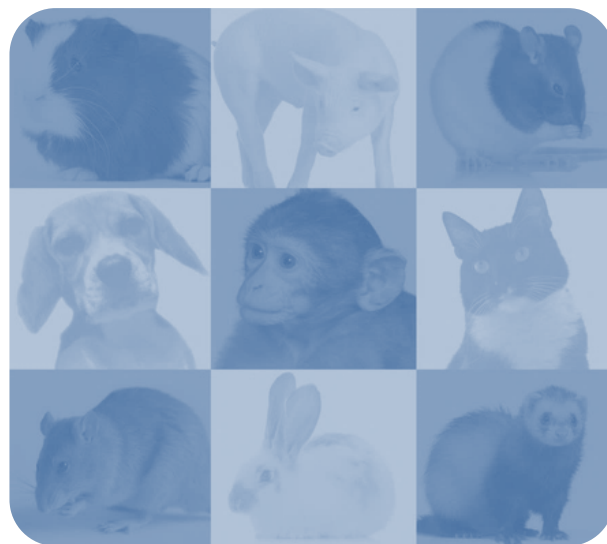
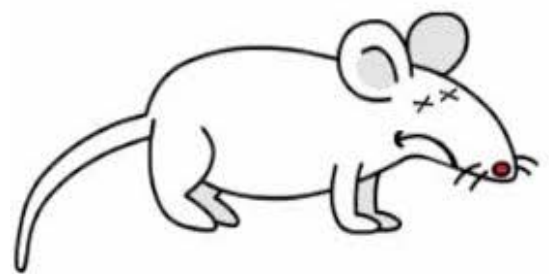


Биоразнообразие в доклинических исследованиях

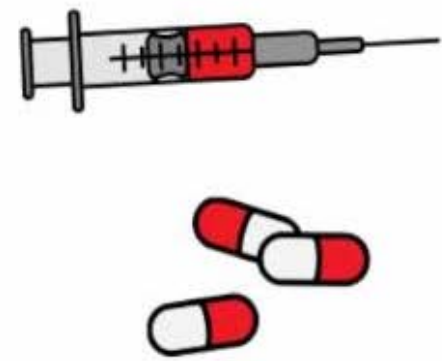


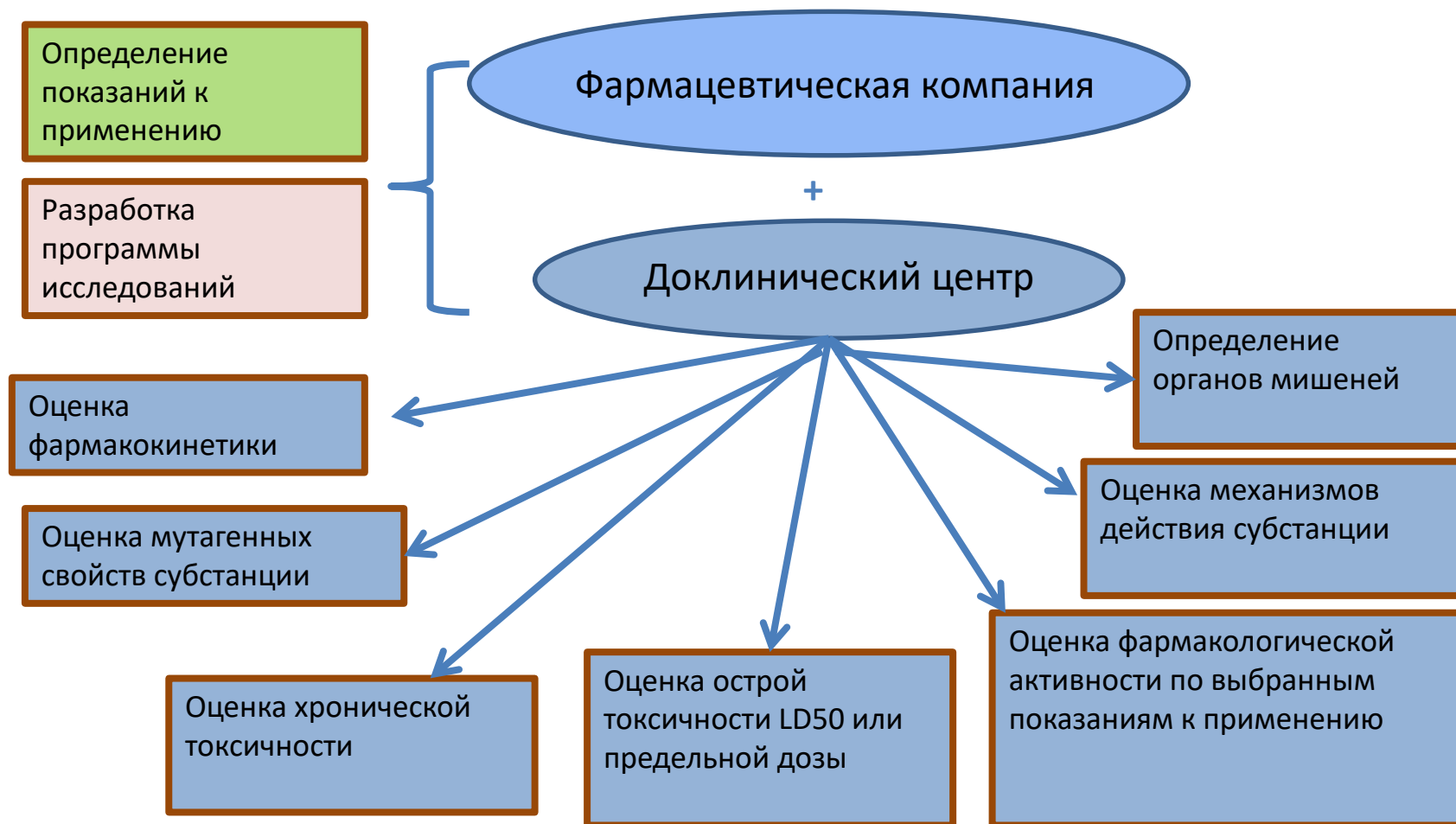
**VI Всероссийская конференция
с международным участием
«Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований
лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов и клинических
испытаний медицинских изделий»**

Макарова Марина Николаевна, д.м.н.,
Директор АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

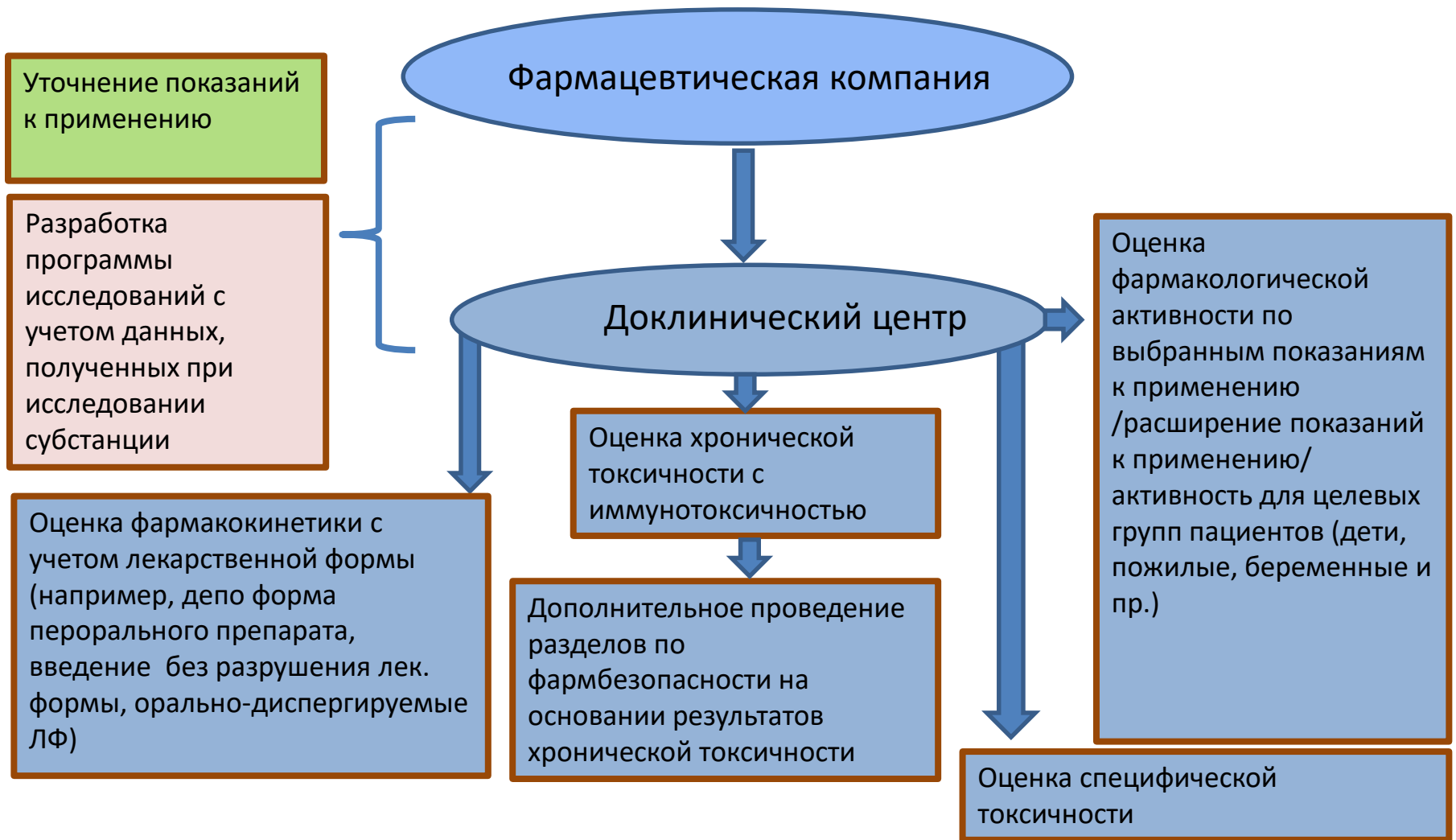


доклинические
исследования на животных





Доклинические исследования фармацевтической субстанции (GLP)
Программа в соответствии с ГОСТами 56699-56702-2015, 57129, 57130-2016, 57146,
57147-2016 (**8 ГОСТов**)



Доклинические исследования ЛФ(GLP)

Некоторые факторы, учитываемые при разработке программы исследования

Лек. форма	Пероральные	Инъекционные	Капли	Наружные
	<ul style="list-style-type: none"> •возможность разрушения •не возможность разрушения •орально диспергируемые и др. 	<ul style="list-style-type: none"> •в/м, п/к... •в/в •интратекальные •в стекловидное тело глаза • и др. 	<ul style="list-style-type: none"> •глазные •ушные •в нос •и др. 	<ul style="list-style-type: none"> •мази, •крема •и др.

Выбор вида животных, пола, количества, возраста

Выбор длительности введения/исследования

Выбор доз для введения (с учетом или без учета метаболического коэффициента)

Выбор объема лабораторных исследований

Клинический осмотр
 Гематология, биохимия, свертывающая система
 Инструментальные методы (УЗИ, рентген, ЭКГ....)
 Гистологические исследования и др.

Особенности метаболизма лекарственного средства

Особенности дозирования (схема назначения)

Особенности лек. формы не только в производственной форме, но и при приготовлении доз для введения животным.

и др....

Трудности при разработке дизайна исследования

Неправильный выбор вида лабораторных животных для исследования

- Незнание особенностей анатомии лабораторных животных (например, отсутствие желчного пузыря у крыс, диаметр пищевода у разных видов животных)
- Особенности биохимии (например, низкий уровень билирубина у крыс и мышей, наличие альфа- и бета-мурихолевой кислоты в составе желчи у крыс, невозможность синтеза аскорбиновой кислоты у морских свинок)



Выбор тест системы для лекарственных форм

- Нет возможности разрушения ГЛФ, например, таблетки и капсулы, покрытые кишечнорастворимой оболочкой: [кролики](#), [МИНИ-ПИГИ](#).



Основные
размеры
таблеток,
твердых и
мягких
желатиновых
капсул

<i>Таблетки</i>			
Диаметр, мм	Высота, мм	Диаметр, мм	Высота, мм
4	0,2	11	0,4
5	0,2	12	0,4
6	0,3	13	0,4
7	0,3	14	0,5
8	0,3	15	0,5
9	0,3	16	0,5
10	0,3	20	0,7
<i>Твердые желатиновые капсулы</i>			
Типоразмер	Диаметр, мм		Длина, мм
00	Колпачок	7,63-7,77	22,2-23,2
	Капсула	7,31-7,45	
0	Колпачок	7,57-7,71	20,7-21,7
	Капсула	7,26-7,40	
1	Колпачок	6,83-6,97	18,5-19,5
	Капсула	6,56-6,70	
2	Колпачок	6,28-6,42	17,0-17,8
	Капсула	6,00-6,14	
3	Колпачок	5,76-5,90	15,0-15,8
	Капсула	5,50-5,64	
4	Колпачок	5,25-5,39	13,4-14,3
	Капсула	4,98-5,12	
<i>Мягкие желатиновые капсулы, стандартизации нет</i>			
Типоразмер		Диаметр, мм	Длина, мм
Продолговатые		От 3	От 9,0
Овальные		9,6 или 9,2	15,6 или 15,7
Сферические		От 3,5 до 11	-

ОСТ 64-072-89 «Средства
лекарственные. Таблетки.
Типы и размеры»

Сравнительные размеры пищевода у человека и лабораторных животных

	Человек	Кролик	Морская свинка	Крыса	Мышь	Хомяк
Пищевод, длина, см	25-30	14-20	8-15	7-10	3-5	7-9
Пищевод, средний диаметр, мм	25-30	8,5-11	1,7-2,5	1,7-2,5	0,9-2,25	0,5-1,5
Фаренгиальное сужение, мм	18	8,9	2,0	2,3	1	0,5
Наиболее широкая часть, мм	22	10	2,4	3,5	1,5	1,4
Диафрагмальное сужение, мм	21	9	1,7	1,5	1	0,6
Размер зонда, G	-	13	13	13-18	16-22	13
Диаметр оливы, мм	-	3,5	3,5	2,3-3,0	1,2-1,6	3,5
Длина зонда, см	-	90-150	90-150	3,0-8,8	2,5-3,8	90-150



Макарова М.Н., Рыбакова А.В., Гушин Я.А., Шедько В.В., Мужикян А.А., Макаров В.Г. Анатомо-физиологическая характеристика пищеварительного тракта у человека и лабораторных животных // Международный вестник ветеринарии. -2016, № 1. –С. 82-104.

Выбор тест системы для лекарственных форм

- Есть возможность разрушения ГЛФ, например, желудочно-растворимые таблетки и капсулы, свечи, пластыри и др.:
[мышь, крысы.](#)

Приготовление лекарственной формы для введения животным/изменение лекарственной формы:



СУСПЕНЗИИ
РАСТВОРЫ (ВОДНЫЕ, МАСЛЯНЫЕ,
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПАВ и др.)
РАСПЛАВ СВЕЧИ



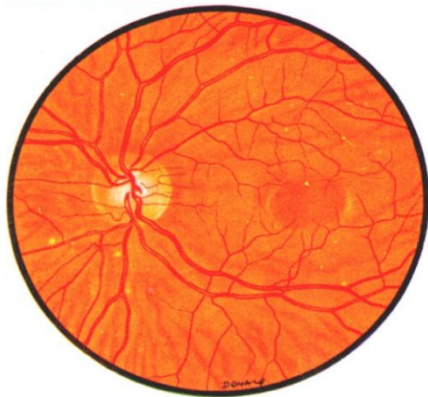
ИЗМЕНЕНИЕ
БИОДОСТУПНОСТИ!

Выбор тест системы для лекарственных форм

- Орально диспергируемые лекарственные формы, например, пленки, таблетки, леденцы для рассасывания и др.: [ХОМЯКИ.](#)

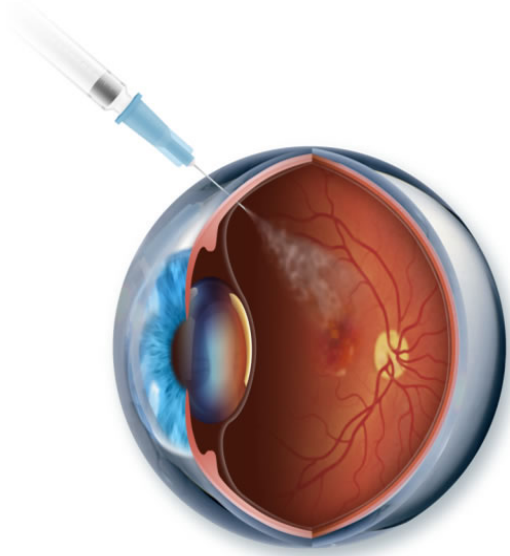


- Глазные, ушные, назальные капли (выбор тест системы определяется возможностью введения токсических объемов, возможностью проведения в динамике клинического осмотра глазного дна, регистрации истечения из носа, уха): [мыши и кролики](#).



Выбор тест системы для лекарственных форм

- Инвитриальное введение (достаточный размер глаза для введения, возможность проведения в динамике клинического осмотра глазного дна): [кролики.](#)



Выбор тест системы для лекарственных форм

- Инъекционные формы (внутривенный путь введения в хвостовую вену – вопрос длительности, высока вероятность трофических нарушений в тканях сосудов и подлежащих тканях):
целесообразно выбирать крупных животных, с хорошо визуализируемыми венами.



Выбор количества лабораторных животных для исследования



Требования к объему выборки и возрасту грызунов и негрызунов при различных дизайнах эксперимента

Параметры исследования	Субхроническая токсичность			Хроническая токсичность		
	OECD	FDA	EPA	OECD	FDA	EPA
Длительность исследования (грызуны и негрызуны)	≥ 90 дней	≥ 90 дней	≥ 90 дней	≥ 12 месяцев	≥ 12 месяцев	≥ 12 месяцев
Количество групп (грызуны и негрызуны)	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4
Количество животных в группе каждого пола (грызуны)	≥ 10	≥ 20	≥ 10	≥ 20	≥ 20	≥ 20
Количество животных в группе каждого пола (не грызуны)	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4	≥ 4
Возраст животных (на начало исследования) (грызуны)	≤ 9 недель	≤ 6 недель	≤ 8-9 недель	≤ 8 недель	≤ 6 недель	≤ 8 недель
Возраст животных (на начало исследования) (негрызуны)	4-6 месяцев	4-6 месяцев	4-6 месяцев	-	4-6 месяцев	4-6 месяцев

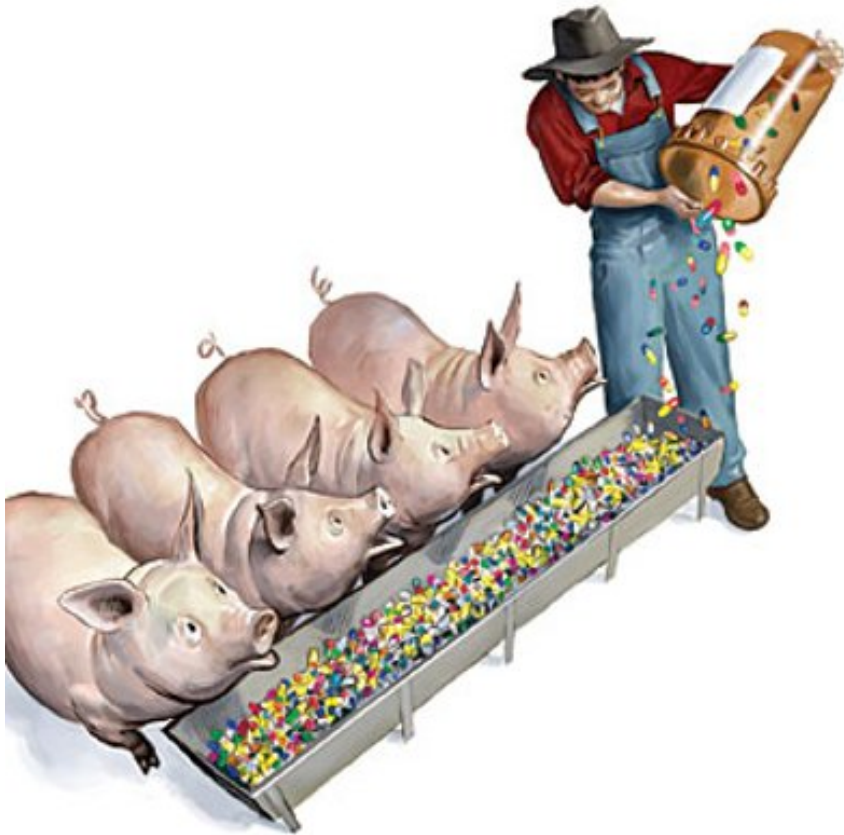
OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development – Протоколы по оценке токсичности

FDA - Food and Drug Administration – руководства по оценке токсичности

EPA - Environmental Protection Agency - руководства по оценке токсичности

Макарова М.Н., Шекунова Е.В., Рыбакова А.В., Макаров В.Г., Объем выборки лабораторных животных для экспериментальных исследований // Фармация. -2018, №2. –С. 3-8.

Выбор объемов введения тестируемого объекта



Рекомендованный объем для введения – это объем вводимого лекарственного средства, который не вызывает у животного дискомфорт, болевые ощущения и не влияет на его поведение.

Максимальный объем для введения – это объем вводимого лекарственного средства, который является физиологически возможным, но может вызвать кратковременный дискомфорт у животного и потребовать дополнительной подготовки перед проведением манипуляции (депривация кормом, установка внутривенного или артериального катетера, анестезия и другие).

Объемы желудка у различных видов лабораторных животных

Данные	Вид животного			
	мышь	крыса	морская свинка	кролик
Средний объем желудка, мл	1÷1,5	3÷5	20÷30	200
Максимальный объем желудка, мл	1,1÷3,5	5÷20	50÷80	160÷210
Время прохождения корма из желудка в кишечник (час)	1-2 *	0,15-1,5**	2***	3-6***

Примечание:

* F. Mule, 2009; ** Shu-Chi Wang, 2001; Э. Кибл, 2013; *** M. Suckow, 2012

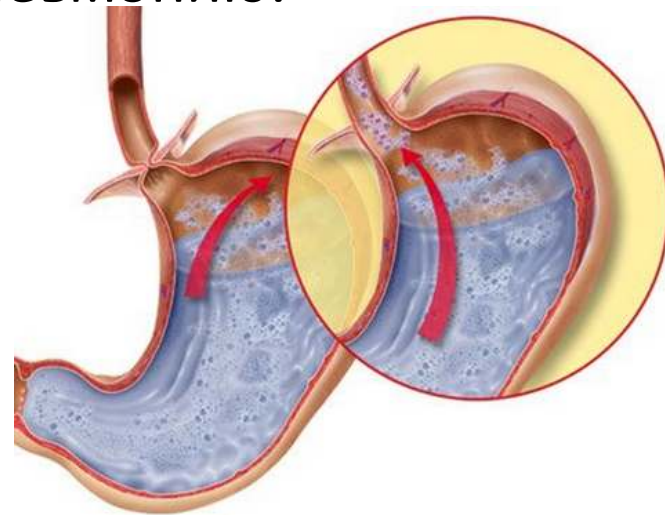
Объемы внутрижелудочного введения препаратов лабораторным животным (по литературным данным)

Источник литературы	Вид животного			
	мышь	крыса	морская свинка	кролик
	Объемы внутрижелудочного введения (мл/кг)			
S. Wolfensohn, 2003	10÷16	25	25	2,5
J. Nau, 2011	10	5	5	1,9
К.-Н. Diehl, 2001	10	10	-	10
F.C. Hankenson, 2013	10	10	-	-
J. Fox, 2007	5÷10	-	-	-
M. Suckow, 2012	-	-	-	10÷15*
И.П. Западнюк, 1983	50	15	-	-
Р.У. Хабриев, 2005	25÷33	26,6÷30	16÷20	50÷67
Н.Н. Каркищенко, 2010	25÷33	26,6÷30	16÷20	50÷67
А.Н. Миронов, 2012	25÷33	26,6÷30	16÷20	50÷100

Примечание: *максимум за 1 введение

Введение максимально допустимых объемов требует дополнительной подготовки животного (как минимум депривация кормом) и медленного введения лекарственных препаратов, при составлении плана проведения исследования необходимо обосновывать объемы вводимых препаратов.

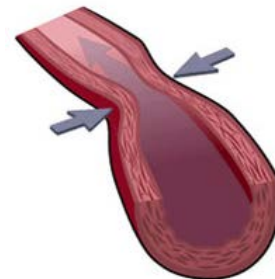
Введение лекарственных средств лабораторным животным внутрижелудочно в объемах, превышающих максимальные значения, может привести к перерастяжению и разрыву желудка, вызвать кишечную непроходимость, заброс пищевых масс в пищевод или трахею, что может вызвать растяжение пищевода, передавливание трахеи и острую пневмонию.



Объемы подкожного введения препаратов (мл/кг) и калибр иглы для инъекции (по литературным данным)

Источник литературы	Вид животного			
	мышь	крыса	морская свинка	кролик
S. Wolfensohn, 2003	8÷10 25G	5 23-25G	5 23-25G	1 21-25G
J. Nau, 2011	10 26G	5 25G	5 25G	1 23G
F.C. Hankenson, 2013	10	5	-	-
K.-H. Diehl, 2001	10 не более 2-3-х инъекций в день	5 не более 2-3-х инъекций в день	-	1
J. Fox, 2007	10÷40 максимум 2-3 мл на животное ≤20G	-	-	-
Donna J. Clemons, 2011	-	-	5÷10	-
M. Suckow, 2012	-	-	-	5
И.П. Западнюк, 1983	50	100	60	15
Р.У. Хабриев, 2005	50	50÷100	60	15
Н.Н. Каркищенко, 2010	50	105	60	15
А.Н. Миронов, 2012	50	100	60	15
Э. Кибл, 2013	80÷120 при высоком % дегидратации	15÷20 25÷50 при высоком % дегидратации	-	-

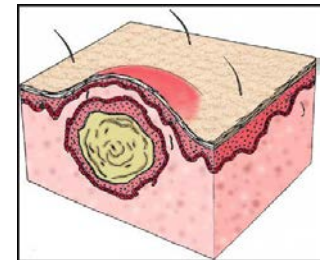
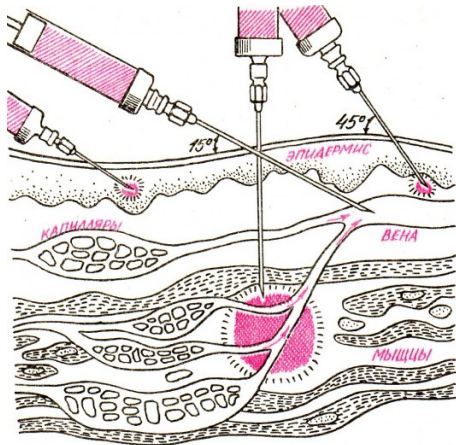
В зависимости от состава и объема вводимого препарата может варьировать степень выраженности ответной реакции животного. Так, при введении больших объемов маслянистых веществ у животного будет наблюдаться дискомфорт и после завершения манипуляции существует высокий риск расчесывания места укола. Введение адъювантов или веществ, обладающих агрессивными свойствами, требует особого подхода к фиксации животного при проведении манипуляции и может вызвать некротические изменения в области инъекции. Большие объемы вводимых лекарственных препаратов могут привести к передавливанию сосудов и нервов, расслоению жировой ткани, нарушению двигательной активности.



Объемы внутримышечного введения препаратов (мл/кг) и калибр иглы для инъекций по литературным данным

Источник литературы	Вид животного			
	мышь	крыса	морская свинка	кролик
S. Wolfensohn, 2003 J. Nau, 2011	2 максимум 0,05 мл за 1 введение 27G	0,5 максимум 0,1 мл за 1 введение 25G	0,5 максимум 0,1 мл за 1 введение 25G	0,06 максимум 0,25 мл за 1 введение 23-25G
К.-Н. Diehl, 2001	2 максимум 0,1 мл за 1 введение, не более 2-х инъекций в день	0,5 -1,0 максимум 0,1-0,2 мл за 1 введение не более 2-х инъекций в день	-	0,25-0,5
F.C. Hankenson, 2013	0,05 максимум 0,001 мл за 1 введение	0,1 максимум 0,02 мл за 1 введение	-	-
J. Fox, 2007	1,2÷2 максимум 0,05 мл за 1 введение ≤23G	-	-	-
J. Donna, 2011	-	-	0,06	-
M. Suckow, 2012	-	-	-	0,05; максимум 1,0 мл за 1 введение
И.П. Западнюк, 1983	25	50	5	4÷6
Р.У. Хабриев, 2005	25	50	20	7,5
Н.Н. Каркищенко, 2010	25	50	20	7,5
А.Н. Миронов, 2012	25	50	20	7,5
Э. Кибл, 2013	2	2,5	-	-

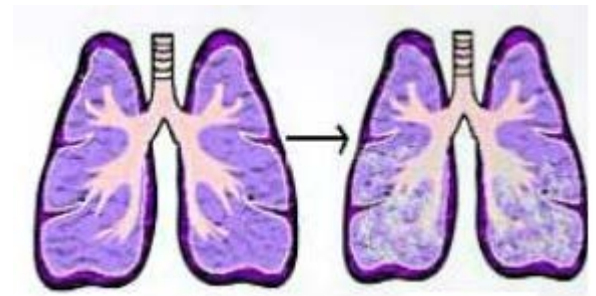
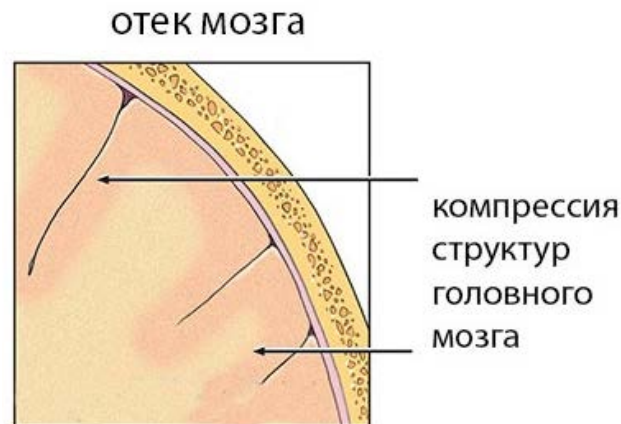
- При введении больших объемов препарата у животного может произойти инкапсуляция вещества, образование кист и дальнейшее асептическое абсцедирование в месте инъекции.
- В ветеринарной медицине для лечения грызунов и зайцеобразных многими авторами рекомендовано по возможности избегать внутримышечных инъекций из-за высокого риска травматизации седалищного нерва, а так же вероятности болевых ощущений и повреждения мышц у животного.



Объемы внутривенного введения препаратов (мл/кг) и калибр иглы для инъекции по литературным данным

Источник литературы	Способ введения препарата	Вид животного			
		мышь	крыса	морская свинка	кролик
S. Wolfensohn, 2003	болосное	5÷8 27-28G	5 25-27G	5 25-27G	2 23-25G
	инфузия	25	20	20	10
J. Nau, 2011	болосное	8	5	5	1,25
	инфузия	12 26G	20 25G	20 26G	10 23G
К.-Н. Diehl, 2001	болосное	5	5	-	2
	инфузия	25	20	-	10
F.C. Hankenson, 2013	болосное	5	5	-	-
	инфузия	25	20		
J. Fox, 2007	болосное	5*	-	-	-
	инфузия	25 ≤25G	-	-	-
M. Suckow, 2012	болосное	-	-		5
	инфузия	-	-		10÷20
И.П. Западнюк, 1983	инфузия	25	60	16	10
Р.У. Хабриев, 2005	инфузия	10÷25	20	20÷32	10
Н.Н. Каркищенко, 2010	инфузия	10÷25	20	20÷32	10
А.Н. Миронов, 2012	инфузия	25	20	32	10
Э. Кибл, 2013	инфузия	8	2,5	-	-
<i>Примечание:</i> *максимальное введение в хвостовую вену не более 0,2 мл					

Наиболее часто в качестве осложнений при больших объемах внутривенной инъекции встречаются отеки легких и головного мозга, разрывы магистральных сосудов и кровоизлияния. Введение больших объемов внутривенно может существенно влиять на свертывающую систему крови и приводить в дальнейшем к отсроченной гибели животного.



Объем крови, который можно отобрать у животных прижизненно



Вид животных	ОЦК, мл/кг
Мышь	75
Крыса	65
Мини-пиг	70
Хорек	60
Морская свинка	70
Хомяк	80
Кролик	55



С восполнением кровозамещающих жидкостей – не более 15% от ОЦК, не чаще 1 раза в месяц

Без восполнения объема ОЦК:

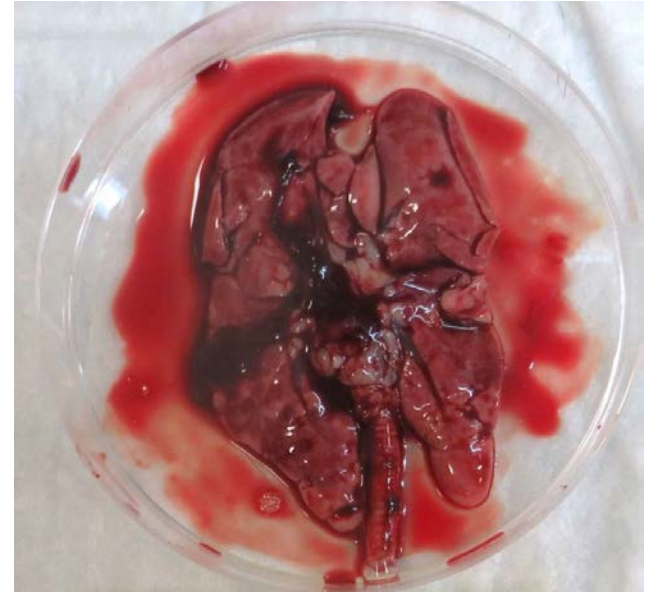
Забор крови, выполняемый один раз каждые 2 недели, не должен превышать 10% ОЦК

Забор крови, проводимый еженедельно, не должен превышать 7,5% ОЦК

Забор крови, выполняемый ежедневно не должен превышать 1% ОЦК

Выбор метода эвтаназии

- Правильный выбор метода эвтаназии должен быть основан на:
 - рекомендациях AVMA и FELASA для данного вида животного
 - предварительной оценке влияния данного вида эвтаназии на результаты исследования
 - наличии необходимого оборудования и квалифицированного персонала

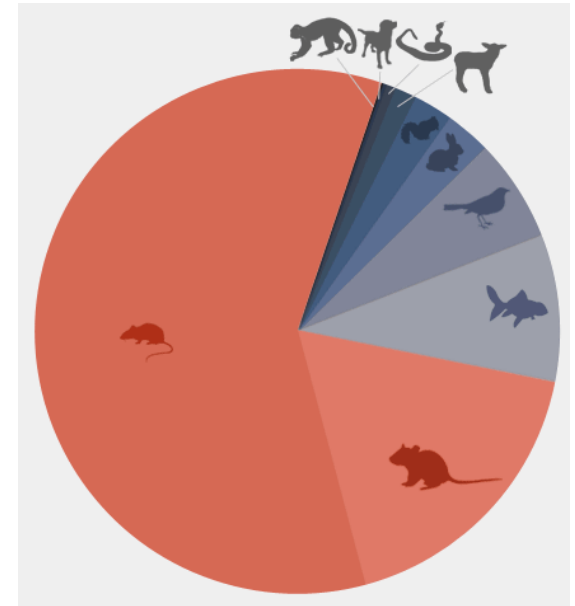


Способы эвтанази

Вид животных	Оптимальный способ	Приемлемый способ
Кролик	Внутривенное введение барбитуратов	Передозировка ингаляционного наркоза CO ₂ , дислокация шейных позвонков
Грызуны	Внутривенное введение барбитуратов и их комбинаций, комбинации диссоциативных агентов	Передозировка ингаляционного наркоза, CO ₂ , CO, трибромэтанол, этанол, дислокация шейных позвонков, декапитация, сфокусированное лучевое микроволновое облучение
Свиньи	Внутривенное введение барбитуратов	CO ₂ , CO, N ₂ , Ar, огнестрельное оружие, электрошок

Использование лабораторных крыс и мышей в ДКИ

- общие токсикологические исследования
- изучение метаболических нарушений
- онкологические заболевания
- поведенческие нарушения
- моделирование хирургических патологий



Использование лабораторных морских свинок в ДКИ

- моделирование дерматологических патологий
- моделирование заболеваний, связанных с гиперреактивным иммунным ответом



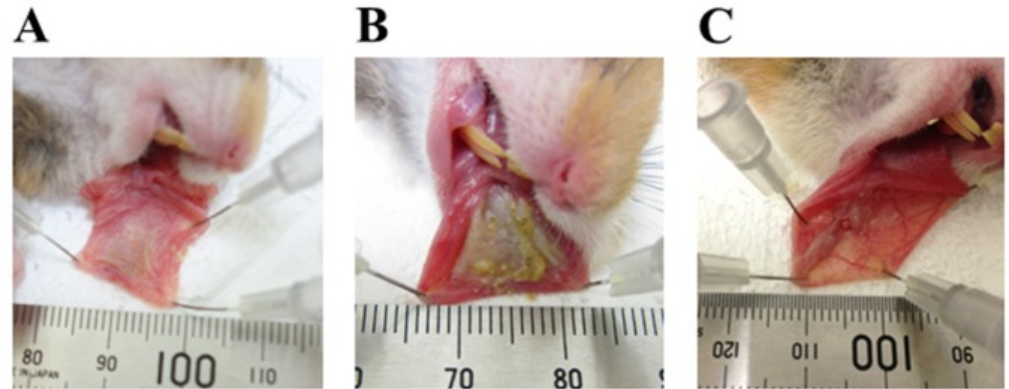
Использование лабораторных кроликов в ДКИ

- удобная тест-система для проведения фармакокинетики и общетоксических исследований
- возможность введения таблеток или капсул без разрушения лекарственной формы
- моделирование метаболических нарушений
- получение фармацевтических белков
- определения пирогенности лекарственных средств (вакцин, вывороток и др.)
- моделирование хирургических патологий
- моделирование офтальмологических патологий



Использование лабораторных хомяков в ДКИ

- наличие защечных мешков
- высокая резистентность к патогенам, но восприимчивость при моделировании инфекционных патологий (клостридиоз, микоплазмоз, токсоплазмоз)
- восприимчивы к метаболическим нарушениям (сахарный диабет, атеросклероз)
- моделирование нераковых респираторных заболеваний (ХОБЛ)



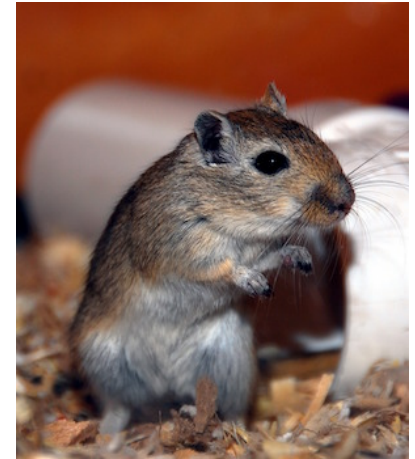
Suckow, M. The Laboratory Rabbit, Guinea Pig, Hamster, and Other Rodents // American College of Laboratory Animal Medicine. -2012. -1288pp.

Использование лабораторных песчанок в ДКИ

Изучение целого ряда инфекционных заболеваний:

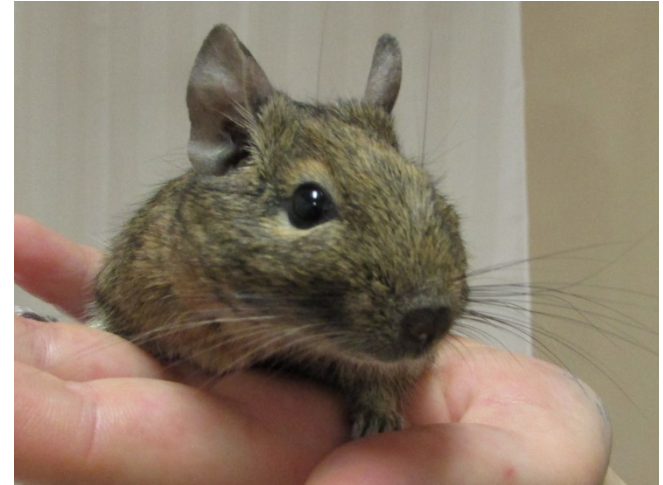
- Бактериальные (*Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Babesia divergens* и др.)
- Паразитарные (*Cryptosporidium scrofarum*, *Brugia malayi*, *Oryctolagus cuniculus* и др.)
- Вирусные (Вирус гепатита E, Вирус Пуумала (эпидемическая нефропатия и др.)

Большое внимание уделяется изучению моделированию патологий головного мозга (ишемия, реперфузия)



Использование лабораторных дегу в ДКИ

- изучение метаболических нарушений (сахарный диабет)
- атеросклероз
- моделирование болезни Альцгеймера
- изучение влияния препаратов на развитие плаценты
- моделирование инфекционных патологий



Использование лабораторных хорьков в ДКИ

- изучение респираторных вирусных заболеваний человека
- моделирование сердечно-сосудистой патологий
- изучение вестибулярных заболеваний
- исследование противорвотных свойств препаратов
- исследования канцерогенности и эффективности химиотерапии



Использование лабораторных карликовых свиней в ДКИ

- проведение фармакокинетики и биоэквивалентности
- изучение дерматологических заболеваний
- изучение влияния гормональных препаратов
- моделирование сердечно-сосудистых патологий
- моделирование заболеваний пищеварительного тракта
- изучение метаболических нарушений



Сопоставимость активности цитохрома P450 человека и некоторых видов животных

Активность P-450 в отношении:	Тип ингибирования наиболее схожий с человеком у:	Km/Vmax ферментативная активность наиболее схожая с человеком у:	Виды наиболее схожие с человеком:
Кумарин	мини-пигов, обезьян	кроликов, мини-пигов, обезьян	мини-пигов, обезьян
Диклофенак	-	крыс	?
Хлорзоксазн	-	Нет больших различий между видами	
Тестостерон	мышей, самцов крыс, мини-пигов, обезьян	мышей, самцов крыс, кроликов, мини-пигов, обезьян	мышей, самцов крыс, мини-пигов, обезьян
Лауриновая кислота	Нет больших различий между видами		

Bogaards J. J. P., Bertrand M., Jackson P., Oudshoorn M. J., Weaver R. J., van Bladeren P. J., Walther B. Determining the best animal model for human cytochrome P450 activities: a comparison of mouse, rat, rabbit, dog, micropig, monkey and man // Xenobiotica. -2000. -Vol. 30, №. 12. -P. 1131- 1152.

Сравнительная характеристика изоформ Р450 человека и мини-пига

Субстрат	Человек	Мини-пиг	Реакция
Метоксиресорифин	CYP1A2	CYP1A	О-деметилование
Кумарин	CYP2A6	CYP2A6	7-гидроксилирование
Никотин	CYP2A6	CYP2A6/?	О-оксидация
Диклофенак	CYP2C8/9	CYP2C9/?	4-гидроксилирование
Дебризохин	CYP2D6	ND	4-гидроксилирование
S-мефенитоин	CYP2C19	ND	4-гидроксилирование
Буфаралол	CYP2D6	CYP2B	1-гидроксилирование
Хлорзоксазон	CYP2E1	CYP2A/3A	6-гидроксилирование
Паранитрофенол	CYP2E1	CYP2A/?	2-гидроксилирование
Мидазолам	CYP3A4	CYP3A	1 и 4-гидроксилирование
Тестостерон	CYP3A4	CYP3A	6β-гидроксилирование
Нифедипин	CYP3A4	CYP3A	N-оксидация

Примечание:- ND- изоформа не определена

Bode G. et al. The utility of the minipig as an animal model in regulatory toxicology //Journal of pharmacological and toxicological methods. – 2010. – Т. 62. – №. 3. – С. 196-220.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ !!!

