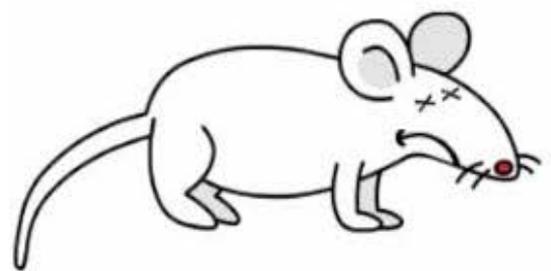
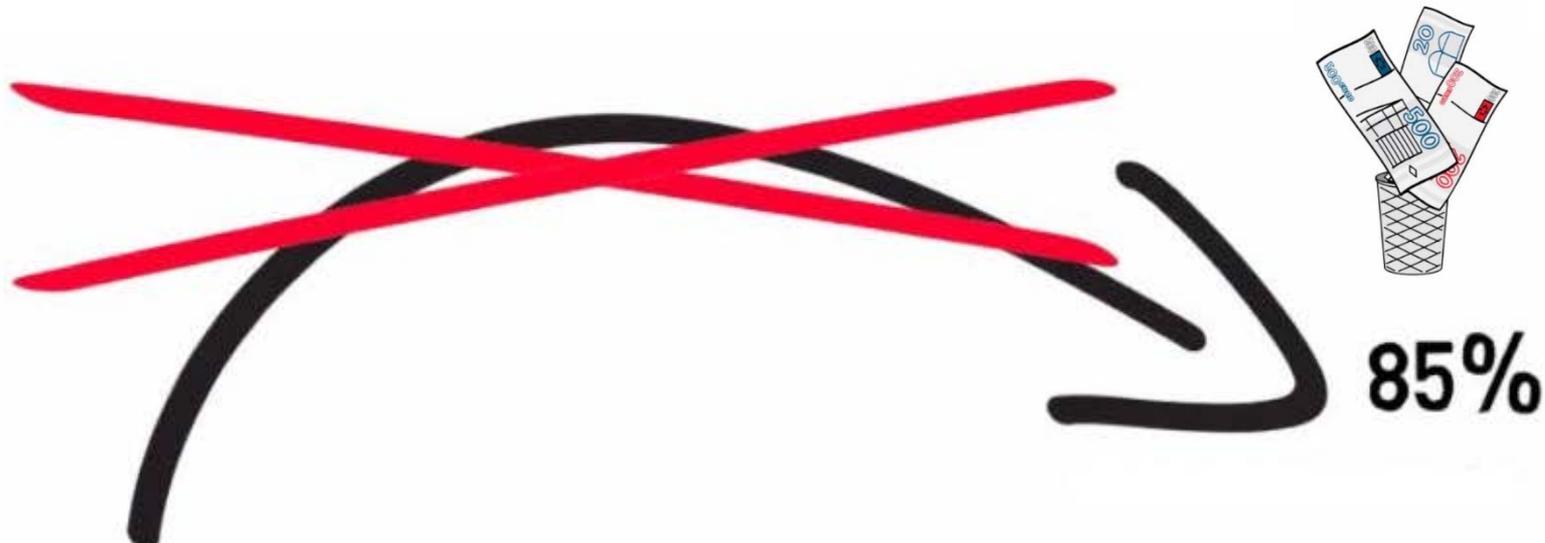


Биоразнообразие в доклинических исследованиях

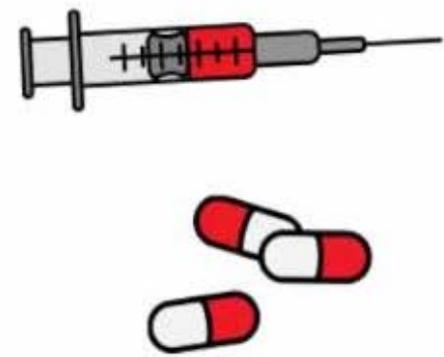


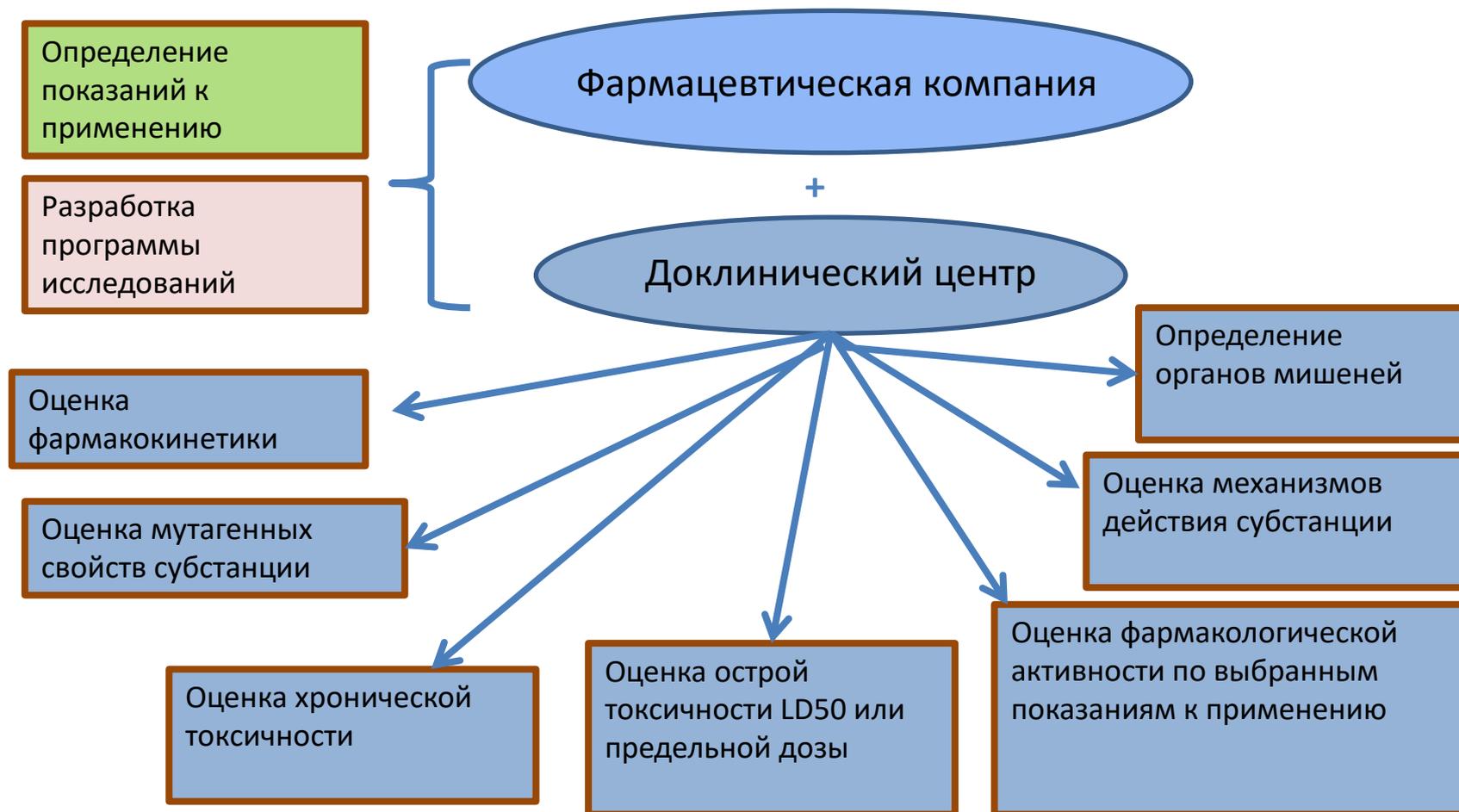
**VI Всероссийская конференция
с международным участием
«Актуальные вопросы доклинических и клинических исследований
лекарственных средств, биомедицинских клеточных продуктов и клинических
испытаний медицинских изделий»**

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

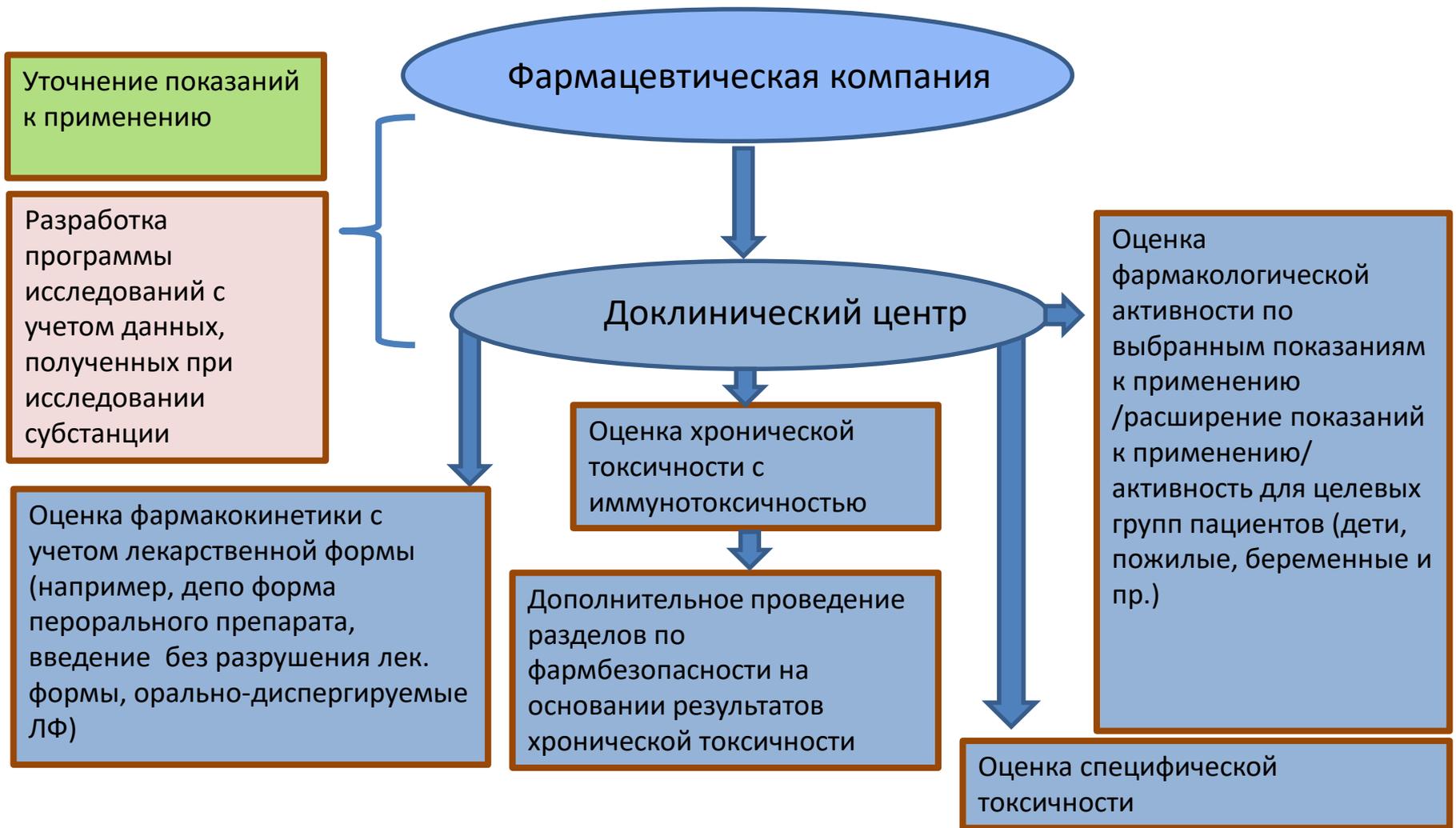


доклинические
исследования на животных





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., Гуцин 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



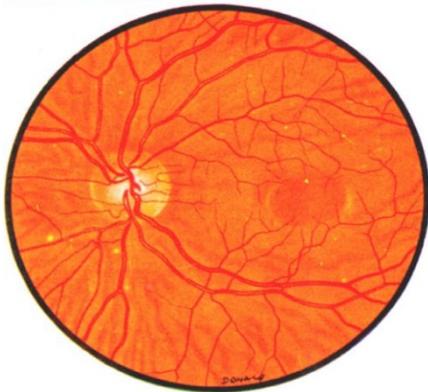
ИЗМЕНЕНИЕ
БИОДОСТУПНОСТИ!

Выбор тест системы для лекарственных форм

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

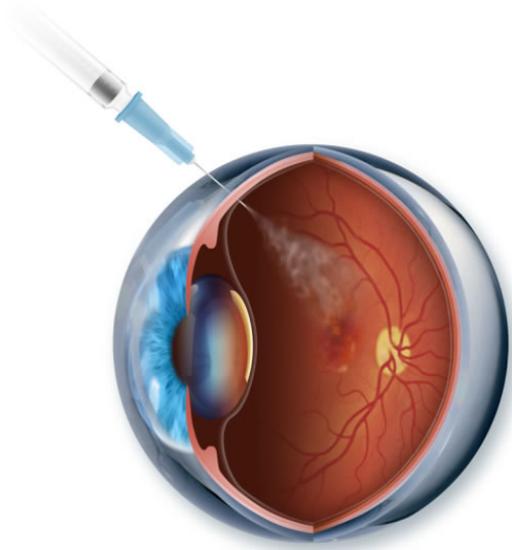


- Глазные, ушные, назальные капли (выбор тест системы определяется возможностью введения токсических объемов, возможностью проведения в динамике клинического осмотра глазного дна, регистрации истечения из носа, уха): [мыши и кролики](#).



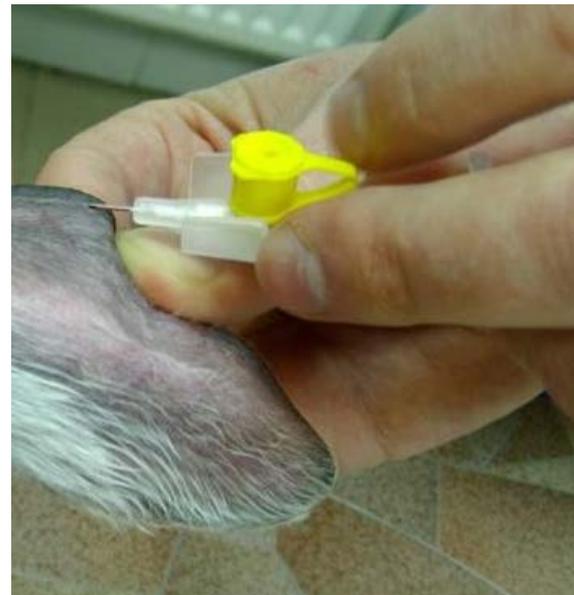
Выбор тест системы для лекарственных форм

- 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

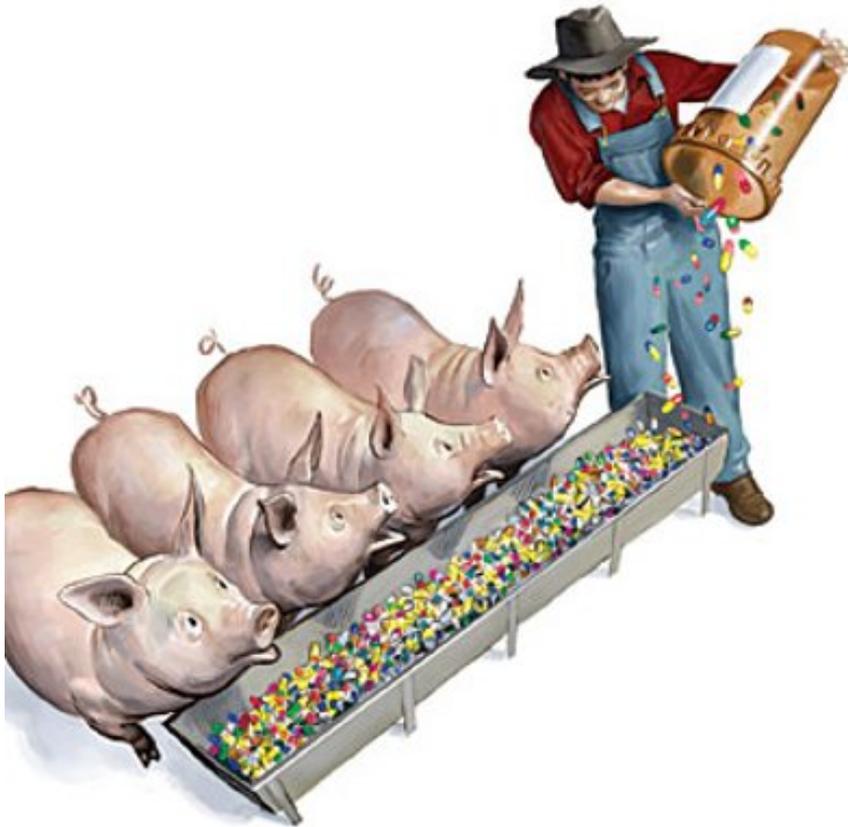
OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development – Протоколы по оценке токсичности

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

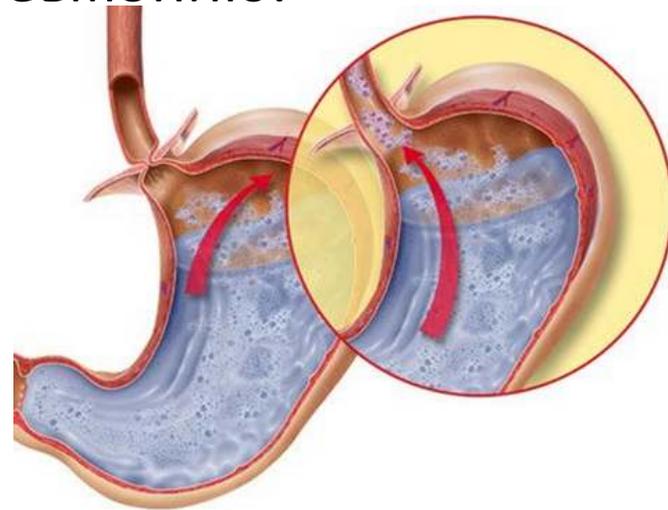
Объемы внутрижелудочного введения препаратов лабораторным животным (по литературным данным)

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.

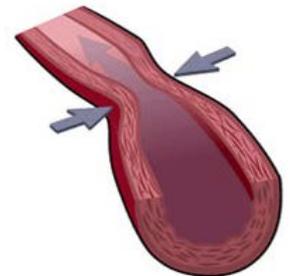
Введение лекарственных средств лабораторным животным внутрижелудочно в объемах, превышающих максимальные значения, может привести к перерастяжению и разрыву желудка, вызвать кишечную непроходимость, заброс пищевых масс в пищевод или трахею, что может вызвать растяжение пищевода, передавливание трахеи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

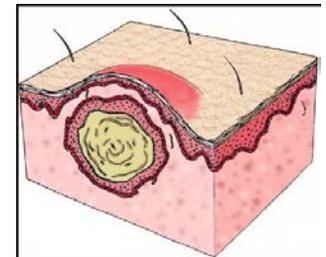
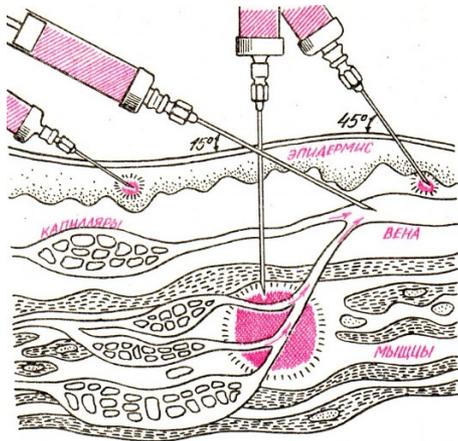
В зависимости от состава и объема вводимого препарата может варьировать степень выраженности ответной реакции животного. Так, при введении больших объемов маслянистых веществ у животного будет наблюдаться дискомфорт и после завершения манипуляции существует высокий риск расчесывания места укола. Введение 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	-	-

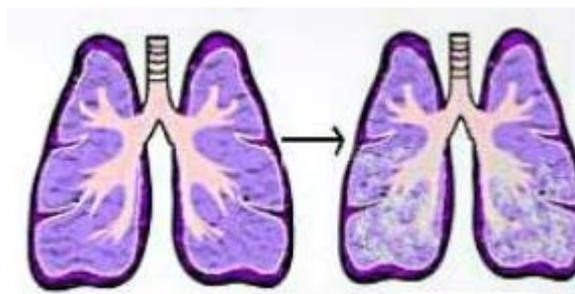
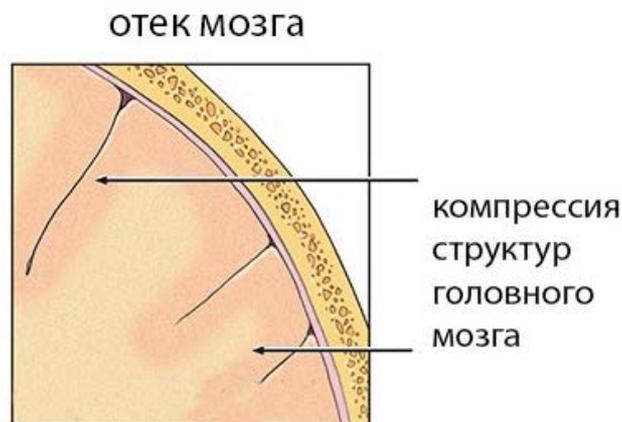
- При введении больших объемов препарата у животного может произойти инкапсуляция вещества, образование кист и дальнейшее асептическое абсцедирование в месте инъекции.
- В ветеринарной медицине для лечения грызунов и зайцеобразных многими авторами рекомендовано по возможности избегать внутримышечных 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:

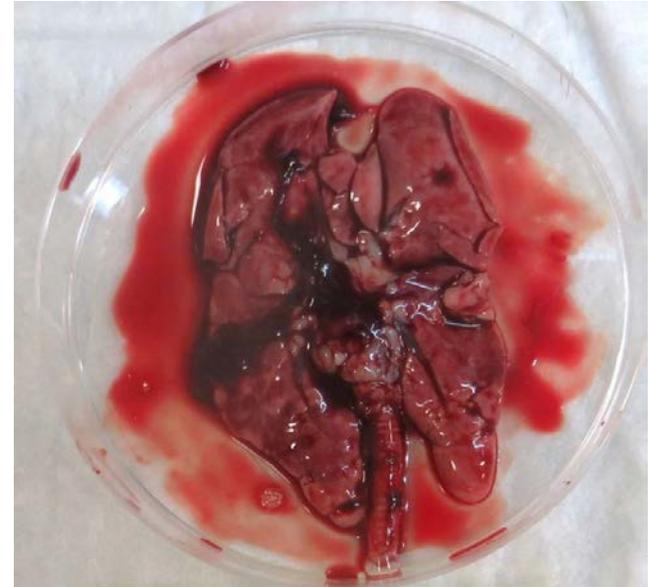
Забор крови, выполняемый один раз каждые 2 недели, не должен превышать 10% ОЦК

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

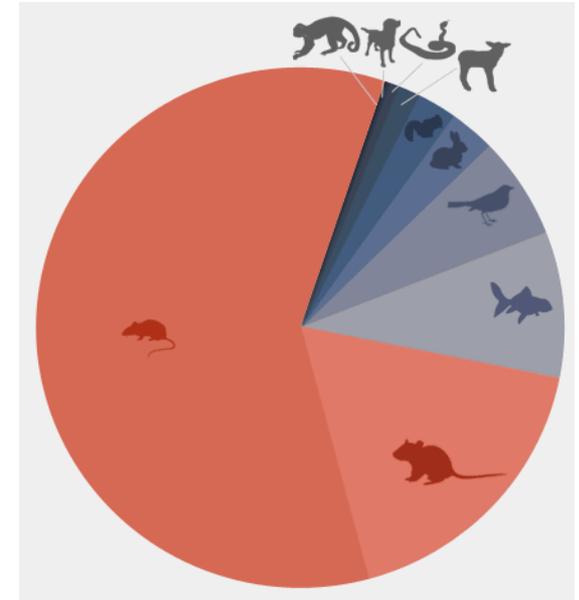


Способы эвтаназии

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



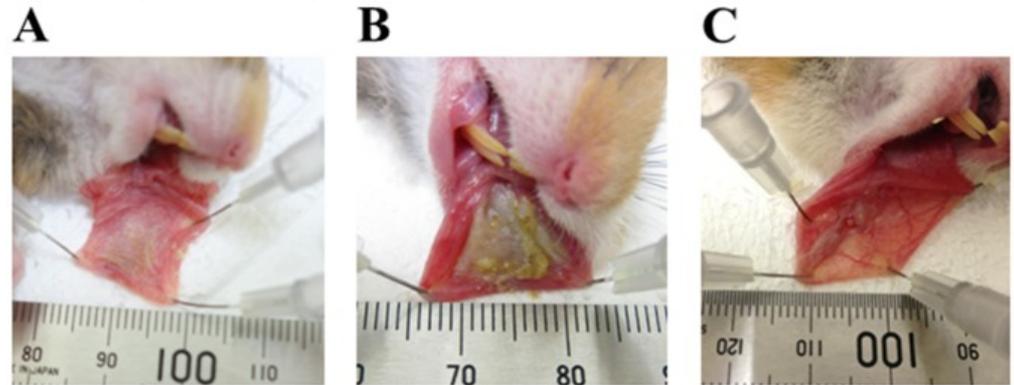
Использование лабораторных кроликов в ДКИ

- 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, выворотов 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)



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 !!!

