitro* — в лаборатории) или «виртуального» (*in silico* — на компьютере).

Комбинаторная химия и высокопроизводительный скрининг

Скринингом (или сканированием) называется конвейеризованная процедура, в результате которой большое количество химических соединений (>10000) проверяется на аффинность или активность по отношению к специальной тестовой системе, имитирующей биологическую. По производительности различают разные виды скрининга:

Низкопроизводительный (10000-50000 образцов);

Среднепроизводительный (50000-100000 образцов);

Высокопроизводительный (100000-5000000+ образцов).

Для скрининга как для «промышленной» процедуры очень критична эффективность, стоимость и время, потраченное на операцию. Как правило, скрининг производится на роботизированных установках, способных работать в круглосуточном и круглогодичном режиме.

Принцип скрининга достаточно прост: в плашки, содержащие тестовую систему (например, иммобилизованная мишень или специальным образом модифицированные целые клетки), робот раскапывает из пипетки исследуемые вещества (или смесь веществ), следуя заданной программе. Причем на одной плашке могут находиться тысячи «лунок» с тестовой системой, и объем такой лунки может быть очень мал, так же как и объем вносимой пробы.

Потом происходит считывание данных с плашки, говорящее о том, в какой лунке обнаружена биологическая активность, а в какой — нет. В зависимости от используемой технологии детектор может считывать радиоактивный сигнал, флуоресценцию (если система построена с использованием флуоресцентных белков), биолюминесценцию (если используется люциферин-люциферазная система или ее аналоги), поляризацию излучения и многие другие параметры.

Обычно в результате скрининга количество тестируемых соединений сокращается на 3—4 порядка. Соединения, для которых в процессе этого эксперимента выявлена активность выше заданного значения, называются прототипами. Однако следует понимать, что такие «удачи» еще очень и очень

далеки от конечного лекарства. Лишь те из них, которые сохраняют свою активность в модельных системах и удовлетворяют целому ряду критериев, дают предшественников лекарств, которые используются для дальнейших исследований.

Как уже было сказано, даже библиотеки, содержащие более миллиона соединений, не в состоянии представить все возможное химическое пространство лигандов. Поэтому при проведении скрининга можно выбрать две различные стратегии: диверсификационный или сфокусированный скрининг. Различие между ними заключается в составе используемых библиотек соединений: в диверсификационном варианте используют как можно более непохожие друг на друга лиганды с целью охватить как можно большую область химического пространства, при сфокусированном же, наоборот, используют библиотеки родственных соединений, полученных методами комбинаторной химии, что позволяет, зная «приблизительную» структуру лиганда, выбрать более оптимальный его вариант. Здравый смысл подсказывает, что в масштабном проекте по созданию нового лекарственного препарата следует проводить два этих этапа сканирования последовательно — сначала диверсификационный, с целью определения максимально различных классов удачных соединений, а потом — сфокусированный скрининг, с целью оптимизации структуры соединений и получения рабочих прототипов.

Если для мишени известно так называемое биологическое пространство — то есть какие-либо характеристики связываемых ею лигандов (размер, гидрофобность и т. д.), — то при составлении библиотеки тестируемых соединений выбирают лиганды, попадающие в «пересечение» биологического и химического пространств, так как это позволяет отсеять заведомо бесперспективные соединения.

Фармакологический цикл

Структуры прототипов, полученные в результате скрининга, подвергаются не одному раунду модификаций с целью удовлетворить разнообразным требованиям, налагаемым на реальное лекарственное вещество. Эта

оптимизация происходит в тесном сотрудничестве между различными группами исследователей: молекулярными биологами, фармакологами, специалистами по компьютерному моделированию и медицинскими химиками (см. рис. 4).

С каждым оборотом такого «фармакологического цикла» прототип приближается к предшественнику лекарства, который уже тестируется непосредственно на животных (доклинические испытания) и на людях — в процессе клинических испытаний. Таким образом, роль скрининга заключается в существенном (на несколько порядков) сокращении выборки прототипов (см. рис. 5).



Рисунок 4. Фармакологический цикл. Группа молекулярной биологии отвечает за получение мутантных белков-мишеней, группа фармакологии — за измерение данных по активности и аффинности синтезированных лигандов на

мишенях дикого типа и мутантных, группа компьютерного моделирования — за построение пространственной структуры мишеней, предсказание их мутаций и предсказание структур лигандов, группа медицинской химии — за синтез лигандов.



Рисунок 5. Роль высокопроизводительного скрининга в разработке нового лекарственного препарата. Скрининг, будь то его лабораторный (*in vitro*) или компьютерный (*in silico*) вариант, — главная и наиболее ресурсоемкая процедура по выбору стартовых структур лекарств (прототипов) из библиотек доступных соединений. Выходные данные скрининга часто являются отправной точкой для дальнейшего процесса разработки лекарства.

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

Тема занятия: «Понятие о доклинических исследованиях (ДИ)»

Цель занятия:

Научиться анализировать роль доклинических исследований при создании лекарственных препаратов.

Задачи занятия:

- сформировать понятия о доклинических исследованиях;
- сформировать общие представления о роли доклинических исследований;
- сформировать представление о задачах при проведении доклинических исследований;
- разобрать виды доклинических исследований;
- разобрать методы доклинических исследований;
- разобрать этические аспекты проведения доклинических исследований.

Перечень практических навыков:

самостоятельно оценивать задачи доклинических исследований, виды и методы доклинических исследований, оценивать дизайн доклинических исследований.

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Роль ДИ в создании ЛС, задачи ДИ, виды и методы ДИ. Дизайн проведения ДИ.

Этические аспекты проведения ДИ.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя.

Разбор теоретического материала

Самостоятельная работа студентов:

Доклиническое (неклиническое) исследование (preclinical study, preclinical trial) — химическое, физическое, биологическое, микробиологическое, фармакологическое, токсикологическое и другие виды экспериментального изучения или серия исследований вещества (лекарственного средства) путем

применения научных методов оценок в целях изучения специфического действия и/или доказательств безопасности для здоровья человека.

Доклинический кандидат (preclinical candidate) — оптимизированный аналог соединения-лидера (ведущего соединения), обладающий требуемой активностью, высоким уровнем селективности и приемлемым физико-химическим профилем, что обуславливает целесообразность его дальнейшего фармакологического исследования на животных моделях.

Разобрать задачи которые ставятся при проведение доклинических исследований:

оценка эффективности

составление описания препарата

токсичность/безопасность

оценка экономической целесообразности

Классификация доклинических исследований

- По цели
 - фармакологические и токсикологические
- По получаемому результату
 - пилотные (поисковые, разведочные) и опорные
- По используемой модели
 - in vitro, in vivo, in silico
- По GLP-статусу
 - соответствующие GLP и не соответствующие GLP

Классификация доклинических исследований

- Фармакологические
 - Фармакодинамические
 - › Первичная (основная) фармакодинамика
 - › Вторичная (второстепенная) фармакодинамика
 - › Фармакологическая безопасность
- Исследование лекарственной зависимости

- › Фармакодинамические лекарственные взаимодействия
 - Фармакокинетические
- › Абсорбция
- › Распределение и биораспределение
- › Метаболизм
- › Выведение
- › Фармакокинетические лекарственные взаимодействия
 - Токсикологические
 - Общие виды токсичности
 - › Общетокические свойства
 - › Генотоксичность
 - › Канцерогенность
 - › Репродуктивная и онтогенетическая токсичность
 - Специфические виды токсичности
 - › Местная переносимость
 - › Иммунотоксичность
 - › Фотобезопасность
 - › Эндокринологическая токсичность
 - › Токсичность для неполовозрелых животных
 - › Туморогенность и др.
 - Токсикокинетика
 - Исследования экологической безопасности

Обсудить со студентами дизайн доклинического исследования – привести примеры доклинических исследований проводившихся на кафедре фармакологии и биоинформатики ВолгГМУ.

Обсудить этические аспекты проведения доклинических исследований (Приложение 2).

1. Самостоятельная работа студентов с интернет ресурсами содержащими информацию о видах и методах доклинических исследований.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме (Приложения 2).

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Доцент

Д.В. Мальцев

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим досиупа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Приложение 2

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

Тема занятия: «Биологические тест-системы»

Цель занятия:

Научиться анализировать подходы к выбору биологических тест-систем различной иерархии, с опорой на цели и задачи исследования.

Задачи занятия:

- сформировать понятия об иерархичности биологических тест-систем, основанной на разделении уровней организации живого;
- сформировать общие представления о свойствах и назначении биологических тест-систем разной иерархии;
- разобрать примеры различных тест-систем, их возможности и ограничения.

Перечень практических навыков:

На основании критериев выбора тест-систем самостоятельно делать выбор биологической тест-системы подходящего уровня организации.

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время

1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Рабочий план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разобрать основные понятия темы: иерархия организации биологических тест-систем; молекулярно-биологический, клеточный, тканевой и органный, организменный уровни организации биологических тест-систем; критерии выбора биологической тест-системы.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя. Рекомендуется включить во вступительное слово сведения о том, что существуют биологические тест-системы различной сложности, зависящей от уровня организации живой материи, используемой в качестве основы тест-системы. Понятие организации живой материи является ключевым в разграничении тест-систем различного уровня и их классификации. Наиболее простые молекулярно-биологические тест-системы воспроизводят один ключевой процесс, представляющий интерес в направленной разработке лекарственных препаратов. Такие системы обычно не связаны с использованием живых объектов, и используют изолированные биомолекулы (как правило,

высокоорганизованные макромолекулы, например, ферменты, а в некоторых случаях и органические малые молекулы). Наиболее высокоуровневые биологические тест-системы моделируют влияние на изучаемый процесс в целостном организме, чего обычно достаточно в рамках экспериментальных задач. Однако, зависимо задач, краевые иерархические уровни биологических тест-систем могут охватывать тест-системы из нескольких особей, представляющих модель парных взаимоотношений или модель микропопуляции (например, в психофармакологии, при исследовании влияния лечения на социальное поведение животных, или в эпидемиологических исследованиях, при моделировании путей передачи инфекций).

Разбор теоретического материала

Регуляторные и научно-методические основы биологических тест-систем

Проведение доклинических исследований регулируется рядом международных норм, правил и государственных стандартов. Регуляторные нормы основаны на принципах повышения качества получаемых результатов, а также принципах гуманности и минимизации страданий, причиняемых подопытным животным в ходе исследования. В доклинических исследованиях наибольшая роль по информативности извлекаемых данных отведена биологическим тест-системам. Исторически, первыми биологическими моделями, на которых испытывались действия медицинских препаратов, служили животные. Первые упоминания об использовании животных в качестве подопытных относятся еще к античности, а использование нечеловекоподобных животных в биомедицинских исследованиях в ходе развития науки внесло важный вклад в научный прогресс, наблюдаемый в наши дни. Однако процедуры и методы исследования до введения доклинических стандартов были предметом общественных, научных и философских дискуссий.

На сегодня нормы и правила, регулирующие проведение исследований на животных включают Директиву 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза по охране животных, используемых в научных целях (22.09.2010), регламентирующую гуманное обращение с животными и

стандарты ведения исследований, постановление Правительства Российской Федерации от 30.06.2004 N 323 (ред. от 04.09.2020), регламентирующее качество обеспечительных мер по содержанию лабораторных животных, принцип 3R (replacement, reduction and refinement), призванный гуманизировать испытания, проводимые на животных путем снижения числа испытуемых, замены их иными моделями (биологическими тест-системами низшей иерархии) и совершенствования техник исполнения. Данные регуляторные стандарты задают тон и направление развитию биологических тест-систем и связанных с ними биотехнологий.

Учет всех требований, предъявляемых стандартами, возможен: (i) путем увеличения количества и качества извлекаемых данных из животных при минимизации выборки, (ii) путем замены моделей целых животных биологическими тест-системами, основанными на низших уровнях иерархической организации живого.

Использование иерархически более низкоорганизованных форм живой материи в качестве биологических тест-систем способствует одновременному совершенствованию технологий извлечения и качества получаемых данных и минимизации расхода животных (в ряде случаев получение модельных тканей или первичных клеточных культур сопряжено с гибелью животных, но это дает возможность повышения производительности экспериментальных исследований в расчете на одно животное).

Стоит отметить, что переход на биологические тест-системы более низкой иерархической организации сопряжен с технологическими требованиями по хранению и работе с тканями и клеточными культурами и имеет ограничения, связанные с переносом данных на целое животное. Несмотря на ограничения, получаемые преимущества связаны с (i) возможностью направленного действия исследуемого агента на ткань/клетки, экспрессирующие фармакологические мишени, (ii) отсутствием необходимости подтверждать доставку активной молекулы до целевой ткани/клеток, и (iii) исключением некоторых стадий фармакокинетики, способных внести отклонение в результат определения

активности соединения, поскольку в условиях применения животных моделей может быть не ясна природа получаемых результатов.

Ниже приведены иерархически соподчиненные уровни организации живой материи, отражающие уровни их усложнения, и на основе которых могут быть разработаны биологические тест-системы:

1. молекулярный (молекулярно-биологический) уровень;
2. клеточный уровень;
3. тканевый уровень;
4. органный уровень;
5. организменный уровень;
6. популяционно-видовой уровень (используется редко, и только при решении специфических задач).

Далее рассмотрим детальнее наиболее часто используемые иерархические уровни биологических тест-систем.

1. Молекулярно-биологические тест-системы.

Данный вид тест-систем используется наиболее часто в ранней доклинической разработке, задача которой состоит в высокочувствительном и максимально специфичном (без потерь чувствительности) скрининговом отборе соединений-кандидатов для дальнейшей разработки на более сложных моделях. Каждый подобный тест основан на анализе влияния объекта исследования на субъектные детерминанты молекулярного уровня, имеющие доказанное или предполагаемое значение в этиопатогенезе заболевания (например, изучение способности малой молекулы выступать в качестве лиганда к рецептору, где рецептор выступает в роли патогенетически значимого субъекта в терапии заболевания, а исследуемая молекула – в качестве объекта исследования).

Основываясь на принципе определения, молекулярно-биологические тест-системы можно делить на иммунологические (ИФА, иммуноблот), ферментативные (основаны на определении активности фермента по ферментированию субстрата), биохимические (связанные с *in vitro* моделированием биохимических реакций, протекающих в организме в норме и

патологии), радиологические и физические (радиолигандное исследование), генетические (на основе комплементарности нуклеотидных цепей) и др.

Следует отметить, что указанным тест-системам характерна высокая аналитическая чувствительность и специфичность. Однако в условиях изолированной системы, воспроизводящей взаимодействие «лекарство-мишень», сложно переносить результат на более организованные формы живой материи (тем более на целостную живую систему, как человек или животное). Сложность переноса результатов тем выше, чем более низкому уровню организации биоматерии соответствует тест-система. Таким образом, молекулярно-биологические тест-системы дают возможность анализировать влияние соединения на ключевое звено патогенеза, исследовать симплифицированный механизм действия (связывание с рецепторами, ингибирование ферментов, инактивация белков вирусных частиц и др.). При этом, как правило, данные тест-системы не дают возможности предположить действительное наличие фармакологической активности в целостном организме (вещество может не всасываться, может в значительной степени метаболизироваться, может иметь низкую стабильность и разрушаться до попадания в целевой орган и др. причины).

Примечателен факт, что данные тест-системы находят многочисленное применение не только в разработке новых лекарственных средств, но и в клинической лабораторной диагностике в виде наборов ИФА, ПЦР и др.

2. Клеточные, тканевые и органные тест-системы.

Общие сведения о клеточных, тканевых и органных тест-системах

Клеточные и культуральные технологии нашли широкое применение в науке, а модели на основе клеток, в отличие от молекулярно-биологических моделей, предоставляют возможность изучить влияние исследуемого соединения не только на интересующую фармакологическую мишень, но и на простую живую систему. Живой характер биоматерии расширяет возможность использования данных тест-систем по сравнению с молекулярно-биологическими тест-системами.

Данные, полученные в *in vitro* клеточных и культуральных тест-системах, часто используются для проверки токсического действия, оценки токсичности и безопасности (например, МТТ-тест), что представляется сложным при использовании тест-систем молекулярно-биологического уровня. Кроме этого, клеточная тест-система может быть использована в исходном (в виде первичной культуры или в виде клеточной линии) или модифицированном виде как модель для исследования активности соединений, и это существенно повышает ценность получаемых с ее помощью результатов.

В случае использования первичных культур и немодифицированных линий, результативное исследование фармакологической активности достигается путем подбора клеток с типовым метаболизмом, протеомом, геномом, фенотипом (экспрессирующих требуемые ферменты, рецепторы, несущих определенные гены), степень воздействия на что со стороны активной молекулы может быть исследована количественно. К таким клеткам также относятся линии, получаемые с применением протоколов возврата клетки из фазы G0 клеточного цикла, и даже из фазы высокодифференцированной клетки, в состояние плюрипотентности, с последующим «выращиванием» культуры по иному пути своего развития (например, сегодня можно получить человеческие нейроны из клеток эпидермиса людей, имеющих генетическую предрасположенность к неврологическим заболеваниям, и с их помощью разрабатывать эффективные лекарственные препараты).

В случае использования модификаций клеточных линий, особый интерес представляет трансфекция и линии клеток с трансфицированными генами (трансфекция есть перенос геноматериала, кодирующего функциональные элементы, например, определенные человеческие рецепторы, с последующим приобретением возможности клеткой экспрессировать трансфицированную мишень, что дает возможность оценить не только связывание лиганда с мишенью, но и исследовать биологический ответ клетки на связывание).

Стоит отметить, что одна и та же исходная культура может быть амплифицирована в разных условиях культивирования, представлена в разных

форматах и подвергнута воздействию исследуемых объектов разными способами. Например, нормальные клетки кератиноцитов человека можно культивировать в виде монослоя (для анализа поглощения красителя нейтрального красного), или же культивировать на коллагеновой матрице на границе раздела воздух-жидкость (для исследования способности оказывать кожно-раздражающее действие). Две указанные тест-системы созданы для решения разных задач, и их следует рассматривать как разные биологические тест-системы. Подходящим определением клеточной тест-системы будет обозначение культуры как препарата однообразных живых функционирующих клеток в определенной среде, культивируемых на определенной матрице и выращенных в определенных условиях, а не как клеточный массив без привязки к его ультраструктурной организации. По мере того, как тестовые системы усложняются, определение клеточной тест-системы должно дополняться информацией о биологической, химической или физической компоненте в конечном культуральном препарате.

Модели на основе живых тканей в большей степени, чем клеточная культура, учитывают межклеточные взаимодействия. Ткань, используемая в качестве основы для биологической тест-системы, обычно содержит интерстициальный каркас и сохраняет организационную структуру. Такую ткань просто и удобно использовать в качестве основы для тест-системы, позволяющей исследовать механизм действия, при этом ткань незаменима в условиях, когда целью исследования является именно изучение влияния вещества на межклеточные взаимодействия. Примером подобной необходимости является исследование изменений полевой электрофизиологической активности в толстых (150-500 мкм) срезах головного мозга животных или в искусственно выращенных тканях нейроцитов, в ответ на внесение в среду исследуемой молекулы.

Электрофизиологические методы наглядно представляют различия в возможностях клеточных и тканевых тест-систем. Так, технология удержания тока/потенциала (patch-clamp), актуальная в масштабе одного нейрона, позволяет исследовать влияние соединения на массив ионных каналов одной

клетки, и даже на один ионный канал, тогда как полевая регистрация активности в толстом срезе головного мозга обычно не позволяет этого, но дает возможность оценки сетевой активности (оценка нейронных взаимодействий).

Более высоким уровнем организации биологических тест-систем являются тест-системы на основе целых органов и их функциональных элементов. Подобные тест-системы позволяют масштабировать действие биологического вещества на органный уровень, и с большей надежностью переносить данные на уровень организма, подтверждая фактическую фармакологическую активность. Однако зачастую приходится жертвовать способностью системы к надежному определению механизма действия, поскольку применение органных биологических тест-систем не является золотым стандартом для этих целей. В меньшей степени подобное проявляет себя на клеточных и тканевых моделях, но на органном уровне организации биоматерии становится заметным ввиду высокой относительной сложности биологической системы. Подобная потеря связана с тем, что как клетка, так и ткань, так и целый орган – есть система взаимосвязанных соподчиненных логических элементов (рецепторов, каналов, или отдельных клеток в случае ткани и органа), взаимосвязанных между собой паракриной, синаптической, канальной или другой регуляцией, а на молекулярном уровне это дополняется многочисленными вторичными мессенджерами, связанными с мишенями. Сложным представляется доподлинная идентификация механизма действия в части того, действует вещество на рецептор, или на систему его внутриклеточных ассоциированных киназ, является ли эффект результатом воздействия на какой-то определенный тип клеток, или на несколько типов и тд. По этой причине данные методы необходимо комбинировать с молекулярно-биологическими тест-системами.

Преимуществом, однако, является то, что действие вещества изменяет функциональную активность органа, и это может быть зафиксировано с применением чувствительных приборов. Примером такого использования является применение изотонических и изометрических датчиков, оценивающих сократимость фрагментов органов в ответ на фармакологическую или

физическую стимуляцию. Для этого используются, как правило, фрагменты органов с высокой экспрессией целевой мишени (рецептора, фермента, канала). Так, в подвздошной кишке некоторых грызунов высокоизбирательно экспрессируются мю-/дельта-опиоидные рецепторы, а в семенном канатике кролика – каппа-опиоидные рецепторы. Применяя фармакологический активатор (например, морфин в модели оценки электроиндуцированной сократимости подвздошной кишки) на фоне селективных и неселективных блокаторов целевой опиоид-рецепторной системы (например, налоксон, блокирующий опиоидные рецепторы), можно вести исследование опиоид-эргической активности новых соединений, регистрируя изменение интенсивности/силы сокращений органа. При этом надежным образом подтвердить действительную способность соединения связываться с опиоидными рецепторами в рамках данного примера можно оценить только молекулярно-биологическими методами (например, радиолигандным исследованием).

Роль биотехнологий в развитии клеточных и тканевых тест-систем

Потребность в релевантных для человека тест-системах *in vitro* привела к развитию биотехнологий. Надлежащий уровень технологического обеспечения процесса отбора, культивирования, транспортировки клеточных колоний представлен в СССР (Надлежащая практика культивирования клеток). В качестве источника клеточной популяции сегодня используются человеческие стволовые или трансформированные через возврат к плюрипотентной форме клетки, клетки животных. Благодаря достижениям в области генетики и генетического скрининга рутинные методы *in vitro* сегодня включают использование 1) генетически модифицированных клеток, 2) моделей, полученных из стволовых клеток, 3) моделей, полученных из зрелых трансформированных клеток, 4) микрофизиологических систем «орган на чипе» и др., и разработка новых тест-систем быстро прогрессирует. Процесс разработки таких сложных тест-систем требует характеристики биоматериала с точки зрения жизнеспособности, функциональности, генотипических

(выявление линия-специфичных генетических маркеров или типирование) и фенотипических свойств.

3. Биологические тест-системы на основе целого организма.

Биологические тест-системы на основе целостного организма являются наиболее надежными тест-системами для подтверждения действительной способности оказывать искомое фармакологическое действие. Однако, данные тест-системы (подобно тканевым и органным), менее пригодны для детального изучения механизма действия (в основном, для его подтверждения). Данные тест-системы воспроизводят фармакокинетический процессинг соединения в организме (особенности всасывания, метаболизации, экскреции и др.), позволяют воспроизвести путь введения, предполагаемый в клинической практике. Проблемой данных моделей является, как правило, эволюционная дистанция между человеком и субъектом исследования (видом подопытного животного). Несмотря на это, данные тест-системы, как правило, используются для верификации ранее установленного механизма действия.

Особенностью этих моделей также является строгое нормативное регулирование использования животных в эксперименте (рассмотрено в *«Регуляторные и научно-методические основы биологических тест-систем»*).

Самостоятельная работа студентов с интернет ресурсами, содержащими информацию о биологических тест-системах разного уровня сложности.

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Доцент

Р.А. Литвинов

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим досиупа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Приложение 2

Пример протокола проведения МТТ-теста, относимого к тест-системе на основе клеток

Методика подходит для изучения цитотоксичности и жизнеспособности клеток в ответ на действие исследуемого соединения, и проводится на различных клеточных линиях, например, МСF-7 (аденокарцинома молочной железы). При проведении исследования используются реактивы: полная ростовая среда для культивации DMEM, эмбриональная телячья сыворотка, 1%-й раствор пенициллина-стрептомицина, 1%-й раствор незаменимых аминокислот, раствор пирувата натрия 2 мМ, раствор Хэнкса, 0,25%-й раствор трипсина-ЭДТА, диметилсульфоксид, реактив МТТ (бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия), 0,4%-й раствор трипанового синего. В качестве стандарта с выраженным цитотоксическим действием применяют доксорубицина гидрохлорид. В качестве растворителя при приготовлении реагентов используют деионизированную воду высокой степени очистки.

Исследование проводится с применением микропланшетных ридеров (спектрофотометров или спектрофлуориметров), клеточные культуры в процессе проведения исследования сохраняются в CO₂-инкубаторе, а манипуляции проводятся в ламинарном боксе. В процессе исследования проводятся визуальные осмотры культур и микрофотографирование, для чего используется инвертированный микроскоп, способный визуализировать клеточный монослой со стороны прозрачного дна культурального микропланшета.

На первом этапе проводится пассирование клеток в полной ростовой среде DMEM для контроля времени удвоения клеточной линии с целью выбора времени адаптации, необходимого для адгезии клеток, и последующей их инкубации в присутствии исследуемых веществ без пересева. Для процедуры снятия клеточного монослоя применяется метод трипсинизации с последующей оценкой жизнеспособности клеток методом исключения раствора трипанового синего.

На втором этапе исследования для выбора наиболее оптимальной длины волны регистрации оптической плотности при конверсии МТТ-реактива в формазан производится измерение спектров оптического поглощения.

Третьим этапом работы является выбор оптимального числа высеваемых клеток. Для этого производится инкубация разного титра клеток на лунку (например, 25-0,1 тыс.) микропланшета в полной ростовой среде для адгезии клеток ко дну. По истечении времени адаптации производится внесение в лунку раствора доксорубина гидрохлорида (контроль цитотоксичности), раствор Хэнкса (в качестве интактной линии), или исследуемого вещества (веществ).

По истечении времени инкубации веществ, при исключении контакта с дном планшета, производится удаление культуральной среды при помощи вакуумной аспирации. В каждую лунку планшета вносят раствор МТТ-реактива с последующей инкубацией. Для солиubilизации внутриклеточных фиолетовых кристаллов формазана используют раствор ДМСО. Далее осуществляется определение интенсивности оптического поглощения на выбранных длинах волн и последующий расчет процента жизнеспособности клеток в каждой лунке относительно значения поглощения контроля с построением графиков зависимости % жизнеспособных клеток от концентрации доксорубина с последующим расчетом IC_{50} .

Подробнее с описанием метода можно ознакомиться в [Д. С. Яковлев, К. Т. Султанова, Е. А. Золотова, А. Г. Гасайниева, А. А. Спасов. Оптимизация мтт-теста для определения цитотоксичности новых химических соединений на клеточной линии MCF-7. ВОЛГОГРАДСКИЙ НАУЧНО-МЕДИЦИНСКИЙ ЖУРНАЛ 1/2020. С. 58-61].

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

**Тема занятия: «ДИ в соответствии со стандартами надлежащей
лабораторной практики (GLP). Площадка, оборудование и персонал.
Стандартные операционные процедуры (СОП)»**

Цель занятия:

Сформировать понимание цели и основных принципов надлежащей лабораторной практики, регламентирующих проведение доклинических испытаний объектов, содержащихся в лекарственных средствах.

Задачи занятия:

1. сформировать понятия о GLP;
2. сформировать общие представления о принципах организации ДИ в соответствии с GLP;
3. разобрать ключевые требования к организации, испытательному центру, оборудованию и персоналу;
4. сформировать представление о назначении и сущности стандартных операционных процедур.

Перечень практических навыков:

самостоятельно работать с нормативной документацией, регламентирующей организацию ДИ в соответствии с принципами GLP.

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Разобрать основные понятия темы: принципы надлежащей лабораторной практики (GLP), требования к площадке, оборудованию и персоналу при проведении доклинических испытаний, стандартные операционные процедуры (СОП).

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя.

Разбор теоретического материала

Самостоятельная работа студентов:

Good Laboratory Practice (GLP) – надлежащая лабораторная практика. Это международная система норм, правил и требований к лабораториям, которые изучают действие новых химических веществ на человека и окружающую среду, а также правила контроля качества этих исследований и оформления их результатов.

GLP применяют во многих странах мира как обязательный стандарт качества при проведении исследований новых фармацевтических и косметических продуктов, пищевых и кормовых добавок, пестицидов, химических веществ и ветпрепаратов.

Национальная программа реализации принципов надлежащей лабораторной практики Организации экономического сотрудничества и развития (ОЭСР)¹ в деятельности российских испытательных центров (лабораторий) в области неклинических лабораторных исследований объектов, содержащихся в пестицидах, косметической продукции, лекарственных средствах для медицинского применения, лекарственных средствах для ветеринарного применения, пищевых и кормовых добавках, а также в химических веществах промышленного назначения утверждена Распоряжением Правительства Российской Федерации от 28 декабря 2012 г. № 2603-р.

Официальным органом по мониторингу лабораторий и подготовке инспекторов была объявлена Федеральная служба по аккредитации (Росаккредитация). В апреле 2013 года были проведены переговоры с ОЭСР по формату запуска GLP в России. Всего за год была создана законодательная база, а уже в 2014 году началась оценка лабораторий. На конец 2020 года статус соответствия принципам GLP присвоен 12 российским лабораториям, четыре из которых получили подтверждение статуса GLP ОЭСР национальным органом по аккредитации Словакии.

¹ англ. «Organisation for Economic Co-operation and Development» (OECD) – межправительственная экспертная организация, призванная добиться устойчивого экономического роста, занятости и повышения уровня жизни населения, а также содействовать расширению мировой торговли на многосторонней, недискриминационной основе. Главные аспекты работы ОЭСР: анализ, статистика, мониторинг, решения и рекомендации.

Методологическую и нормативную поддержку процесса формирования в России системы надлежащей лабораторной практики обеспечивает Минэкономразвития. Тогда как за регулирование отвечают около десяти федеральных органов исполнительной власти. Сегодня утверждены 15 ГОСТов, которые являются точными переводами соответствующих документов ОЭСР. Разработаны методы испытаний тех видов продукции, на которые распространяется GLP-программа.

Основными актуальными стандартами организации доклинических и лабораторных исследований являются:

1. ГОСТ 33044-2014 Принципы Надлежащей Лабораторной Практики
2. ГОСТ 31883-2012 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Обеспечение качества в соответствии с Принципами GLP
3. ГОСТ 31886-2012 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение Принципов GLP к краткосрочным исследованиям
4. ГОСТ 31891-2012 Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Применение Принципов GLP к исследованиям *in vitro*.

Принципы надлежащей лабораторной практики, представляющие собой систему норм, правил и указаний, предназначены для обеспечения согласованности и достоверности результатов неклинических (доклинических, лабораторных, экспериментальных) исследований.

Принципы надлежащей лабораторной практики определены как система обеспечения качества, касающаяся организации процесса испытаний и условий, в которых неклинические исследования безопасности в области охраны здоровья и экологической безопасности должны быть спланированы, выполнены, проконтролированы и зарегистрированы.

Принципы надлежащей лабораторной практики распространяются на работу фармакологических, токсикологических и других лабораторий биологического профиля, а также на исследования в сфере промышленной токсикологии, а именно на изучение свойств химических соединений,

используемых в производстве потребительских (нелекарственных) товаров в целях оценки их потенциальной опасности для здоровья человека и состояния окружающей среды.

Принципы надлежащей лабораторной практики направлены на обеспечение приемлемости результатов научных исследований на этапе экспериментального изучения новых лекарственных препаратов. Приемлемость в данном случае означает, с одной стороны, доказательность и надежность данных, с другой - соблюдение принципов гуманного обращения с лабораторными животными.

Организация, занимающаяся изучением химической и биологической безопасности как классических химических веществ, так и биотехнологических, генно-модифицированных и нанотехнологических продуктов, должна иметь службу обеспечения качества с целью предоставить гарантии, что помещения, оборудование, персонал, методы и документация соответствуют нормативным требованиям.

Служба обеспечения качества должна быть независимой от персонала, занятого в проведении исследований, однако сотрудники этой службы должны быть знакомы с процедурами проведения исследований и подотчетны непосредственно руководству испытательного центра.

Требования к площадке проведения испытаний

Размеры, устройство и расположение помещений для проведения исследований должны отвечать задачам исследований. Помещения должны быть устроены так, чтобы оказывать минимальное влияние на ход исследований. Помещения должны быть спланированы таким образом, чтобы было обеспечено максимально изолированное проведение исследований различных видов.

Существенной проблемой, в первую очередь для биологических исследований *in vitro*, является возможность загрязнения тест-системы, поэтому испытательные центры должны установить средства обслуживания и

процедуры, которые безусловно предотвращают и/или контролируют вероятность таких загрязнений.

Требования к оборудованию, материалам и реагентам

Должно быть предусмотрено периодическое техническое обслуживание оборудования, используемого в исследовании, включая регулярный профилактический осмотр, чистку, калибровку, в соответствии с СОП. Эти работы должны сопровождаться соответствующими записями. Калибровку следует проводить в соответствии с национальными или международными стандартами измерения.

Калибровка должна при необходимости обеспечивать прослеживаемость измерений, заключающуюся в установлении их связи с основными физическими величинами, поддерживаемыми соответствующими национальными органами. Оборудование следует периодически проверять для обеспечения точности измерения в течение длительного времени. Вещества, используемые для калибровки, должны рассматриваться в качестве стандартных образцов, но не должны подлежать обязательному хранению.

В целом, система GLP позволяет государству получать качественные результаты исследований в сферах, связанных с безопасностью и здоровьем населения. Ещё больше преимуществ приобретает предпринимательство. Во-первых, внедрение принципов GLP экономически целесообразно: соответствующие им лаборатории — это востребованный и дорогостоящий бизнес. Во-вторых, что более существенно, создание GLP-лабораторий в России значительно облегчит доступ отечественных товаров на внешние рынки, избавит производителей и экспортеров российской продукции от необходимости заказывать аналогичные исследования за рубежом или проходить их там повторно. А значит получить документ об оценке экспортного товара обязательным требованиям внешних рынков можно будет дешевле и быстрее.

Для обоснования определения терминов рекомендуется использовать ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Термины и определения» (Приложение 1).

Ознакомиться с основными принципами организации испытаний в соответствии с требованиями GLP, изложенными в ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приложение 2).

1. Самостоятельная работа студентов с интернет-ресурсами, содержащими информацию о методах поиска биологически активных веществ, влияющих на различные рецепторы.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме (Приложения 1, 2).

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Доцент, к.х.н.

Д.А. Бабков

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Выдержки из ГОСТ 33647-2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики (GLP). Термины и определения в переиздании» в переиздании от апреля 2019 г.

3.1 Общие понятия

3.1.1 принципы надлежащей лабораторной практики (principles of good laboratory practice; GLP): Система обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю испытаний в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих испытаний.

Примечание - Принципы GLP - это те, которые согласуются с принципами надлежащей лабораторной практики ОЭСР (ГОСТ 31879).

3.1.2 орган регулирования (regulatory authority): Национальный орган, несущий юридическую ответственность за аспекты контроля химических веществ.

3.2 Организация и персонал испытательных центров

3.2.1 испытательный центр (test facility): Фактическое место проведения неклинических испытаний, в котором должны быть расположены коллектив специалистов, помещения и оборудование, необходимые для их выполнения. Если испытание выполняют на нескольких испытательных площадках, а не в одном месте, то под термином "испытательный центр" понимают центр, где должны быть расположены руководитель испытаний и все испытательные площадки, по отдельности и все вместе рассматриваемые в качестве испытательных центров.

3.2.2 испытательная площадка (test site): Место проведения определенного этапа исследования.

3.2.3 администрация испытательного центра (test facility management): Лицо или лица, официально возглавляющие испытательный центр и ответственные за организацию и соблюдение в нем принципов GLP.

3.2.4 администрация испытательной площадки (test site management): Лицо или лица, официально возглавляющие испытательную площадку и ответственные за проведение на ней соответствующих этапов исследований согласно принципам GLP.

3.2.5 спонсор (sponsor): Физическое или юридическое лицо, которое инициирует исследования, оформляет заказ, поддерживает и/или утверждает проведение неклинических исследований и несет ответственность за его организацию и финансирование.

Примечание - Спонсорами могут быть:

- юридическое лицо, которое инициирует исследования и оказывает поддержку в проведении неклинических исследований в области безопасности здоровья человека и окружающей среды путем предоставления финансовых или других ресурсов;

- юридическое лицо, которое представляет регулирующему органу результаты неклинических исследований в области безопасности здоровья человека и окружающей среды для поддержки регистрации продукта или другого применения, для которого требуется соответствие принципам GLP.

К юридическому лицу могут относиться физические лица, компания, корпорация, ассоциация, научное или академическое учреждение, государственный орган или его организационная единица, а также любые другие юридически идентифицируемые органы (ГОСТ 31888).

3.2.6 руководитель исследования (study director): Лицо, ответственное за проведение неклинического исследования в области медицинской и экологической безопасности от начала до конца.

3.2.7 ответственный исследователь (principal investigator): Лицо, которое, в случае проведения исследований на нескольких площадках, действует от имени руководителя исследования и несет ответственность за переданные в его ведение фазы исследования.

Примечание - Ответственному(ым) исследователю(ям) не может быть полностью передана ответственность руководителя исследования за проведение исследования, поскольку она включает в себя утверждение плана исследования и поправки к этому плану, утверждение заключительного отчета и гарантии, что все исследования соответствуют принципам GLP.

3.3 Неклинические исследования медицинской и экологической безопасности

3.3.1 неклиническое исследование медицинской и экологической безопасности (non-clinical health and environmental safety study): Эксперимент или ряд экспериментов, согласно которым объект испытаний подвергают исследованию в лабораторных, тепличных или полевых условиях для того, чтобы получить данные о свойствах объекта и/или его безопасности и представить их на рассмотрение контролирующим органам.

3.3.2 план исследования (study plan): Документ, описывающий цели и методологию эксперимента для проведения исследования и включающий в себя все внесенные в него поправки.

3.3.3 поправка к плану исследования (study plan amendment): Целенаправленное изменение в плане исследования, внесенное после начала его проведения.

3.3.4 отклонение от плана исследования (study plan deviation): Непреднамеренное отклонение от плана исследования после начала его проведения.

3.3.5 основной план-график (master schedule): График работ обобщающего уровня, включающий в себя укрупненные этапы и ключевые события, т.е. сводку информации, позволяющую оценить рабочую нагрузку и используемую для контроля проведения исследований в испытательном центре.

3.3.6 программа обеспечения качества (quality assurance programme): Программа работ, выполняемых независимым от проведения исследований персоналом и направленными на обеспечение администрацией испытательного центра соблюдения принципов надлежащей лабораторной практики.

3.3.7 стандартные операционные процедуры; СОП (standard operating procedures; SOPs): Подробные письменные инструкции, содержащие описание процессов проведения испытаний или другой деятельности, как правило, не представленных детально в планах исследования или руководствах по проведению испытаний, и предназначенные для достижения единообразия при осуществлении определенной деятельности.

3.3.8 дата начала эксперимента (experimental starting date): Дата получения первых экспериментальных данных.

3.3.9 дата окончания эксперимента (experimental completion date): Дата получения последних экспериментальных данных.

3.3.10 дата начала исследования (study initiation date): Дата подписания руководителем исследования плана исследования.

3.3.11 дата окончания исследования (study completion date): Дата подписания руководителем исследования заключительного отчета.

3.3.12 первичные данные (исследования) (raw data): Оригиналы записей и документов испытательного центра или их заверенные копии, отражающие результаты наблюдений и процедуры, проведенные во время исследования.

Примечание - Первичными данными исследования могут быть: фотографии, микрофильмы, микроплёнки, их копии, дискеты и компакт-диски, рабочие записи, включая записи показаний автоматизированных приборов, и другие носители данных, которые обеспечивают безопасное хранение информации в течение определенного периода времени.

3.3.13 краткосрочное исследование (short-term study): Исследование, проводимое широко распространенными стандартными методами в течение непродолжительного времени.

3.3.14 исследования in vitro (in vitro studies): Исследования in vitro являются исследованиями, при которых не используют многоклеточные организмы целиком, а микроорганизмы или ткани, изолированные от организма, или их моделирование с использованием тест-систем ГОСТ 31886-2012, раздел 2.

Примечание - Многие исследования *in vitro* согласно определению, приведенному в принципах GLP, квалифицируются как краткосрочные. При проведении данных исследований следует использовать для консультации, по мере необходимости, ГОСТ 31886-2012 (см. раздел 2), что позволит облегчить работу руководителя исследования и специалистов отдела обеспечения качества.

3.3.15 исследование на нескольких площадках (*multy-site study*): Под исследованием, проводимым на нескольких площадках, понимается любое исследование, этапы которого проводят более чем на одной площадке. Необходимость в таких исследованиях возникает при использовании площадок, которые удалены по географическому признаку, организационно отделены или разделены иным образом. В таком случае один отдел исследовательской организации действует в качестве испытательной площадки, в то время как другой отдел этой же организации выступает в качестве испытательного центра.

3.3.16 тест-система (*test system*): Биологическая, химическая или физическая система в отдельности или в комбинации, используемая в исследованиях.

3.3.17 тестируемый объект (*test item*): Объект, представляющий собой предмет исследования.

3.3.18 образец (*specimen*): Любой материал, взятый из тест-системы для изучения, анализа или хранения.

3.3.19 стандартный объект (образец) (*reference item*): Объект (образец), используемый для сравнения с испытуемым объектом, имеющий официально (юридически) удостоверенный состав.

2 Руководящие указания по проведению исследований *in vitro* во многих случаях предписывают использование соответствующих объектов положительного, отрицательного контроля и/или контроля реактива (разбавителя, растворителя), которые, однако, не могут служить в качестве "стандартных объектов" для классификации ответа тест-системы на тестируемый объект (согласно определению в принципах GLP), а скорее для контроля надлежащей характеристики тест-системы (ГОСТ 31886). Так как цель использования этих объектов положительного, отрицательного контроля и/или контроля реактива может быть рассмотрена как аналог цели использования стандартного объекта (образца), определение последнего может также охватывать термины "объекты положительного, отрицательного контроля и/или контроля реактива" (см. далее).

3.3.20 партия (*batch*): Определенное количество испытуемого или стандартного объекта, полученное в течение определенного производственного цикла таким способом, что этот объект имеет однородный характер.

Примечание - Допускается применение термина "серия" (*lot*).

3.3.21 носитель (vehicle): Вещество, используемое для смешивания, диспергирования или растворения тестируемого либо стандартного объекта и позволяющее облегчить его введение в тест-систему.

3.3.22 клеточные линии (cell lines): Клетки, которые подверглись генетическому изменению для иммортализации и в результате способны размножаться в течение длительного периода *in vitro*, а также могут распространяться и подвергаться криоконсервации в качестве депозитов банка клеток. Непрерывная клеточная линия, как правило, более однородна, более стабильна и, следовательно, более репродуктивна, чем неоднородная популяция первичных клеток (ГОСТ 31886).

3.3.23 первичные клетки (primary cells): Клетки, недавно извлеченные из животных или растительных источников. Недавно извлеченные первичные клетки могут быстро потерять способность к дифференцированию в культуре и часто имеют ограниченный срок жизни. Первичные культуры, извлеченные из животных или людей, могут представлять собой гетерогенные популяции по отношению, например, к различиям в типах клеток и состоянию дифференциации в зависимости от используемых методов очистки. Каждый изолят уникален, и его невозможно воспроизвести в точности. Первичные культуры клеток обычно требуют комплексных питательных сред, дополненных сывороткой и другими компонентами. Следовательно, системы первичной культуры клеток крайне сложно стандартизировать (ГОСТ 31886).

3.3.24 патентованный материал (proprietary material): Материал, защищенный законами от незаконного использования (патент, авторское право, товарные знаки) (ГОСТ 31886).

3.3.25 отрицательный контроль (control, negative): Отдельная часть тест-системы, обработанная объектом (образцом), в отношении которого известно, что ответной реакции тест-системы на него не последует; отрицательный контроль свидетельствует о том, что тест-система не выдает ответной реакции в конкретных условиях анализа (ГОСТ 31886).

3.3.26 положительный контроль (control, positive): Отдельная часть тест-системы, обработанная объектом (образцом), в отношении которого известна ответная реакция тест-системы; положительный контроль свидетельствует о том, что тест-система выдает ответную реакцию в конкретных условиях анализа (ГОСТ 31886).

3.3.27 необработанный контроль (control, untreated): Отдельная необработанная часть тест-системы, которая хранится в первоначальных условиях культивирования; необработанный контроль предоставляет исходные данные о тест-системе в условиях проведения анализа (ГОСТ 31886).

3.3.28 контроль растворителя (control, vehicle): Отдельная часть тест-системы, к которой добавлен растворитель (разбавитель, носитель), предназначенный для определенного тестируемого образца (объекта); контроль растворителя предоставляет свидетельство об отсутствии влияния выбранного растворителя на тест-систему в фактических условиях проведения анализа (ГОСТ 31886).

3.3.29 ткани (tissues): Многоклеточные совокупности дифференцированных клеток, характеризующихся конкретными функциями, в качестве компонентов организмов (ГОСТ 31886).

3.3.30 исследование ex vivo (ex vivo): Проведение экспериментов в живой ткани, перенесенной из организма в искусственную внешнюю среду, например использование клеток, тканей или органов, извлеченных из интактных животных, для дальнейшего анализа (эксперимента) (ГОСТ 31886).

3.3.31 геновая трансфекция (gene transfection): Ввод чужеродной суплементарной ДНК (одного гена или несколько генов) в клетку-хозяина (ГОСТ 31886).

3.3.32 трансгенные клетки (transgenic cells): Клетки, трансфектированные одним (или несколькими) чужеродным(ыми) геном(ами) и вследствие этого обладающие характеристиками и функциями, которые обычно не присутствуют или присутствуют только при низких уровнях экспрессии в родительской клетке (ГОСТ 31886).

3.3.33 микрочипы (биочипы) (micro-arrays): Комплексы миниатюрных химических реакционных зон, расположенные в определенном порядке и нанесенные на твердую матрицу, например предметное стекло. ДНК-биочип представляет собой средство сравнения известных и неизвестных образцов ДНК на основе принципа комплементарности нуклеотидных оснований и позволяет автоматизировать процесс идентификации неизвестных образцов ДНК для использования в зондировании биологического образца с целью определения экспрессии гена, маркера модели гибридизации или нуклеотидной последовательности ДНК/РНК (ГОСТ 31886).

Примечание - Допускается применение термина "биочипы".

3.3.34 токсикогеномика (toxicogenomics): Исследование того, как геномы реагируют на экологические стресс-факторы или токсиканты. Цель токсикогеномики - найти корреляцию между реакциями на токсиканты и изменениями в генетических профилях объектов, подвергнутых воздействию таких токсикантов. Токсикогеномика сочетает в себе новые технологии геномики и биоинформатики для выявления и характеристики механизмов действия известных и предполагаемых токсикантов. В настоящее время основными инструментами токсикогеномики является ДНК-микрочип (или ДНК-чип), который

используют для одновременного мониторинга уровня экспрессии сотен и тысяч генов (ГОСТ 31886).

3.3.35 токсикометабономика (toxicometabonomics): Количественное измерение зависящей от времени многопараметрической метаболической реакции живых систем на патофизиологические стимулы или генетическую модификацию путем систематического исследования состава биологической жидкости с помощью ядерного магнитного резонанса (ЯМР) и технологии распознавания моделей для того, чтобы связать токсичность органа-мишени со спектральными ЯМР-моделями и идентифицировать новые суррогатные маркеры токсичности (ГОСТ 31886).

3.3.36 токсикопротеомика (toxicoproteomics): Исследование того, как общая экспрессия белка в клетке или ткани реагирует на экологические стресс-факторы или токсиканты. Цель токсикопротеомики - найти корреляцию между токсическими реакциями на токсиканты и изменениями в полных профилях комплексов белков объектов, подвергнутых воздействию таких токсикантов (ГОСТ 31886).

3.3.37 тест-набор (test kit): Готовый к использованию набор, включающий все компоненты, необходимые для проведения анализа, испытания (тестирования) или исследования (ГОСТ 31886).

3.3.38 асептические условия (aseptic conditions): Условия, существующие и предусмотренные для рабочей среды, при которых минимизируется возможность микробного и/или вирусного заражения (ГОСТ 31886).

3.3.39 перекрестное загрязнение (cross-contamination): Загрязнение тестируемого образца (объекта) или тест-системы другим тестируемым образцом или тест-системой, которые вносятся непреднамеренно, заражают тестируемый образец или повреждают тест-систему (ГОСТ 31886).

3.3.40 криоконсервация (cryopreservation): Хранение клеток и тканей в замороженном состоянии в условиях, когда их жизнеспособность сохраняется (ГОСТ 31886).

3.3.41 криовиала (cryovial): Специальный сосуд для криоконсервации. Криовиала должна соответствовать таким особым условиям, как герметичность закрытия, даже при экстремально низких температурах и резких перепадах температур, возникших в ходе замораживания и оттаивания (ГОСТ 31886).

3.3.42 критические фазы (critical phases): Индивидуальные, конкретные виды процедур или деятельности в рамках исследования, от корректного выполнения которых в критической степени зависят качество, достоверность и надежность исследования (ГОСТ 31886).

3.3.43 высокопроизводительный скрининг (high through-put screening): Использование миниатюризированной роботизированной технологии для скрининга крупных библиотек соединений на предмет выявления изолированного гена-мишени, белка, клетки, ткани и т.д., чтобы выбрать соединения на основе конкретных видов активности для проведения дальнейших разработок (ГОСТ 31886).

3.4 Мониторинг соответствия GLP

3.4.1 мониторинг соответствия GLP (GLP Compliance Monitoring): Периодическое инспектирование испытательных центров и/или аудит исследований с целью подтверждения соблюдения принципов GLP (ГОСТ 31879).

3.4.2 программа соответствия GLP (национальная) (GLP compliance programme, national): Определенная схема, установленная для мониторинга соответствия испытательных центров GLP в пределах своей территории, посредством инспекций и аудитов исследования (ГОСТ 31879).

3.4.3 орган мониторинга GLP (национальный) (GLP monitoring authority, national): Орган, отвечающий за мониторинг соответствия испытательного центра GLP в пределах своей территории и за выполнение других подобных функций, касающихся GLP, которые могут быть определены на национальном уровне. Следует отметить, что в стране может быть создано несколько таких органов (ГОСТ 31879).

3.4.4 инспекция испытательного центра (test facility inspection):

Проверка процедур и нормативов на площадках испытательного центра для оценки степени соответствия принципам GLP. В ходе инспекций проверяют структуру управления и операционные процедуры испытательного центра, проводят собеседование с ключевым техническим персоналом, оценивают качество и целостность данных, полученных испытательным центром, и подготавливают отчет (ГОСТ 31879).

3.4.5 аудит исследования (study audit): Сравнение первичных данных и соответствующих записей с промежуточными и заключительными отчетами с тем, чтобы определить, были ли первичные данные точно отражены в отчетах, было ли испытание проведено в соответствии с планом исследования и стандартными операционными процедурами, чтобы получить дополнительную информацию, не представленную в отчете, а также установить, были ли использованы в формировании данных нормативы, которые наносили бы ущерб их достоверности (ГОСТ 31879).

3.4.6 инспектор (inspector): Лицо, которое производит инспектирование испытательного центра и аудиты исследований от имени органа (национального) мониторинга GLP (ГОСТ 31879).

3.4.7 статус соответствия GLP (GLP compliance status): Степень соответствия испытательного центра принципам GLP по оценке органа (национального) мониторинга GLP (ГОСТ 31879).

Выдержки из ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» в переиздании от апреля 2019 г.

1 Область применения

Настоящий стандарт устанавливает Принципы надлежащей лабораторной практики, предназначенные для применения при проведении неклинических исследований безопасности объектов испытаний, содержащихся в лекарственных средствах, пестицидах, косметической продукции, ветеринарных препаратах, пищевых и кормовых добавках, а также химических веществах промышленного назначения. Объекты испытания, чаще всего, являются синтетическими веществами и их смесями, но также могут быть натурального или биогенного происхождения, а в отдельных случаях представлять собой живые организмы. Цель испытаний состоит в том, чтобы получить данные о свойствах объектов испытаний и/или об их безопасности для здоровья человека и/или окружающей среды.

Принципы надлежащей лабораторной практики распространяются на неклинические исследования медицинской и экологической безопасности, которые включают в себя исследования, проводимые в лабораторных, тепличных и полевых условиях. Принципы надлежащей лабораторной практики применимы для всех неклинических исследований медицинской и экологической безопасности, требуемых законодательством в целях регистрации или лицензирования лекарственных средств, пестицидов, пищевых и кормовых добавок, косметической продукции, ветеринарных препаратов и других подобных продуктов, а также химических веществ промышленного назначения, за исключением случаев, особо оговоренных в соответствии с национальным законодательством.

3 Принципы надлежащей лабораторной практики

3.1 Организация и персонал испытательного центра

3.1.1 Обязанности администрации испытательного центра

3.1.1.1 Администрация испытательного центра должна гарантировать, что принципы надлежащей лабораторной практики будут соблюдены в полном объеме.

3.1.1.2 В частности, администрация должна:

а) утвердить положения, согласно которым определяют лицо(а), выполняющее обязанности руководства согласно Принципам надлежащей лабораторной практики;

б) обеспечивать наличие в достаточном количестве компетентного персонала, соответствующих помещений, оборудования и материалов, необходимого для своевременного и надлежащего проведения исследования;

с) обеспечивать поддержание в актуальном состоянии документации об уровне квалификации, образовании, опыте работы и должностных обязанностях специалистов и технического персонала;

d) гарантировать четкое понимание своих обязанностей сотрудниками, и, при необходимости, обеспечивать им соответствующее обучение и подготовку;

e) нести ответственность за выполнение исследовательских работ в соответствии с действующими стандартными операционными процедурами; утверждать все действующие стандартные операционные процедуры и поправки к ним;

f) нести ответственность за организацию программы обеспечения качества с назначенным персоналом и ее реализацию в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики;

g) назначить до начала исследования в качестве руководителя исследования сотрудника, имеющего соответствующее образование, квалификацию и опыт работы. Замена руководителя исследования должна проводиться в соответствии с установленным порядком и должна быть документирована;

h) назначать, в случае необходимости, при проведении исследования на нескольких испытательных площадках ответственного исследователя, который обладает соответствующим образованием, квалификацией и опытом, чтобы контролировать проведение данного этапа (этапов) исследования. Замена ответственного исследователя должна проводиться в соответствии с установленным порядком и должна быть документирована;

i) гарантировать, что план исследования будет документально утвержден руководителем исследования;

j) гарантировать, что руководитель исследования предоставит службе по обеспечению качества доступ к утвержденному плану исследования;

k) обеспечивать сохранность исторических файлов всех стандартных операционных процедур;

l) назначать ответственного за управление архивом (архивами);

m) гарантировать выполнение основного плана-графика;

n) гарантировать, что ресурсы испытательного центра соответствуют требованиям, предъявляемым к их использованию в исследовании;

o) при проведении исследований на нескольких испытательных площадках обеспечивать четкое и согласованное взаимодействие между руководителем исследования, ответственным(ми) исследователем(ями), службой по обеспечению качества и специалистами, выполняющими данное исследование;

р) гарантировать, что объект испытаний и стандартный объект описаны должным образом;

q) устанавливать процедуры для подтверждения того, что компьютеризированные системы соответствуют своему назначению, а также валидируются, управляются и поддерживаются согласно Принципам надлежащей лабораторной практики.

3.1.1.3 При выполнении какого-либо этапа(ов) исследования на испытательной площадке в компетенцию администрации испытательной площадки (в случае назначения) входят все вышеперечисленные обязанности, кроме 3.1.1.2, перечисления g), i), j) и o).

3.1.2 Обязанности руководителя исследования

3.1.2.1 Руководитель исследования осуществляет общее руководство проведением исследования, отвечает за подготовку заключительного отчета.

3.1.2.2 В обязанности руководителя исследования входят как минимум следующие функции:

a) утверждать план исследования и поправки к нему своей подписью с указанием даты;

b) гарантировать, что служба по обеспечению качества имеет копии плана исследования со своевременно полученными поправками к нему, и находиться с сотрудниками службы обеспечения качества в постоянном контакте на протяжении всего исследования;

c) гарантировать, что планы исследований, поправки к ним и стандартные операционные процедуры доступны специалистам, выполняющим данное исследование;

d) гарантировать, что в плане исследования и заключительном отчете о результатах исследования, выполненного на нескольких испытательных площадках, определены роли каждого ответственного исполнителя(ей) и каждого из испытательных центров и испытательных площадок, вовлеченных в проведение исследования;

e) гарантировать, что при выполнении работ в соответствии с планом исследования проводятся оценка и документирование влияния любых отклонений от плана исследования на качество и целостность проведения исследования и при необходимости принимаются корректирующие действия, а также признавать допустимость отклонений от стандартных операционных процедур при проведении исследования;

f) гарантировать, что регистрация всех первичных данных исследования проводится в полном объеме;

g) гарантировать, что компьютеризированные системы, используемые в исследовании, валидированы;

h) подписывать и датировать заключительный отчет, тем самым принимая на себя ответственность за достоверность информации и за выполнение исследования в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики;

i) гарантировать, что после завершения (включая прекращение) исследования план исследования, заключительный отчет, первичные данные исследования и сопутствующие материалы передаются в архив.

3.1.3 Обязанности ответственного исследователя

Ответственный исследователь несет ответственность за проведение порученных ему этапов исследования в соответствии с Принципами надлежащей лабораторной практики.

3.1.4 Обязанности персонала, выполняющего исследования

3.1.4.1 Весь персонал, вовлеченный в проведение исследования, должен знать Принципы надлежащей лабораторной практики в части, которая имеет отношение к их участию в исследовании.

3.1.4.2 Персонал, выполняющий исследования, должен иметь доступ к плану исследования и соответствующим стандартным операционным процедурам, применяемым к их участию в исследовании. Его обязанностью является выполнение инструкций, содержащихся в этих документах. Любое отклонение от этих инструкций должно быть зарегистрировано; о таком отклонении должно быть сообщено непосредственно руководителю исследования и/или при необходимости ответственному исследователю(ям).

3.1.4.3 Персонал, выполняющий исследования в соответствии с настоящими Принципами надлежащей лабораторной практики, обязан своевременно и точно вести записи первичных данных исследования и нести ответственность за достоверность представленных им данных.

3.1.4.4 Персонал, выполняющий исследования, должен принимать меры предосторожности, чтобы минимизировать риск для собственного здоровья и обеспечить полноту проведения исследования. Обо всех случаях заболеваний или недомоганий следует незамедлительно сообщать руководству, после чего заболевшего сотрудника отстраняют от участия в исследовании, чтобы его состояние не могло повлиять на проведение исследования.

3.2 Программа обеспечения качества

3.2.1 Общие положения

3.2.1.1 Испытательный центр должен иметь документированную программу обеспечения качества, чтобы гарантировать, что проводимые в нем исследования соответствуют Принципам надлежащей лабораторной практики.

3.2.1.2 За выполнение программы обеспечения качества отвечает(ют) уполномоченное(ые) лицо(а), назначаемое(ые) администрацией испытательного центра, непосредственно подчиняющиеся ей, и знакомые с методами испытаний.

3.2.1.3 Лицо(а), отвечающее(ие) за обеспечение качества, не должно(ы) быть вовлечено(ы) в проведение исследования.

3.2.2 Обязанности службы по обеспечению качества

3.2.2.1 Служба по обеспечению качества должна выполнять следующие функции:

a) иметь в наличии экземпляры всех утвержденных планов исследования и стандартных операционных процедур, используемых в испытательном центре, и доступ к текущему варианту основного плана-графика;

b) проверять, чтобы план исследования содержал информацию, необходимую для соответствия Принципам надлежащей лабораторной практики. Данная проверка должна быть документирована;

c) осуществлять инспекции за проведением всех исследований в соответствии с настоящими Принципами надлежащей лабораторной практики и доступностью планов исследований и стандартных операционных процедур персоналу, вовлеченному в проведение исследования.

Предусмотрены три типа инспекций в соответствии со стандартными операционными процедурами, определенными в программе обеспечения качества:

- инспекции отдельных исследований;

- инспекции испытательного центра;

- инспекции отдельных процессов.

Примечание - Отчеты подобных инспекций должны быть сохранены;

d) проверять заключительные отчеты; подтверждать, что методы, процедуры, наблюдения изложены точно и полностью и что результаты в полной мере отражают первичные данные исследований;

e) своевременно представлять результаты об инспекциях в письменном виде администрации испытательного центра, руководителю исследования, ответственному(ым) исследователю(ям) и, при необходимости, другим руководящим работникам;

f) вносить в заключительный отчет подготовленное и подписанное заключение о типах инспекций и датах их проведения с информацией об этапе (этапах) проверяемого исследования и дате передачи результатов инспектирования администрации испытательного центра, руководителю исследования и ответственному исследователю в случае

необходимости. Это заключение также должно содержать информацию о том, что первичные данные исследования отражены в заключительном отчете достоверно.

3.3 Помещения

3.3.1 Общие положения

3.3.1.1 Размеры, устройство и расположение помещений должны отвечать задачам исследования. Помещения должны быть устроены таким образом, чтобы влияние на ход исследований было минимальным.

3.3.1.2 Помещения должны быть спланированы таким образом, чтобы было обеспечено максимально изолированное проведение каждого исследования различных видов (типов).

3.3.2 Помещения для тест-систем

3.3.2.1 В испытательном центре должно быть достаточное число помещений или зон, чтобы обеспечить изоляцию тест-систем и индивидуальных проектов, если известно, что они предусматривают использование веществ или организмов, относящихся к разряду биологически опасных.

3.3.2.2 Для диагностирования, лечения и контроля заболеваний должны быть выделены подходящие помещения или зоны, чтобы обеспечить стабильность и сохранность тест-систем.

3.3.2.3 В испытательном центре должны быть комнаты хранения или зоны для ресурсов и оборудования. Эти помещения должны быть изолированы от помещений или зон, содержащих тест-системы, в целях обеспечения им адекватной защиты от инвазии, загрязнения и/или заражения.

3.3.3 Помещения для обработки объектов испытаний и стандартных (контрольных) объектов

3.3.3.1 Для предотвращения загрязнения в испытательном центре должны быть отдельные помещения или зоны для получения и хранения объектов испытаний и стандартных (контрольных) объектов и смешивания объектов испытаний с носителями.

3.3.3.2 Хранилища для объектов испытаний должны быть изолированы от помещений или зон, содержащих тест-системы, и должны соответствовать требованиям по обеспечению идентичности, концентрации, чистоты и стабильности, а также безопасному хранению опасных веществ.

3.3.4 Помещения для архивов

Следует предусмотреть помещения для архивов, в которых необходимо обеспечить безопасное хранение и систему поиска планов исследований, первичных данных исследований, заключительных отчетов, объектов испытаний и образцов. В этих

помещениях должны быть созданы условия, обеспечивающие долговременное хранение архивных материалов.

3.3.5 Удаление отходов

Обработка и удаление отходов должны быть выполнены таким образом, чтобы не подвергнуть опасности проведение исследований и не исказить их результаты. Для этого требуется обеспечить соответствующие условия для сбора, хранения и вывоза отходов, а также процедур их дезактивации и последующей транспортировки.

3.4 Оборудование, материалы и реагенты

3.4.1 Оборудование, включая валидированные компьютеризированные системы, используемые для создания, хранения и поиска данных, а также для контроля параметров окружающей среды, по характеристикам и расположению должно соответствовать целям и задачам исследования.

3.4.2 Должно быть предусмотрено периодическое техническое обслуживание оборудования, используемого в исследовании, включая регулярный периодический осмотр, уход, калибровку и поверку в соответствии со стандартными операционными процедурами. Эти работы должны сопровождаться соответствующими записями. Калибровку и поверку следует проводить в соответствии с национальными или международными стандартами измерения.

3.4.3 Оборудование и материалы, используемые в исследовании, не должны влиять на состояние тест-систем.

3.4.4 Химические вещества и их смеси, реагенты и растворы должны иметь этикетки с указанием сведений о наименовании вещества, концентрации (в случае необходимости), даты окончания срока хранения и инструкцию по хранению. Должна быть доступна информация об изготовителе, дате производства и стабильности. Срок хранения может быть продлен на основании результатов документированной проверки или анализа.

3.7 Стандартные операционные процедуры

3.7.1 Испытательный центр должен иметь в наличии оформленные в письменном виде и утвержденные администрацией испытательного центра стандартные операционные процедуры (СОП), которые предназначены для того, чтобы гарантировать качество и полноту данных, полученных в процессе исследования. Пересмотренные СОП также должны быть утверждены администрацией испытательного центра.

3.7.2 Каждому подразделению и/или каждой площадке испытательного центра незамедлительно должны быть доступны действующие СОП, относящиеся к их

деятельности. В дополнение к СОП допускается также использовать иные печатные издания, методические руководства, справочники и специальные статьи.

3.7.3 Отклонения от СОП в ходе исследования должны быть зарегистрированы и завизированы руководителем исследования и (при необходимости) ответственным исследователем(ями).

3.7.4 Стандартные операционные процедуры должны быть использованы для деятельности следующих видов (но не ограничиваться ими).

3.7.4.1 Объекты испытания и стандартные объекты

Поступление, идентификация, маркировка, обработка, отбор проб и хранение.

3.7.4.2 Оборудование, материалы и реагенты

а) Оборудование:

использование, обслуживание, уход и калибровка.

б) Компьютеризированные системы:

валидация, порядок работы и обслуживания, безопасность, контроль изменений и создание резервных копий.

с) Материалы, реагенты и растворы:

приготовление и маркировка.

3.7.4.3 Хранение записей, отчетность, хранение и извлечение информации, кодирование исследований, сбор данных, подготовка отчетов, системы индексации, обработка данных, в том числе с использованием компьютеризированных систем.

3.7.4.4 Тест-системы (где применимо):

а) подготовка помещений и создание условий окружающей среды для размещения тест-систем;

б) процедуры, установленные для получения, транспортировки, размещения, определения характеристик и идентификации тест-систем, а также ухода за ними;

с) подготовка тест-систем, наблюдения и осмотры до, во время и после завершения исследования;

д) обращение с тест-системами, умирающими или умершими во время исследования;

е) сбор, идентификация и порядок работы с образцами, включая некропсию и гистопатологию;

ф) размещение тест-систем на испытательных площадках.

3.7.4.5 Процедуры по обеспечению качества

Работа персонала по обеспечению качества заключается в планировании, составлении графика инспекций, проведении инспекций, документировании и составлении отчетов об инспекциях.

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических
исследований лекарственных средств**

**Тема занятия: «Общие принципы изучения безопасности лекарственных
средств. Принципы исследования общетоксических свойств
лекарственных средств»**

Цель занятия:

Сформировать понимание цели и основных принципов изучения безопасности лекарственных средств и принципов исследования общетоксических свойств лекарственных средств.

Задачи занятия:

1. Ознакомиться с общими принципами изучения безопасности лекарственных средств.
2. Ознакомиться с проведением исследований острой токсичности лекарственных средств.
3. Ознакомиться с проведением исследований подострой токсичности лекарственных средств.
4. Ознакомиться с проведением исследований хронической токсичности лекарственных средств.
5. Ознакомиться с проведением исследований местнораздражающего действия лекарственных средств.

6. Ознакомиться с проведением исследований кумулятивных свойств лекарственных средств.

Перечень практических навыков:

Уметь:

1. планировать исследования безопасности лекарственных средств.
2. проводить исследования безопасности лекарственных средств:
 - 2.1 острой токсичности.
 - 2.2 подострой токсичности.
 - 2.3 хронической токсичности.
 - 2.4 местнораздражающего действия.
 - 2.5 кумулятивных свойств лекарственных средств

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Вопросы, разбираемые по теме практического занятия:

1. Принципы изучения безопасности лекарственных средств.
2. Принципы исследования общетоксических свойств лекарственных средств.
3. Задачи изучения общетоксических свойств ЛС.
4. Этапы проведения общетоксических свойств.
5. Изучение острой токсичности.
6. Изучение подострой токсичности.
7. Изучение хронической токсичности.
8. Изучение местнораздражающего действия.
9. Изучение кумулятивных свойств лекарственных средств.

Задание для самостоятельной внеаудиторной работы студента по теме практического занятия:

Студентам предлагается подготовить реферат:

«Изучение местнораздражающего действия новых лекарственных средств»

Работа с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных

средств. Ч. I. / Под ред. А.Н.Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

Поиск по теме УИРС в:

<http://www.studentlibrary.ru/> - Электронная библиотечная система «Консультант студента»

<http://library.volgmed.ru/ebs/> - Электронная библиотечная система ВолгГМУ

<http://elibrary.ru/> - Научная электронная библиотека ELIBRARY.RU (профессиональная

база данных)

www.scopus.com - Крупнейшая в мире единая реферативная база данных (профессиональная база данных)

www.pubmed.com - Англоязычная текстовая база данных медицинских и биологических публикаций (профессиональная база данных)

Задания для самоконтроля:

Выполнение тестовых заданий по теме занятия (см. Фонд Оценочных Средств по дисциплине «Методология доклинических и клинических исследований лекарственных средств»).

1. Самостоятельная работа студентов с интернет-ресурсами, содержащими информацию о методах поиска биологически активных веществ, влияющих на различные рецепторы.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме (Приложения 1, 2).

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель,

доцент кафедры фармакологии

и биоинформатики ВолгГМУ, к.м.н.

А.С. Таран

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB%EE%E1%F9%E5%E9%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Приложение 2

к методическим рекомендациям для студентов
к практическому занятию по теме:

«Общие принципы изучения безопасности лекарственных средств. Принципы исследования общетоксических свойств лекарственных средств.»

Общие положения изучения острой токсичности

Острая токсичность — токсикометрическая 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.

Вид и количество лабораторных животных

Острая токсичность изучается на нескольких видах животных. Причем обязательно используют тот вид животных, на которых была показана специфическая фармакологическая активность вещества и которые будут использоваться при исследовании хронической токсичности. Обычно используют 2 вида животных. Исследования на самцах и самках проводят отдельно, минимальный размер группы 5–6 особей грызунов, при использовании собак или кроликов 3–5 особей.

Полученные результаты должны адекватно обеспечить возможность вычисления ЛД₅₀, 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 ЛД₅₀, следует указать максимальную дозу, которая была введена животным, но не менее 2 г/кг.

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.).

Общие положения изучения хронической токсичности

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.

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

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.

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 закладывают 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.

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.

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.

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 для патоморфологических 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.

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

Изучение кумуляции методом субхронической токсичности

Дни введения	Доля от ЛД50 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 $K < 1$ — кумуляция, или $K > 1$ — привыкание. Коэффициент определяется как частное из отношения ЛД50 при однократном введении к ЛД50 при повторных введениях.

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических
исследований лекарственных средств**

**Тема занятия: «Принципы исследования специфических видов
токсичности лекарственных средств»**

Цель занятия:

Сформировать понимание цели и основных исследования специфических видов токсичности лекарственных средств.

Задачи занятия:

1. Ознакомиться с общими принципами изучения специфической токсичности лекарственных средств.
2. Ознакомиться с проведением исследований мутагенности лекарственных средств.
3. Ознакомиться с проведением исследований репродуктивной токсичности лекарственных средств.
4. Ознакомиться с проведением исследований канцерогенного действия лекарственных средств.
5. Ознакомиться с проведением исследований местнораздражающего действия лекарственных средств.
6. Ознакомиться с проведением исследований аллергизирующего действия лекарственных средств.

7. Ознакомиться с проведением исследований аддиктивного действия лекарственных средств.

8. Ознакомиться с проведением исследований иммуотоксического действия лекарственных средств.

Перечень практических навыков:

После освоения темы необходимо знать:

1. Принципы изучения специфической токсичности лекарственных средств.
2. Этапы проведения исследования специфической токсичности.
3. Методы проведения исследования мутагенности.
4. Методы проведения исследования репродуктивной токсичности.
5. Методы проведения исследования канцерогенного действия.
6. Методы проведения исследования аллергизирующего действия.
7. Методы проведения исследования аддиктивного действия.
8. Методы проведения исследования иммуотоксического действия.

После освоения темы необходимо уметь:

1. планировать исследования специфической токсичности лекарственных средств.
2. проводить исследования специфической токсичности лекарственных средств:
 - 2.1 мутагенности.
 - 2.2 репродуктивной токсичности.
 - 2.3 канцерогенного действия.
 - 2.4 аллергизирующего действия.
 - 2.5 аддиктивного действия
 - 2.6 иммуотоксического действия

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Под специфическими видами токсичности понимают способность веществ вызывать патологические изменения в результате воздействия на определенные органы и ткани (печень, нервную ткань, поджелудочную железу и т.д.). Как правило, специфическая токсичность обусловлена клеточными, биохимическими механизмами влияния, характерными для этого вещества, особенностями его распределения в организме, физико-химическими свойствами.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Вопросы, разбираемые по теме практического занятия:

1. Принципы изучения специфических видов токсичности лекарственных средств.
2. Цели изучения общетоксических свойств ЛС.
3. Этапы проведения специфической токсичности.

4. Изучение мутагенности.
5. Изучение репродуктивной токсичности.
6. Изучение канцерогенного действия.
7. Изучение аллергизирующего действия.
8. Изучение аддиктивного действия.
9. Изучение иммунотоксического действия.

Задание для самостоятельной внеаудиторной работы студента по теме практического занятия:

Студентам предлагается подготовить реферат:

«Методы исследования иммунотоксичности новых лекарственных средств»

Работа с руководством по проведению доклинических исследований лекарственных

средств. Ч. I. / Под ред. А.Н.Миронова. – М.: Гриф и К, 2012. – 944 с.

Поиск по теме УИРС в:

<http://www.studentlibrary.ru/> - Электронная библиотечная система «Консультант студента»

<http://library.volgmed.ru/ebs/> - Электронная библиотечная система ВолгГМУ

<http://elibrary.ru/> - Научная электронная библиотека ELIBRARY.RU (профессиональная база данных)

www.scopus.com - Крупнейшая в мире единая реферативная база данных (профессиональная база данных)

www.pubmed.com - Англоязычная текстовая база данных медицинских и биологических публикаций (профессиональная база данных)

Задания для самоконтроля:

1. Самостоятельная работа студентов с интернет-ресурсами, содержащими информацию о принципах исследования специфических видов токсичности лекарственных средств.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме (Приложения 1, 2).

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель,

доцент кафедры фармакологии

и биоинформатики ВолгГМУ, к.м.н.

А.С. Таран

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB%EE%E1%F9%E5%E9%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Приложение 2

к методическим рекомендациям для студентов
к практическому занятию по теме:

«Принципы исследования специфических видов токсичности лекарственных средств.»

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.

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 дрожжей).

— 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).

Исследование генотоксичности включает *in vitro* и *in vivo* испытания, которые направлены на обнаружение соединений, индуцирующих повреждение генетического материала за счет различных механизмов.

Они позволяют выявить вред в отношении повреждения ДНК и ее репарации

Генотоксичные вещества могут приводить к канцерогенезу и наследственным нарушениям, если поражается ДНК генеративных линий

По классификации такие исследования можно разделить на :

исследования мутагенности (способность вызывать мутацию)

исследования кластогенности (свойство какого-либо вещества индуцировать в клетках организма хромосомные aberrации)

исследования анеуплоидии (изменение кариотипа, при котором число хромосом в клетках не кратно гаплоидному набору, т.е. изменение числа хромосом).

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.

Задачей этого этапа исследований является выявление возможного отрицательного 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.

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.

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 высокореплицируемыми 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 инициировать злокачественную трансформацию клетки. К такому же результату приводит инактивация генов-супрессоров (ангионкогенов).

Одним из интегральных показателей канцерогенной активности агента может служить его способность озлокачивать клетки в культуре, что используется в ряде КСТ.

«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*.

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.

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.

Под аллергизирующими свойствами понимают способность того или иного вещества вызывать при введении в организм состояние повышенной чувствительности (гиперчувствительность, сенсibilизация).

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 тиреостимулирующего гормона щитовидной железы при тиреотоксикозе).

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.

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 мышцах 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.

Под **аддитивным потенциалом** фармакологических средств понимают их способность вызывать патологическое пристрастие. Анализ возможного аддитивного потенциала является одним из неотъемлемых элементов оценки безопасности новых фармакотерапевтических средств.

Вопросам экспериментального доклинического изучения аддитивного 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 нейропсихофармакологии и формированием новых подходов к терапии патологии ЦНС, основанных на фармакогенном влиянии на различные нейротрансмиттерные и нейромодуляторные системы.

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».

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. Наличие у вещества дифференцировочных интероцептивных стимульных свойств, сходных с таковыми известных веществ с высоким аддиктивным потенциалом. Эти свойства выявляются в исследованиях по лекарственной дифференцировке.
3. Наличие у вещества способности вызывать активацию системы положительного подкрепления (системы «награды»). Данное свойство выявляют по изменению показателей реакции электрической самостимуляции (РСС) мозга.

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.

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

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.

Задача иммунотоксикологии - разработка стратегии оценки состояния иммунитета, которая позволит четко прогнозировать последствия влияния экзогенных факторов на иммунную систему человека

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

Тема занятия: «Методы исследования в фармакокинетическом анализе»

Цель занятия:

Научиться анализировать подходы к анализу фармакокинетики лекарственного препарата.

Задачи занятия:

- сформировать представление о тест-системах различной сложности, применяемых в фармакокинетическом анализе;
- сформировать представления о целях, задачах, возможностях и ограничениях фармакокинетического анализа;
- разобраться в примерах различных фармакокинетических тест-систем.

Перечень практических навыков:

На основании задач предполагаемого исследования научиться отбирать тест-системы, предоставляющие адекватный уровень оценки фармакокинетического профиля лекарства.

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
---	--------------	-------

1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Рабочий план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Рекомендации по разбору теоретического материала.

Разобрать этапы фармакокинетики: всасывание, распределение и депонирование, метаболизацию и экскрецию, сделать акцент на способы исследования данных этапов на уровнях целостной живой системы и упрощенных систем.

Ответы на вопросы студентов.

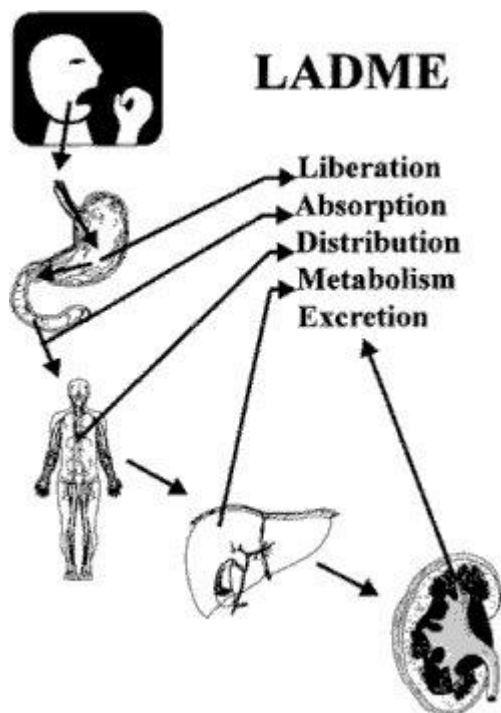
ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя.

Разбор теоретического материала

Фармакокинетический путь лекарства в организме разделяется на функционально и пространственно разделенные этапы, к которым наиболее часто относят всасывание, распределение, метаболизация, экскреция. Изучение этих этапов носит название ADME (absorption distribution, metabolism, excretion). Существуют распространенные дополнения комплекса исследований ADME, предполагающие (i) изучение высвобождения лекарственной молекулы

из препарата (liberation, LADME), (ii) дополнение комплекса исследований оценкой токсичности (toxicity, ADMET).



Доклиническое исследование событий, предшествующих абсорбции in vitro

Разработано и в разной степени внедрено в клиническую практику множество лекарственных форм, в том числе интегрирующих в себя средства доставки активных молекул. Их разработка разрешается изучением высвобождения лекарственной молекулы (контролируемого извне, неконтролируемого или обусловленного внешней средой). К их числу относятся кишечнорастворимые микрокапсулы, фенилборонат в умных инсулинах, наночастицы, высвобождающие активную молекулу при экспозиции лазером, матрицы-носители и др., что определено способом введения. Активная молекула после попадания в организм человека должна отделяться от носителя или вспомогательных веществ. Высвобождение разделяют на три стадии:

- Дезинтеграция;
- Деагрегирование;
- Растворение.

Фармакопея США стала первой организацией, проявившей интерес к испытаниям растворимости, создав Национальную группу формуляров для

изучения биодоступности и способов проверки механизмов высвобождения для обеспечения проверки эффективности растворения лекарственного средства. Данные исследования имеют значение при разработке фармацевтических эквивалентов. В РФ исследования сравнительной кинетики растворения регламентированы требованиями ОФС 42-0003-04 «Растворение» и Методическими Указаниями Минздравсоцразвития России «Оценка биоэквивалентности лекарственных средств», приложение 4, 2008 г.

Кинетика растворимости исследуется с применением автоматизированных тестеров, именуемых «вращающийся цилиндр», «вращающаяся колба», «вращающаяся колба с отсеками» (зависимо от вариации методики, физических свойств и водорастворимости активной молекулы, а также потребности в объеме извлекаемых данных). Одним из первых в формулярах Национальной группы к применению был рекомендован тест вращающейся корзинки.

Тест вращающейся корзинки

Тест проводят согласно ОФС 42-0003-04 «Растворение» на аппарате «вращающаяся корзинка» при заданной скорости вращения, например, 100 об/мин при $t=37^{\circ}\text{C}$. При необходимости разработать пероральную форму, тест выполняют в различных средах растворения в разных буферных системах, с различающимися рН, моделирующими отделы ЖКТ. Временные точки отбора проб могут различаться, например, находиться в диапазоне 10-30 мин. Объем среды растворения определяется с опорой на свойства препарата, чтобы обеспечить предельное разбавление. Рассчитывают среднее значение количества растворившейся субстанции/субстанций. Количественный и качественный состав растворяющей фазы (степень присутствия в ней растворяемого вещества) может быть исследован высокоэффективной жидкостной хроматографией, масс-спектрометрией.

Изучение пост-абсорбционных событий in vitro

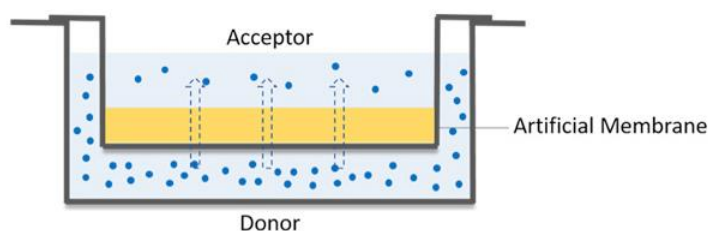
Исследование способности препарата (активной молекулы) проникать через клеточные слои стенки кишечника (абсорбция), связываться с белками плазмы

(этап распределения), взаимодействовать с ферментными системами (СУР, Р450 и др, метаболизация) – наиболее точно можно воспроизвести с применением техник *in vitro*.

Примером изучения барьер-проницающей функции на этапах всасывания, выведения и распределения является оценка проникающей способности соединения с применением клеточных слоев или липидных мембран. Примером могут являться тесты PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay), MDR1-MDCK (Madin-Darby Canine Kidney (MDCK) Permeability Assay), Caco-2 и др.

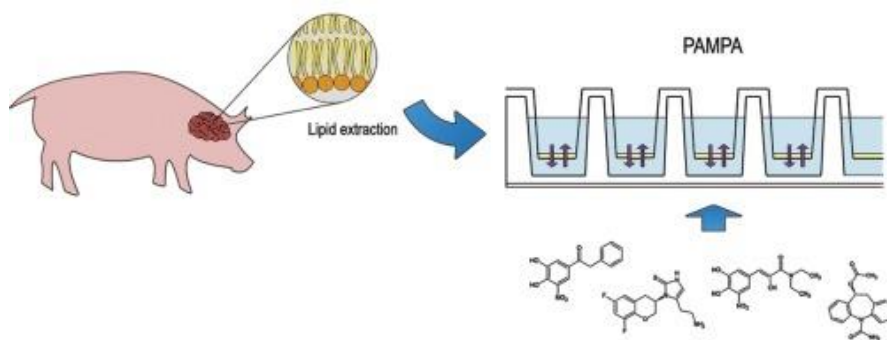
PAMPA

PAMPA (Parallel Artificial Membrane Permeability Assay – параллельный анализ проницаемости искусственной мембраны) – это *in vitro* модель пассивной трансцеллюлярной проницаемости в большом диапазоне pH. Тест широко используется в качестве высокопроизводительного анализа проницаемости для прогнозирования абсорбции лекарств в фармацевтической промышленности. Искусственная мембрана представляет липидный слой на основе гексадекана, разграничивающую донорный и акцепторный отсеки.



Результаты прохождения соединением барьера можно определить с применением методик, специфичных для лекарственной молекулы, или с применением хроматографии или хроматомасс-спектрометрии.

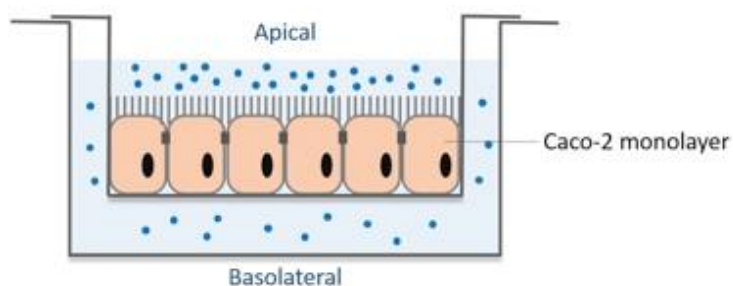
Существует вариация PAMPA, основанная на использовании билипидных слоев, экстрагируемых из органов подопытных животных животных, воспроизводящая проникновение соединения через ГЭБ (PAMPA-BBB).



К прочим вариантам PAMPA относятся DOPC-PAMPA – липидный раствор состоит из 2% ДОФХ в додекане, HDM-PAMPA – липидный раствор на 100% составлен из гексадекана, Double-Sink PAMPA (DS-PAMPA) – липидный раствор состоит из 20% раствора додекана и смеси фосфолипидов, а раствор акцептора содержит смесь поверхностно-активных веществ.

Анализ проницаемости с применением линии Caco-2

В анализе проницаемости с применением Caco-2 используется клеточная линия Caco-2, полученная из карциномы толстой кишки человека. Эта клеточная линия имитирует кишечные эпителиальные клетки, включая образование поляризованного монослоя, межклеточных плотных контактов и четко очерченной каймы ворсинок на апикальной поверхности. Этот анализ имитирует проницаемость через кишечный барьер.

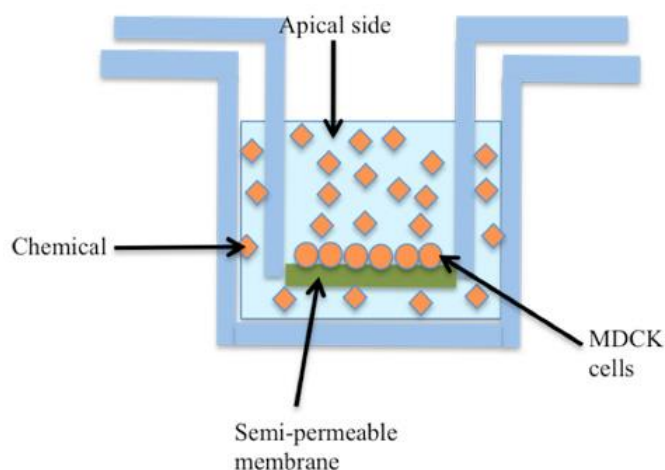


Скорость и количественные характеристики проницаемости через барьер Caco-2 оцениваются в обоих направлениях.

Изучение проницаемости MDRI-MDCK

Клетки MDCK представляют собой линию эпителиальных клеток, происходящих из почек собаки. Экспрессия белков-транспортеров и

метаболическая активность клетки MDCK находится на невысоком уровне. По сравнению с клеткой Caco-2, клетки MDCK пролиферируют и дифференцируются быстрее. Несмотря на почечное происхождение, клеточная линия используется для построения барьера, имитирующего кишечный. При этом клетки формируют монослой не сами по себе, а на основе «скелета» из полупроницаемой мембраны.



Несмотря на высокую перспективность, моделирование способности лекарственного препарата проникнуть через клеточный слой, имитирующий клеточный барьер любого органа – требует стандартизации и устранения сложностей, связанных с экстраполированием результатов на целостный организм. По этой причине золотым стандартом фармакокинетического исследования ADME является модель целостного организма.

Методы, применяемые в фармакокинетическом анализе in vivo

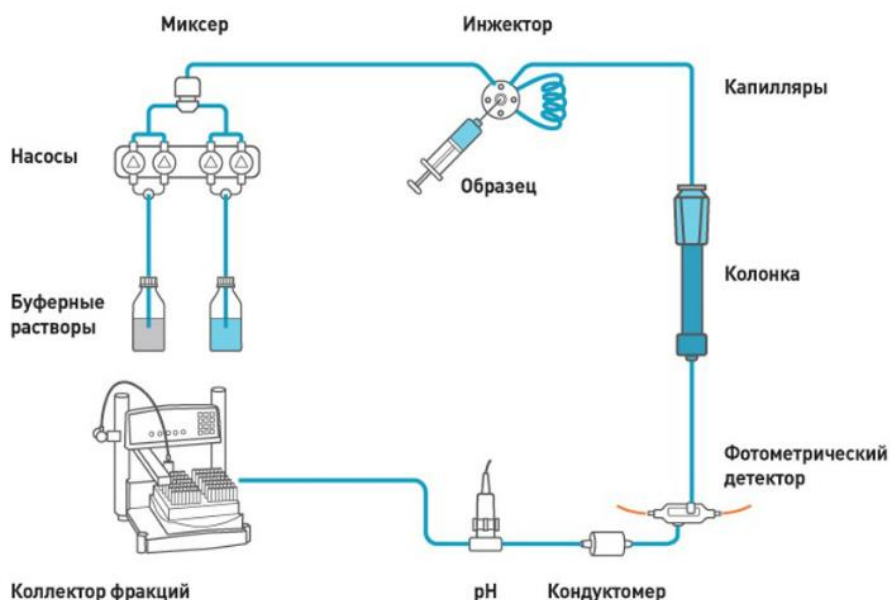
Ведение количественного исследования вещества и его метаболитов – основа фармакокинетического анализа ADME. Несмотря на то, что методы воспроизведения фармакокинетических этапов различны, способы количественного определения содержания соединения в анализе идентичны, и используются как при количественной оценке *in vitro* (при определении концентраций соединения в донорной и акцепторной средах), так и в *in vivo* исследовании (при установлении количеств вещества в биологической среде). Для определения микроконцентраций лекарственных веществ и продуктов их

метаболизма используют хроматографию, спектральный, иммунохимический, радиоизотопный методы, однако наиболее применимыми являются следующие:

- Хроматография;
- Масс-спектрометрия;
- Хромато-масс-спектрометрия;

Хроматографическое исследование в фармакокинетике

Хроматография в фармакокинетике – метод разделения/определения находящихся в биологических средах веществ на основе их физико-химических свойств. Метод основан на распределении элементов смесей между подвижной (элюентной) и неподвижной (твердое вещество или жидкость на основе инертного носителя, часто представляет собой колонку) фазами. В общем случае существует множество разных видов хроматографии, которые разделяются зависимо от агрегатного состояния подвижной фазы (газовая, жидкостная) и свойств колонки (ионообменная, ситовая). В простейшем случае, наиболее применяемая в фармакокинетическом исследовании жидкостная высокоэффективная хроматография (ВЖХ) предполагает последовательное введение образца, содержащего экстракт вещества в инжектор, в котором происходит смешение пробы с подвижной жидкой фазой заданного рН, задаваемой направленно, с целью повлиять на свойства определяемого вещества (ионизированность и др.), и обеспечить наилучшее связывание вещества с фазой колонки. Учитывая различие в скорости прохождения по колонке, пул веществ разделяется и в разный момент времени проходит через детектор (фотометрический, флуориметрический), регистрирующий очередность прохождения веществ в потоке подвижной фазы. Наглядная блок-схема представлена на рисунке.



Хромато-масс-спектрометрия

Метод хромато-масс-спектрометрии основан на сочетании возможностей хроматографии и масс-спектрометрии. Хроматография позволяет провести разделение определяемых молекул, которые впоследствии будут определены не с применением детекторов (или не только с применением детекторов), а с применением масс-спектрометрии.

Биологический образец вводится в инжектор хроматографа, после чего разделенные компоненты поступают в масс-спектрометр. Масс-спектрометрия – метод, используемый для измерения отношения массы к заряду ионов. Результаты обычно представлены в виде масс-спектра. Эти спектры используются для определения элементного или изотопного состава образца, масс частиц и молекул, а также для выяснения химической идентичности или структуры молекул. Точность масс-спектрометрии при определении молекул значительно превосходит таковую хроматографии, а комбинация методов является высокоэффективным решением в определении концентраций и идентификации как исследуемого соединения, так и его метаболитов в подготовленных соответствующим образом любых биологических субстратах, что важно в ADME-исследовании.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Доцент

Р.А. Литвинов

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим досиупа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

**Тема занятия: «Экстраполяция экспериментальных данных
фармакологических и токсикологических исследований с животных на
человека»**

Цель занятия:

Научиться анализировать проблемы экстраполяции экспериментальных данных фармакологических и токсикологических исследований с животных на человека.

Задачи занятия:

- сформировать понятия о современных проблемах трансляционной медицины;
- сформировать общие представления о коэффициентах экстраполяции;
- сформировать представление об определении дозы для первых испытаний ЛС с участием людей;
- разобраться в понятиях максимальная доза, не оказывающая явного нежелательного действия (NOAEL), доза, вызывающая минимальный ожидаемый биологический эффект (MABEL).

Перечень практических навыков:

самостоятельно проводить экстраполяцию экспериментальных данных фармакологических и токсикологических исследований с животных на человека.

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя.

Разбор теоретического материала

Введение. Фундаментальная задача фармакологических и токсикологических исследований на животных — это последующий перенос экспериментальных данных на человека. Его теоретические предпосылки

выкристаллизовывались в длительной полемике, где интересы создания и практического использования все увеличивающегося количества химических веществ, в том числе с заранее заданными свойствами, и новых лекарственных препаратов сталкивались и переплетались с задачами установления их безвредных уровней для человека и возможности применения для этих целей результатов оценки их токсического действия и фармакологического действия на животных. На протяжении многих десятилетий развития токсикологии, фармакологии и гигиенического нормирования веществ в окружающей среде ученые постоянно сталкивались с необходимостью внести определенность, упорядоченность и логическую обоснованность в выбор методов экстраполяции результатов, полученных в экспериментах на биологических моделях. Проблема, однако, оказалась настолько сложной, многоаспектной и не поддающейся однозначному толкованию, что и по сей день не представляет собой законченной научной системы, несмотря на издание целого ряда токсикологических и фармакологических монографий отечественных и зарубежных авторов, а также многочисленные публикации в периодических изданиях.

Экстраполяция фармакологических и токсикологических данных с животных на человека» направлена на рассмотрение методических аспектов моделирования и выбора биологических моделей для проведения фармакотоксикологических экспериментов; а также экстраполяцию на человека фармакотоксикологических данных в различных областях гигиены, фармакологии и экспериментальной медицины как наиболее сложный, ответственный этап установления безвредных уровней токсичных и фармакологически активных веществ.

Значимость таких факторов подчеркивается и в зарубежных исследованиях, особенно посвященных критике попыток переноса экспериментальных данных с «усредненного» животного на «усредненного» человека.

Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз

Проблематичность экстраполяции данных, полученных на животных, на клиническую ситуацию является одним из барьеров трансляционной медицины. При планировании клинических исследований (КИ) одним из ключевых вопросов остается выбор эффективной и безопасной дозы для человека на основании результатов доклинических исследований, при этом принимаются во внимание все полученные на этапе доклинических исследований результаты, оцениваются все возможные риски с тем, чтобы клинические исследования были максимально безопасны для участников. В основном в научной литературе, нормативных документах и методических рекомендациях рассматривается проблема выбора дозы лекарственного препарата для инициации клинических исследований. Но при проведении доклинических исследований также встают вопросы о выборе доз для изучения как токсических, так и фармакологических эффектов препаратов. Некоторые принципы выбора доз для изучения общего токсического действия лекарственных средств представлены в ГОСТ 56701-2015.

По данным Красновского Г.Н. при экстраполяции данных следует учитывать:

- сходство у человека и экспериментальной модели биологических параметров систем, реагирующих на токсичное вещество;
- общность характеристик метаболических процессов;
- полнота воспроизводимости на лабораторных животных всего спектра проявлений интоксикации у человека и, наконец, близость чувствительности по показателям токсикометрии, устанавливаемых для человека и модели;
- выявление роли внутренних и внешних факторов, влияющих на вариабельность параметров фармакологической активности и токсичности веществ для животных и человека, с целью определения биологически обусловленных пределов колебаний выраженности эффекта, проявляющихся независимо от желания экспериментаторов, условий проведения опытов и методов, фиксирующих их результаты.

В связи с тем, что в Российской Федерации на фармацевтический рынок поступают воспроизведенные лекарственные препараты, этот вопрос особенно актуален. Корректный выбор доз для проведения доклинических исследований позволяет максимально эффективно провести сравнительное изучение фармакологических и токсических свойств изучаемых препаратов.

В целом, в настоящее время существует несколько подходов для определения эквивалентной дозы для человека (ЭДЧ — human equivalent dose, HED) на основании данных доклинических исследований, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

Основные из них перечислены ниже.

1. Определение ЭДЧ с применением коэффициента межвидового переноса доз. Это эмпирический подход, в котором для расчетов используется уровень доз без наблюдаемого отрицательного эффекта (ДБНОЭ — no observed adverse effect level, NOAEL), установленный при проведении доклинических исследований токсических свойств лекарственного препарата. Таким образом, во внимание принимаются токсические, а не фармакологические эффекты препарата.
2. Определение ЭДЧ на основании данных, полученных при клиническом применении аналогичных препаратов. Могут быть использованы имеющиеся данные, в том числе и по фармакокинетике (ФК), для уже применяемого в клинике препарата той же фармакологической группы и/или схожего по химической структуре.
3. Определение ЭДЧ на основании данных ФК. При таком подходе в первую очередь принимаются во внимание данные по ФК лекарственного препарата, и на их основании прогнозируются клинические параметры.
4. Определение ЭДЧ путем сравнительного анализа. Используются рассчитанные различными методами значения ЭДЧ, которые затем сравниваются, и обосновывается выбор оптимального значения дозы для начала клинических исследований лекарственного препарата.

Основные подходы, которые применяются для трансляции доз в клинические исследования, могут быть применимы также для выбора и обоснования доз препарата при планировании и проведении его доклинических исследований.

На практике используются:

- 1) межвидовой перенос доз с применением коэффициентов, учитывающих разницу в площади поверхности тела животных;
- 2) прямой перенос доз, выраженных в мг/кг;
- 3) межвидовой перенос доз на основании данных ФК лекарственного средства.

В ряде случаев действующие дозы лекарственных средств или химических соединений (при изучении степени их токсичности) рассчитываются на единицу массы тела человека или животного. Вместе с тем в фармакологии четко установлено, что для достижения изоэффективной реакции у мелких и крупных животных дозы препарата не изменяются пропорционально массе тела животного. Как правило, дозы для крупных животных возрастают значительно меньше, чем можно было бы ожидать при их пересчете с массы тела мелких животных, и, наоборот, для животных с малой массой тела следует применять относительно большие дозы. Стратегия межвидового переноса доз во многом обусловлена наличием определенной связи между массой тела и скоростью основного обмена, поскольку именно основной обмен является основополагающим звеном в сравнительной физиологии. Первые шаги по изучению зависимости скорости метаболизма от массы тела были сделаны немецким физиологом Максом Рубнером. В 1883 году он опубликовал статью, в которой предположил, что зависимость скорости основного обмена (basal metabolic rate, BMR) и массы тела (M) описывается степенной функцией $BMR = aM^{2/3}$, где a — это эмпирически определяемый коэффициент. Поскольку рассеивание тепла происходит с поверхности тела, предполагается, что интенсивность основного обмена зависит от площади поверхности тела. Данное представление о зависимости интенсивности основного обмена и массы тела существовало без изменений около 50 лет, до тех пор пока швейцарский ученый Макс Клайбер не опубликовал в 1932 году свою работу, в которой

скорость основного метаболизма описывается также степенной функцией, но с показателем степени не $2/3$, а $3/4$.

За последующие 30 лет были предприняты многочисленные попытки теоретического обоснования данного эмпирического правила. При этом споры, какая именно функция лучше описывает взаимосвязь параметров тела и скорости основного метаболизма, не утихают. Ряд ученых считает, что правило, выдвинутое М. Рубнером, в большей степени соответствует действительности. Например, было показано, что эмпирическая зависимость, предложенная М. Клайбером, по большей части основана на данных, полученных с использованием сельскохозяйственных домашних животных (парнокопытных, в том числе и жвачных), которые имеют большие размеры и свои особенности пищеварения. Проанализировав с помощью математических методов данные литературы о взаимосвязи скорости основного метаболизма с массой тела, с температурой тела, полученные на 619 видах млекопитающих (представлено 19 отрядов), австралийские ученые пришли к выводу, что скорость основного обмена лучше описывается функцией, предложенной М. Рубнером, с показателем степени $2/3$. Несколько позднее авторы уточнили, что с учетом основных параметров, которые могут оказывать влияние на скорость основного обмена, наиболее точно описывает взаимосвязь массы тела и скорости обмена степенная функция с показателем степени 0,686. Также разработаны модели, в которых скорость метаболизма рассматривается в зависимости не только от массы тела, но и от длины тела (Mass, metabolism and length explanation, MMLE).

Межвидовой перенос доз на основании коэффициентов, учитывающих разницу в площади поверхности тела

Именно зависимость скорости основного метаболизма от массы тела и, следовательно, площади поверхности тела стала отправной точкой при разработке эмпирического правила для межвидового переноса доз

фармакологических веществ. Основа этому подходу была заложена прежде всего в работах E. J. Freireich с соавт. и P. S. Schein с соавт., в которых были выведены некоторые закономерности межвидового переноса доз для противоопухолевых препаратов. Выяснилось, что дозы, вызывающие токсические эффекты у грызунов и у негрызунов, хорошо коррелировали с вызываемыми нежелательными эффектами дозами препарата в клинике, когда дозы были выражены в мг/м². Данный метод описан в руководстве, опубликованном Управлением по контролю за качеством продуктов питания и лекарственных средств (FDA), «Estimating the Maximum Safe Starting Dose in Initial Clinical Trials for Therapeutics in Adult Healthy Volunteers. Guidance for Industry» (далее — руководство FDA).

Подход, при котором межвидовой перенос доз осуществляется с учетом разницы в площади поверхности тела, часто используется в экспериментальных исследованиях, если надо установить дозу препарата на основании данных, полученных на другом виде животных. Данный метод хорошо применим для веществ, которые мало подвергаются метаболизму в печени, имеют низкий объем распределения и выводятся почками.

Как указано в руководстве FDA, для большинства системно вводимых терапевтических средств определение ЭДЧ должно основываться на перерасчете доз, исходя из разницы в площади поверхности тела (ППТ — body surface area, BSA) лабораторных животных и человека. Экстраполяцию дозы, установленной в доклинических исследованиях, на клиническую проводят путем деления NOAEL, полученной на каждом из изученных видов животных, на соответствующий коэффициент. Этот коэффициент пересчета представляет собой число, которое преобразует дозу мг/кг для определенного вида животных в дозу мг/кг для человека, что эквивалентно NOAEL животного, если ее выразить в мг/м². Аналогичный подход может быть применен и для переноса дозы в мг/кг для одного вида животных в дозу мг/кг для другого вида животных.

При этом необходимо понимать, что межвидовые различия эффективности того или иного препарата могут быть очень существенными. Так, при изучении токсических свойств леналидомида — представителя нового класса противоопухолевых иммуномодуляторов — в доклинических исследованиях крысы удовлетворительно переносили препарат при внутривенном введении в течение 26 недель в диапазоне доз 75–300 мг/кг. Единственным нежелательным эффектом при введении препарата во всех дозах (в основном у самок) являлось развитие умеренной минерализации почечной лоханки, обратимое после отмены препарата.

У обезьян пероральное введение препарата в дозах 4 и 6 мг/кг в течение 20 недель привело к развитию выраженной картины интоксикации и даже случаям гибели. Токсические эффекты отмечены и при введении более низкой дозы — 1 мг/кг, NOAEL составила менее 1 мг/кг. Таким образом, для данного препарата крысы оказались малочувствительным видом, выбор доз для клинических исследований был основан на данных, полученных на обезьянах.

В клинике препарат применяется в максимальной дозе 25 мг/сут (0,4 мг/кг).

В руководстве FDA указывается, что поскольку межвидовой перенос доз относительно площади поверхности тела применим для установления ЭДЧ, факторы, используемые для преобразования доз для каждого вида, должны быть стандартизированы.

Минимальный ожидаемый биологический эффект (MABEL, *minimal anticipated biological effect level*) — это доза, которая предположительно необходима для получения биологического эффекта у участников клинических испытаний. Это безопасный диапазон, определенный токсикологическими пороговыми величинами. Показатель минимального ожидаемого биологического эффекта рассматривается как удобный подход для определения безопасной начальной дозы, так как он представляет собой минимальную активную дозу.

Концепция MABEL была предложена European Medicines Agency (EMA) для применения при планировании первой фазы в клинических исследованиях.

В качестве стандарта рекомендуются коэффициенты пересчета, представленные как в зарубежных, так и в отечественных рекомендациях (табл. 1). В отечественном руководстве подробно описан алгоритм межвидового переноса доз, суммирующий данные литературы и результаты собственных исследований авторов-составителей руководства, приведены иллюстрирующие этот процесс примеры.

Следует отметить, что приведенные в таблице 1 коэффициенты применимы для животных и человека стандартной массы. Недостатком данных коэффициентов является невозможность пересчета на животных с массой тела выше или ниже стандартной. Например, в случае, когда в эксперименте используются животные с маленькой массой тела при изучении препаратов, предназначенных для педиатрической практики, или, наоборот, используются животные с большой массой тела при изучении препаратов, предназначенных для гериатрической практики.

Для видов, не указанных в таблице 1, или если масса тела выходит за пределы стандартных диапазонов, ЭДЧ можно рассчитать по следующей формуле:

$$\text{ЭДЧ} = \text{доза для животного в мг/кг} \times \left(\frac{\text{масса животного в кг}}{\text{масса человека в кг}} \right)^{0,33}$$

Таблица 1.

Вид Species	Для пересчета дозы для животных или человека (мг/кг) в дозу с учетом площади поверхности тела (мг/м ²) нужно дозу в мг/кг умножить на: To convert an animal/human dose in mg/kg to a dose based on body surface area in mg/m ² , multiply it by k _m	Для пересчета дозы для животных (мг/кг) в ЭДЧ* (мг/кг) нужно либо: To convert an animal dose in mg/kg to a HED* in mg/kg, either:	
		разделить дозу для животного на: divide the animal dose by	умножить дозу для животного на: multiply the animal dose by
Человек / Human	37		
Ребенок (20 кг)** / Child (20 kg)**	25		
Мышь / Mouse	3	12,3	0,08
Хомяк / Hamster	5	7,4	0,13
Крыса / Rat	6	6,2	0,16
Хорек / Ferret	7	5,3	0,19
Морская свинка Guinea pig	8	4,6	0,22
Кролик / Rabbit	12	3,1	0,32
Собака / Dog	20	1,8	0,54
Приматы: / Primates:			
Мартышковые*** Monkeys***	12	3,1	0,32
Мартышки**** Marmoset****	6	6,2	0,16
Беличьи обезьяны Squirrel monkey	7	5,3	0,19
Павиан Baboon	20	1,8	0,54
Карликовая свинья (микро-пиг) Micro-pig	27	1,4	0,73
Карликовая свинья (мини-пиг) Mini-pig	35	1,1	0,95

* Исходя из предположения, что масса человека 60 кг. ** Значение приведено справочно (дети практически никогда не участвуют в клинических исследованиях 1 фазы). *** Приматы семейства мартышковые, например макаки-крабоеды, макаки-резусы, медвежьи макаки. **** Приматы рода мартышки семейства мартышковые. * Assumes 60 kg human. ** This km value is provided for reference only since healthy children will rarely be volunteers for Phase 1 trials. *** Monkey family primates, for example, cynomolgus, rhesus, and stump-tail. **** Guenon-like monkeys of the Old World monkey family.

Этот метод в ряде случаев применим и для межвидового переноса доз, если требуется определить диапазон доз препарата для проведения экспериментальных исследований с использованием определенного вида животных на основании данных о клинических терапевтических дозах или на основании данных об эффективных дозах препарата/ субстанции, полученных в экспериментах на другом виде животных.

Если необходимо выполнить межвидовой перенос доз на основании данных, полученных в экспериментах на животных нестандартной массы, то можно воспользоваться формулой:

$$\text{Эквивалентная доза для вида В} = \text{доза для животного вида А в мг/кг} \times \left(\frac{\text{масса животного вида А в кг}}{\text{масса животного вида В в кг}} \right)^{0,33} . \quad (2)$$

При выборе дозы для проведения доклинического исследования важно учитывать межвидовую вариабельность в чувствительности к фармакологическому/токсическому действию препаратов, обусловленную, например, различиями в биодоступности.

Таким образом, межвидовой перенос доз должен проводиться с учетом специфических особенностей того или иного вида животных.

Самостоятельная работа студентов:

1. Самостоятельная работа студентов с интернет ресурсами содержащими информацию о истории фармакологии.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме.

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Доцент

К.Ю.Калитин

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

Приложение 1

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим досиупа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

При подготовке использован литература:

1. Красовский, Гурий Николаевич, Юрий Анатольевич Рахманин, and Наталия Александровна Егорова. "Экстраполяция токсикологических данных с животных на человека." (2009).
2. Шекунова, Е. В., М. А. Ковалева, М. Н. Макарова, and В. Г. Макаров. "Выбор дозы препарата для доклинического исследования: межвидовой перенос доз." Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 10, no. 1 (2020).
3. Muller, Patrick Y., Mark Milton, Peter Lloyd, Jennifer Sims, and Frank R. Brennan. "The minimum anticipated biological effect level (MABEL) for selection of first human dose in clinical trials with monoclonal antibodies." Current opinion in biotechnology 20, no. 6 (2009): 722-729.

**ВОЛГОГРАДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ
УНИВЕРСИТЕТ**

Кафедра фармакологии и биоинформатики

**Методические рекомендации для студентов к практическому
занятию.**

Факультет фармацевтический

Специальность: 33.05.01 Фармация (уровень специалитета)

**Дисциплина: Методология доклинических и клинических исследований
лекарственных средств**

**Тема занятия: «Разработка лекарственной формы. Перспективные
механизмы доставки лекарственных средств.»**

Цель занятия:

Сформировать понимание цели и основных принципов создания современных лекарственных форм и систем доставки лекарственных средств.

Задачи занятия:

1. сформировать понятия о лекарственной форме и системах доставки лекарственных средств;
2. сформировать общие представления о требованиях, предъявляемых к системам доставки лекарственных средств;
3. разобраться в ключевых принципах реализации пролонгированных лекарственных форм и лекарственных форм с контролируемым высвобождением;
4. сформировать представление о назначении и сущности регулируемой и направленной доставки лекарственных средств.

Перечень практических навыков:

самостоятельно работать с нормативной документацией, регламентирующей создание лекарственных форм.

Формируемые компетенции: УК-1; УК-6; ОПК-1; ОПК-6.

Методика проведения занятия:

Технологическая карта занятия

№	Этап занятия	Время
1	Проверка присутствующих студентов на занятии, режим занятия, тема занятия.	5 мин
2	Вступительное слово преподавателя	15 мин
3	Беседа по теме занятия	45 мин
4	Самостоятельная работа студентов.	10 мин
5	Проверка выполнения самостоятельной работы студентов. Работа с реферативными докладами. Ответы на вопросы студентов.	15 мин
6	Подведение итогов занятия. Задание на следующее занятие.	5 мин
7	Уборка рабочих мест.	5 мин

Основные вопросы, предлагаемые для обсуждения, план занятия.

Вступительное слово преподавателя.

Разбор теоретического материала.

Разобрать основные понятия темы: лекарственные средства, фармацевтическая субстанция, лекарственные препараты, лекарственная форма.

Ответы на вопросы студентов.

ПЛАН ЗАНЯТИЯ

Занятие начинается со вступительного слова преподавателя.

Разбор теоретического материала

Самостоятельная работа студентов:

В настоящее время в медицине и фармакологии все большую актуальность приобретает метод направленного транспорта лекарственных средств, позволяющий увеличить концентрацию доставляемых средств в определенном месте и блокировать или сильно ограничить их накопление в здоровых органах и тканях. Направленный транспорт позволяет повысить продолжительность и эффективность действия лекарства, снизить побочные эффекты.

Разработка систем доставки ЛС направлена на повышение терапевтической эффективности, переносимости и безопасности лекарственной терапии. Целями их создания являются:

1. Направленность действия
2. Пролонгированное действие
3. Повышение биодоступности ЛС
4. Снижение выраженности и частоты нежелательных реакций

Помимо традиционных лекарственных форм, характеризующихся немедленным и не контролируемым высвобождением лекарственных веществ (таблетки, капсулы, драже, порошки, сиропы, растворы для парентерального введения, свечи, мази и т.п.), существуют лекарственные формы с модифицированным высвобождением, характеризующиеся изменением механизма и характера высвобождения лекарственных веществ. Создание новых систем и средств доставки лекарств имеет важное прикладное значение, направленное на решение основных проблем клинической практики – повышение терапевтической эффективности, переносимости и безопасности лекарственной терапии. Это направление существует параллельно с развитием фармакологии, поиском и синтезом новых субстанций для лекарственных средств, отвечающих тем же запросам клинической практики, и является его завершающим этапом. Контролируя процесс доставки лекарственных средств, можно управлять терапевтическим эффектом, избежать передозировки или недостаточной эффективности, увеличить продолжительность эффекта, при

этом сократив кратность введения и повысив комплаентность больных к терапии. Развитию этого направления способствовали новые знания о фармакокинетике лекарственных средств, взаимодействии фармакокинетики и фармакодинамики, моделировании фармакокинетических процессов.

Принципиально выделяют следующие системы доставки ЛС:

- **Системы с модифицированным высвобождением ЛС**

Матричного типа

Резервуарного типа

Насосы (механические и осмотические)

- **Системы носителей ЛС**

Клеточные

Макромолекулы

Антитела

Микрочастицы (микросферы, микрокапсулы)

Наночастицы (липосомы, нанокристаллы)

Многokратный прием лекарственного препарата и периодические колебания концентрации биологически активного вещества в крови приводят к ряду нежелательных последствий: повышению его содержания в крови до токсического в начальный период введения, аллергических реакций и др. Кроме того, многократный прием представляет определенные трудности для больного и медицинского персонала. Все это стало причиной интенсивных исследований в области создания лекарственных форм с модифицированным высвобождением (ЛФМВ)

Лекарственные формы с модифицируемым высвобождением – это группа лекарственных средств, характеризующихся измененным механизмом и характером высвобождения. В результате такие лекарственные формы реально влияют на фармакокинетику лекарственных средств, приводя к изменениям параметров эффективности и переносимости в соответствии с клиническими потребностями, повышению комплаентности больных к терапии.

Для модификации высвобождения применяют методы:

1. Физические (использование веществ, замедляющих всасывание, метаболизм и выведение ЛВ).
2. Химические (получение труднорастворимых солей, замена одних функциональных групп на другие; введение новых химических группировок в состав молекулы исходного вещества).
3. Технологические (покрытие специальными оболочками, использование в единой лекарственной форме компонентов с разной скоростью высвобождения, инкорпорирование в матрицу и т.д.).

По технологии создания ЛФМВ выделяют три принципиально отличающихся вида:

1. **Резервуарные ЛФ**, содержащие ядро из ЛВ и полимерную оболочку, обеспечивающую замедленное высвобождение. Резервуаром могут быть вся ЛФ, покрытая общей оболочкой, или микроформы (микрогранулы, микрокапсулы, пеллеты, покрытые отдельными оболочками), множество которых объединено в одну ЛФ.
2. **Матриксные ЛФ**, имеющие вид таблетки, содержащей гидрофильную биополимерную матрицу, в которой распределено ЛВ и которая обеспечивает замедленное действие.
3. **Насосные (осмотические) системы.**

В зависимости от степени управления процессом высвобождения различают ЛФ с контролируемым высвобождением и пролонгированные (ретардные, от *retard* – замедляющий).

Резервуарная система состоит из двух частей - оболочки (мембраны), которая образует резервуар, и ядра, в котором находится лекарственное вещество. Высвобождение лекарственных веществ обеспечивается свойствами оболочки. Механизмами высвобождения являются диффузия через поры мембраны, образующиеся после ее набухания или биodeградации. Если ее толщина не изменяется, то процесс высвобождения лекарственных веществ описывается кинетикой нулевого порядка в течение 80% времени, если же в

результате биодegradации оболочки толщина ее уменьшается, то скорость высвобождения со временем будет увеличиваться

Основу матричных ЛФ составляет матрикс, который может характеризоваться различными физико-химическими свойствами, быть растворимым или нерастворимым, но способным к набуханию, биодegradации и/или образованию биоэрозий. В качестве матрикса используются инертные вещества - различные полимерные материалы, комплексоны, свойства которых определяют проницаемость для ЛВ; в любом случае матрикс представляет собой трехмерную сеть, внутри которой распределено лекарственное вещество. По физико-химическим свойствам матрикс может быть гидрофильным, гидрофобным или амфифильным, нейтральным или полиэлектролитным и т.п. По структуре матрикса могут быть разделены на макропористый, микропористый и непористый. В двух первых случаях лекарственные вещества высвобождаются из матрикса исключительно через образующиеся поры: в макропористом матриксе размер пор 0,1—1 мкм, что существенно больше размера молекул; в микропористом матриксе размер пор 5-20 нм, что незначительно превышает размер молекул. В непористом матриксе лекарственное вещество высвобождается непосредственно через структурную решетку вещества.

Осмотические системы доставки и высвобождения лекарственных средств предназначены для достижения кинетики нулевого порядка на протяжении ограниченного времени абсорбции в желудочно-кишечном тракте. Особенностью действия таких систем является стабильность в условиях ЖКТ – от колебания рН, давления, эффекта перемешивания. Основные составные элементы генерической осмотической системы доставки лекарственных средств - устройство с внутренним резервуаром, содержащим раствор или суспензию лекарственных веществ и окруженным непроницаемой оболочкой, и наружный резервуар, содержащий осмотическое вещество и окруженный полупроницаемой оболочкой. Механизм действия осмотической системы доставки: через полупроницаемую оболочку (мембрану) в резервуар с

осмотическим веществом с определенной скоростью начинает поступать вода из окружающего пространства, приводя к его расширению и увеличению давления на резервуар с лекарственным веществом, в результате чего поток с лекарственным веществом выдавливается через отверстие с постоянной скоростью, которая контролируется диаметром отверстия и не изменяется вплоть до полного выхода лекарственного вещества.

Пулмонарная доставка

Преимущества для системной доставки:

- Большая площадь всасывания (80-150 м²)
- Тонкий и легкопроницаемый эпителий
- Интенсивное кровоснабжение
- Отсутствие эффекта первого прохождения
- Меньшая чем в ЖКТ активность гидролитических ферментов

Ограничения:

- Геометрическое строение дыхательных путей
- Мукоцилиарный транспорт и слизь
- Клиренс альвеолярными макрофагами
- Важность соблюдения техники применения

Ионофоретическая трансдермальная доставка использует электрический ток малой силы, увеличивая проницаемость кожи для макромолекул и гидрофильных молекул, особенно катионов.

Сонофорез – применение ультразвуковой энергии (обычно низкой частоты, <100 кГц) для трансдермальной доставки ЛВ.

Механизм:

- Акустическая кавитация - применение ультразвука приводит к образованию микропузырьков. Коллапс этих пузырьков на поверхности рогового слоя порождает ударные волны, которые делают кожу проницаемой.

- Кроме того, могут создаваться акустические микроструи, которые воздействуют на поверхность рогового слоя или даже проникают через него.

Преимущества трансдермальной доставки:

- Неинвазивность
- Контролируемая доставка
- Локальное или системное действие
- Отсутствие эффекта первого прохождения
- Возможность доставки перорально недоступных пептидов, вакцин и клеток

Ограничения:

- Традиционные методы применимы для соединений с MW <500 Да, умеренно растворимых в воде и липидах и высоким коэффициентом распределения (logP)
- Может иметь местнораздражающее действие

Липосомы — микрочастицы резервуарного типа; представляют собой одно- или многослойные фосфолипидные микрокапсулы, внутри которых находится водная камера. Липосомы могут иметь дополнительные поверхностноактивные вещества, изменяющие их свойства и кинетику (ПЭГ, хитозан, лиганды и др.). Липосомы в микросферах — новая система доставки, сочетающая полимерную и липидную основу. Система представляет собой липосомы, инкапсулированные в микросферы из биodeградируемого полимера, при этом сохраняются все свойства липосом, а высвобождение липосом из микросфер происходит с контролируемой скоростью и после определенного периода; которые модулируются изменением размера липосом и размера пор, образующихся микросфер.

Регулируемая доставка и регулируемая специфичность к органам-мишеням.

Системы доставки фармацевтических лекарств в виде наночастиц используются в исследованиях и клинических условиях для преодоления ряда

проблем, связанных с традиционными лекарствами, таких как низкая растворимость в воде, низкая биодоступность и неспецифическое распределение в организме, а также для повышения эффективности лекарств.

Многофункциональные наночастицы способны одновременно нести достаточную нагрузку лекарственного средства, имеют увеличенное время циркуляции и направляют лекарство в намеченное место действия. Более того, они могут реагировать на различные стимулы, характерные для патологического очага, и даже могут быть дополнены контрастным компонентом, чтобы обеспечить мониторинг их биораспределения, накопления мишеней или эффективности терапии.

Одним из наиболее распространенных свойств наночастиц является сочетание продолжительного времени циркуляции и целенаправленности. Активное нацеливание наночастиц может быть достигнуто путем модификации поверхности наночастиц с помощью нацеливающих лигандов.

Заболевания, для которых особенно актуальна терапия на основе наночастиц, включают рак, сердечно-сосудистые заболевания и инфекционные заболевания.

Наночастицы, которые реагируют на различные типы стимулов, являются важной и постоянно растущей областью исследований. Эта отзывчивость может использоваться для управления свойствами и поведением NDDS. Стимулы могут быть внутренними и внутренними для целевого сайта (например, изменения pH, температуры, окислительно-восстановительного состояния или активности определенных ферментов) или внешними и искусственно примененными (такими как магнитное поле, ультразвук и различные типы облучения).

После достижения цели наночастицы могут пересекать барьер клеточной мембраны, чтобы доставить свою лекарственную нагрузку в цитоплазму клетки или специфические органеллы внутри клетки; стратегии для облегчения этого процесса были разработаны или исследуются.

Многофункциональные наночастицы были созданы для мультимодальной визуализации, которые могут преодолеть несколько проблем, связанных с отдельными модальностями визуализации, таких как недостаточная чувствительность или разрешение.

Для обоснования определения терминов рекомендуется использовать Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ (ред. от 22.12.2020) «Об обращении лекарственных средств» (Приложение 1).

1. Самостоятельная работа студентов с интернет-ресурсами, содержащими информацию о методах разработки и испытаний лекарственных форм и систем доставки.
2. Работа с раздаточным материалом по данной теме (Приложения 2, 3).

Ответы на вопросы студентов.

Подведение итогов занятия.

Заключительное слово преподавателя.

Составитель:

Доцент, к.х.н.

Д.А. Бабков

Дата _____ 20__ г.

Протокол кафедрального заседания № _____

СПИСОК РЕКОМЕНДУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ ПО ТЕМЕ:

Основная литература:

1. Харкевич Д. А. Фармакология [Электронный ресурс] : учебник / Д. А. Харкевич. - 11-е изд., испр. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2015. - ISBN 978-5-9704-3412-3 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970434123.html>
2. Фармакология [Электронный ресурс] : электронный учебник для медицинских вузов / Д.А. Харкевич и др. ; под ред. Д.А. Харкевича. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2016. – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/06-COS-2401.html>

Дополнительная литература:

1. Сычев Д. А. Клиническая фармакология. Общие вопросы клинической фармакологии [Электронный ресурс] : практикум : учебное пособие / под ред. В.Г. Кукеса. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 224 с. - ISBN 978-5-9704-2619-7 // ЭБС "Консультант студента". - Режим доступа : <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970426197.html>
2. Основы создания лекарственных препаратов [Текст] : (избранные лекции) : учеб. пособие для студ. по спец. 060108 65 - Фармация, 060112 65 - Мед. биохимия / под ред. А. А. Спасова ; Минздравсоцразвития РФ, ВолГМУ; [авт. кол.: Л. И. Бугаева, П. М. Васильев, М. П. Воронкова, О. Ю. Гречко, В. А. Косолапов, М. В. Черников и др.]. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2010. - 192 с. : ил.
3. Основы общей рецепторологии [Текст] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с.
4. Основы общей рецепторологии [Электронный ресурс] : учеб. пособие / Д. С. Яковлев [и др.] ; под ред. А. А. Спасова. - Волгоград : Изд-во ВолГМУ, 2018. - 64 с. – Режим доступа: http://library.volgmed.ru/Marc/MObjectDown.asp?MacroName=%CE%F1%ED%EE%E2%FB_%EE%E1%F9%E5%E9_%F0%E5%F6%E5%EF%F2%EE%EB%EE%E3%E8%E8_%DF%EA%EE%E2%EB%E5%E2_2018&MacroAcc=A&DbVal=47
5. Белоусов Ю. Б. Клинические исследования новых лекарственных средств [Электронный ресурс] / Ю.Б. Белоусов, М.В. Леонова, А.Н. Грацианская. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2011. - // ЭБС "Консультант студента". –Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/970409169V0024.html>
6. Кукес В. Г. Клиническая фармакология [Электронный ресурс] : учебник / под ред. В. Г. Кукеса. - 4-е изд., перераб. и доп. - М. : ГЭОТАР-Медиа, 2013. - 1056 с. - ISBN 978-5-9704-2714-9 // ЭБС "Консультант студента". – Режим доступа: <http://www.studentlibrary.ru/book/ISBN9785970427149.html>

Основные понятия (Федеральный закон от 12.04.2010 N 61-ФЗ (ред. от 22.12.2020)

«Об обращении лекарственных средств»):

Лекарственные средства (ЛС) – вещества или их комбинации, вступающие в контакт с организмом человека или животного, проникающие в органы, ткани организма человека или животного, применяемые для профилактики, диагностики ..., лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности К лекарственным средствам относятся фармацевтические субстанции и лекарственные препараты.

Фармацевтическая субстанция – ЛС в виде одного или нескольких обладающих фармакологической активностью действующих веществ вне зависимости от природы происхождения, которое предназначено для производства, изготовления лекарственных препаратов и определяет их эффективность.

Лекарственные препараты (ЛП) – ЛС в виде лекарственных форм, применяемые для профилактики, диагностики, лечения заболевания, реабилитации, для сохранения, предотвращения или прерывания беременности.

Лекарственная форма (ЛФ) - состояние ЛП, соответствующее способам его введения и применения и обеспечивающее достижение необходимого лечебного эффекта.

Стратегии активного нацеливания и потенциальная функционализация «умных» наночастиц

Лиганд	Мишень	
Альбумин	60 кДа поверхностный альбумин-связывающий гликопротеин (Grb0); Альбумин-связывающий белок (BM40, SPARC, остеоонектин)	Эндотелиальные клетки
Гиалуроновая кислота	Гликопротеиновый рецептор гиалуроновой кислоты CD44	Рак прямой кишки
Биотин (витамина Н)	Биотиновые рецепторы	Различные солидные опухоли
Фолиевая кислота	Рецепторы фолиевой кислоты; Простата-специфический мембранный антиген	Клетки рака груди, поджелудочной железы ретинобластомы
Трансферрин	Рецепторы трансферрина	Клетки рака поджелудочной железы
Аптамер AS1411	Нуклеолин	Различные солидные опухоли
Моноклональные антитела EGF	EGFR	Клетки карциномы легких
Пептид RGD	Интегрин $\alpha V\beta 3$	Клетки рака груди, простаты
Галактоза	Рецепторы азиалогликопротеина	Клетки гепатоцеллюлярной карциномы
Интерлейкин 2 (IL2)	Рецепторы к IL2	Т-лимфоциты

Лекарственные средства на основе липосом, применяемые в клинической практике

ЛС (год одобрения)	Путь введения	ЛВ	Показания
Доксил® (1995)	i.v.	Доксорубицин	Яичники, рак груди, саркома Капоши
DaunoXome® (1996)	i.v.	Даунорубицин	Саркома Капоши, связанная со СПИДом
Депозит® (1999)	Спинальный	Цитарабин	Неопластический менингит
Myocet® (2000)	i.v.	Доксорубицин	Комбинированная терапия с циклофосфамидом при метастатическом раке молочной железы
Меракт® (2004 г.)	i.v.	Мифамуртид	Резектабельная неметастатическая остеосаркома высокой степени злокачественности
Marqibo® (2012 г.)	i.v.	Винкристин	Острый лимфобластный лейкоз
Onivyde™ (2015)	i.v.	Иринотекан	Комбинированная терапия фторурацилом и лейковорином при метастатической аденокарциноме поджелудочной железы
Abelcet® (1995)	i.v.	Амфотерицин В	Инвазивные тяжелые грибковые инфекции
Амбисом® (1997)	i.v.	Амфотерицин В	Предполагаемые грибковые инфекции
Amphotec® (1996 г.)	i.v.	Амфотерицин В	Тяжелые грибковые инфекции
Visudyne® (2000)	i.v.	Вертепорфин	Неоваскуляризация хориоидеи
DepoDur™ (2004)	Эпидуральная анестезия	Сульфат морфина	Контроль над болью
Exparel® (2011 г.)	i.v.	Бупивакаин	Контроль над болью
Эпаксал® (1993)	i.m.	Инактивированный вирус гепатита А (штамм РГСБ)	Гепатит А
Inflexal® V (1997)	.m.	Инактивированный гемаглютинин штаммов вируса гриппа А и В	Грипп