

Лекція № 4

Тема: Доклінічне вивчення безпеки лікарських речовин

План:

1. Поняття про доклінічні дослідження.
2. Вивчення загальнотоксичної дії.
3. Вивчення гострої токсичності
4. Вивчення хронічної токсичності
5. Дослідження специфічної токсичності

1. Поняття про доклінічні дослідження.

Доклінічні дослідження (ДІ) - це основоположний етап розробки та впровадження лікарського препарату (ЛП) в клінічну практику, що дозволяє своєчасно вивчити фармакологічні, токсичні та фармацевтичні властивості (ФС) і оцінити ефективність і безпеку фармакологічного засобу і складають значну частину реєстраційного дос'є, формованого з метою державної реєстрації ЛП. Результати доклінічного дослідження подаються разом з протоколом клінічних досліджень і проектом інструкції по медичному застосуванню для вирішення питання про можливість проведення клінічних досліджень.

З моменту формування ідеї про створення нового лікарського препарату, процес його розробки нерозривно пов'язаний з проведенням скринінгових доклінічних досліджень. Такі дослідження дозволяють оцінити ефективність того чи іншого речовини або їх комбінації і вибрати найбільш оптимальний склад майбутнього ЛП. Після затвердження складу ЛП проводять доклінічні дослідження безпечності та ефективності.

Доклінічні дослідження безпеки ЛП спрямовані на виявлення можливого шкідливого дії ЛЗ та оцінку безпеки його застосування. Такі дослідження умовно діляться на два великі блоки:

- Дослідження загальної токсичності, куди входить оцінка гострої, субхронічної і хронічної токсичності. На даному етапі відбувається виявлення токсичних доз і основних органів і систем організму, схильних до пошкоджуючої дії фармакологічного засобу.
- Дослідження специфічної токсичності спрямоване на виявлення репродуктивної токсичності (ембріотоксичності, тератогенності, впливу на генеративну функцію), алергенності, імунотоксичності, мутагенності і канцерогенності фармакологічного засобу.

Проводяться доклінічні дослідження на тваринах, щоб мінімізувати ймовірність несприятливих реакцій при випробуванні на людях. Саме доклініка дає можливість визначити показання до застосування препаратів, протипоказання і побічні ефекти, щоб надалі визначитися з об'ємом клінічних випробувань і самою можливістю їх проведення.

2. Вивчення загальнотоксичної дії.

Вивчення загальнотоксичної дії дозволяє вирішити наступні завдання:

1. Визначити стерпні і токсичні дози фармакологічного речовини.
2. Виявити найбільш чутливі до досліджуваного фармакологічному речовині органи і системи організму, характер і ступінь патологічних змін в них, а також дослідити оборотність викликаються пошкоджень.
3. Вивчити залежність токсичних ефектів від дози і тривалості застосування фармакологічної речовини.

Відповідно цим завданням дослідження загальнотоксичної дії підрозділяється на два етапи:

1. Вивчення «гострої» токсичності фармакологічного "PWT" при одноразовому або дробовому введенні через короткі (не більше 3-6 годин) інтервали протягом доби.

2. Вивчення «хронічної» токсичності при повторному тривалому введенні (тривалість введення визначається передбачуваним курсом клінічного застосування).

Умови проведення експерименту Токсикологічні дослідження обов'язковими як для субстанції, так і для всіх лікарських форм фармакологічного речовини. При проведенні дослідження субстанції в повному вивчення лікарської форми речовини може бути скорочено. Якщо лікарська форма містить допоміжні речовини (стабілізатори, розчинники і т.п.), недозволені для застосування в медичній практиці, то кожна з цих речовин досліджують окремо. При комбінації декількох фармакологічних речовин в одній лікарській формі (фіксована комбінація,) вивчають токсичність комбінації в цілому і кожного інгредієнта окремо, якщо він не був раніше дозволений для застосування в медичній практиці.

При зміні співвідношення інгредієнтів у комбінованій лікарській формі або збільшенні дозування, для вирішення питання про необхідність проведення токсикологічних досліджень слід провести переоцінку нової комбінації з точки зору безпеки її застосування.

Для проведення токсикологічного вивчення необхідно мати характеристику субстанції (попередню нормативну документацію; проект ВФС) фармакологічного речовини, згідно з якою воно ідентифікується, встановлюються межі вмісту домішок, визначається його стабільність. Дається також характеристика (проект ВФС) лікарської форми та допоміжних речовин, використаних при її отриманні (розчинники, наповнювачі, стабілізатори та ін.). Якщо характеристика фармакологічного речовини змінюється, наприклад, в результаті модифікації способу отримання субстанції або лікарської форми, слід оцінити вплив цієї зміни у зв'язку з даними, отриманими при токсикологічному вивченні вихідного фармакологічного речовини

Слід мати дані про розчинність, гідрофобності або ліпофільності фармакологічного речовини, розмір і форму кристалів. Якщо за умовами експерименту субстанцію досліджують у вигляді розчину або суспензії з використанням інгредієнтів, не зазначених у відповідних лікарських формах

фармакологічного речовини, необхідно привести характеристики цих інгредієнтів і дані про стабільність використовуваного розчину. При дослідженні хронічної токсичності застосування додаткових розчинників не рекомендується.

Для проведення токсикологічних досліджень повинні бути представлені дані, що характеризують терапевтичну активність фармакологічного речовини в експерименті на тваринах із зазначенням виду тварин, використаних моделей, доз і шляхів введення. Слід також вказати передбачувані напрямки клінічного вивчення фармакологічного речовини, рекомендовані дози, способи і тривалість застосування.

Для токсикологічних досліджень застосовують здорових статевозрілих тварин, що пройшли карантин не менше 10-14 днів. Необхідно вказати розплідник, з якого отримані тварини. Чи не контрольованими розплідниками користуватися не слід.

У тварин різних видів токсичність фармакологічних речовин може сильно відрізнятися, тому необхідно проводити дослідження на декількох видах тварин, причому поряд з гризунами обов'язково використовувати не гризунів. З гризунів найбільш зручні для токсикологічних експериментів миші та щури. Можна застосовувати також кроликів, морських свинок собак, а також міні-свиней і мавп. Іноді проводять експерименти на кішках, особливо при дослідженні гострої токсичності.

Токсикологічні дослідження можна проводити як на нелінійних, так і на лінійних тварин. В останньому випадку слід вказати лінію (штам, лінія) тварин, оскільки чутливість до фармакологічного речовини може змінюватися і всередині виду залежно від лінії.

Експерименти проводять на тварин обох статей, враховуючи отримані дані окремо для самок і самців.

Слід вказати вік тварин, тому залежно від віку може змінитися фармакокінетика і, у зв'язку з цим, - токсичність фармакологічного речовини. Для того щоб уникнути великого розкиду в досліджуваних показниках, рекомендується використовувати тварин одного віку. Динаміка маси тіла тварин залежить від багатьох факторів, у тому числі і від вихідної величини, тому розкид по вихідній масі не повинен перевищувати + 10%

Число тварин у кожній групі має бути достатнім для того, щоб оцінити характер і частоту прояву токсичних ефектів і дозволити піддати результати дослідів статистичній обробці. Разом з тим статистичний аналіз не повинен маскувати випадкові біологічні спостереження, якщо навіть вони статистично недостовірні.

При комплектуванні груп експериментальних тварин для хронічного токсикологічного експерименту треба мати на увазі необхідність дослідження динаміки можливого токсичного ефекту досліджуваного фармакологічного речовини, для чого слід виробляти поетапний забій тварин в процесі введення препарату і в різні терміни після закінчення його уведення з метою виявлення зворотності спостережуваної патології.

3. Вивчення гострої токсичності

Гостра токсичність - шкідливу дію препарату, що виявляється після його одноразового застосування або повторного введення через короткі (не більше 6:00) інтервали протягом доби.

Метою вивчення гострої токсичності є визначення переносимих, токсичних і летальних доз фармакологічного речовини і причин настання загибелі тварин.

Основні параметри гострої токсичності лікарського засобу можуть бути обчислені за допомогою будь-яких статистичних методів, проте краще користуватися методами, що дозволяють провести порівняльну оцінку досліджених параметрів для 2 або більше фармакологічних речовин, наприклад, методом Літчфілда і Уїлкоксона, Використаний метод повинен бути обов'язково зазначений у звіті,

Гостру токсичність слід вивчати на декількох видах тварин, причому обов'язково використовувати той вид, на якому був показаний терапевтичний ефект фармакологічного речовини і на якому буде досліджена токсичність при тривалому введенні. Зазвичай використовують 2-8 виду гризунів і не гризунів (миші, щури, морські свинки, кролики або ін.). Групи самців і самок піддослідних тварин формують окремо. Для дрібних гризунів кожна група повинна містити не менше 5-6 самок і такий же, кількість самців.

Кількість собак і кроликів у групі може бути 3-5. Загальна кількість дрібних гризунів, використаних в досвіді, має забезпечити можливість обчислення ЛДУ. Якщо через низьку токсичності фармакологічного речовини не можна визначити ЛД₅₀, слід вказати максимальну дозу, яка була введена тваринам.

У дрібних лабораторних тварин токсичність фармакологічного речовини зазвичай досліджують при декількох шляхах введення, причому обов'язково використовувати той шлях, при якому була показана терапевтична активність фармакологічного речовини, і шлях, який передбачається для клінічного вивчення. Фармакологічні речовини, призначені для системного введення, вводять всередину і парентерально (внутрішньочеревно, якщо вони не розчиняються у воді, внутрішньовенно і підшкірно, якщо вони розчинні). Слід враховувати, що при визначенні токсичності має значення концентрація і обсяг введеного фармакологічного речовини, а при внутрішньовенних ін'єкціях також швидкість введення. Фармакологічні речовини, пропоновані для місцевого застосування, наносять або вводять у відповідну область згідно способу, пропонованого для клініки. Крім того, додатково вивчають їх токсичність при системному застосуванні.

Фармакологічні речовини, пропоновані для прийому всередину, слід вводити через зонд, закладати на корінь язика, або давати у їжу.

Фармакологічні речовини, рекомендовані для інгаляції, вивчають, поміщаючи дрібних лабораторних тварин в затравочні камери, забезпечені спеціальними затравочного пристроями.

Порівняння параметрів токсичності при різних шляхах введення може дати орієнтовні дані про швидкість і ступеня всмоктування фармакологічного речовини, а зіставлення прямих, що відображають залежність величини токсичного ефекту від дози, дозволяє судити про подібність або відмінність в механізмах, що викликають летальний результат при різних шляхах введення.

Загальна тривалість спостереження за тваринами при дослідженні гострої токсичності повинна становити не менше 2-х тижнів, причому в перший День після введення тварини повинні перебувати під постійним наглядом.

Регулярно фіксують загальний стан тварин, особливості їхньої поведінки, інтенсивність і характер рухової активності, наявність і характер судом, координації рухів, тонус скелетних м'язів, реакцію на тактильні, больові, звукові та світлові подразники, частоту і глибину дихальних рухів, ритм серцевих скорочень, стан волосяного і шкірного покриву, забарвлення слизових оболонок, розмір зіниці, положення хвоста, кількість і консистенцію фекальних мас, частоту сечовипускання і забарвлення сечі, споживання кормами води, зміна маси тіла та інші показники, які можуть бути використані для виявлення токсичного ефекту. Для окремих фармакологічних речовин доцільно дослідити деякі гематологічні показники (морфологічні, біохімічні, згортання крові).

Дуже істотним є реєстрація термінів розвитку інтоксикації і загибелі тварин. Доцільно проводити макроскопічне дослідження внутрішніх органів загиблих тварин, а в разі відстроченої загибелі тварин і мікроскопічне дослідження (ступінь кровонаповнення органів, наявність крововиливів, виразок слизових оболонок тощо.).

4. Вивчення хронічної токсичності

Метою хронічних токсикологічних експериментів є характеристика ступеня ушкоджуючої дії фармакологічного речовини при його тривалому введенні, виявлення найбільш чутливих органів і систем організму, а також дослідження ступеня оборотності спричинених ним пошкоджень.

Тривалість введення фармакологічного речовини при вивченні хронічної токсичності залежить від передбачуваної тривалості при застосуванні в клініці (див. Таблицю).

Продолжительность введения фармакологического вещества экспериментальным животным в зависимости от длительности его применения у человека	
Длительность применения препарата у человека	Длительность введения фармакологического вещества животным
Однократное введение	5 - 7 дней
2 - 6 дней	14 дней
7 - 14 дней	1 месяц

Продолжительность введения фармакологического вещества экспериментальным животным в зависимости от длительности его применения у человека	
Длительность применения препарата у человека	Длительность введения фармакологического вещества животным
15 - 30 дней	2 - 4 месяца
1 - 6 месяцев	6 - 12 месяцев

Хронічну токсичність вивчають не менше, ніж на 2-х видах тварин. Бажано використовувати тварин, на яких був отриманий терапевтичний ефект. Зазвичай хронічні експерименти проводять на щурах, кроликах, морських свинках і собаках.

Якщо відтворене фармакологічне речовина досліджують паралельно з його оригінальним фірмовим аналогом (стандартне лікарська речовина), вивчення хронічної токсичності можна обмежити експериментами на гризунах (щурах, кроликах та ін.).

Групи піддослідних-тварини формують окремо із самок і самців. Групи дрібних лабораторних тварин повинні містити не менше 10 особин, великих тварин - не менше 4-х.

Основним способом введення фармакологічного речовини є спосіб, рекомендований для клінічного вивчення. Фармакологічна речовина, призначене для застосування всередину, вводять лабораторним тваринам через зонд в шлунок або закладають на корінь язика, т. К. Це забезпечує більш точне дозування, ніж додавання фармакологічного речовини в корм. Кількість фармакологічного речовини, одержуваного тваринам за один прийом, розраховують на одиницю маси тіла тварини в перерахунку на діючу речовину, (можна вести розрахунок на одиницю поверхні тіла). Фармакологічна речовина вводять у вигляді субстанції і тієї лікарської форми, яка буде передана в клініку.

Хронічну токсичність фармакологічного речовини при його системному застосуванні досліджують у двох-трьох (як правило, у трьох) дозах. При виборі доз керуються результатами, отриманими при дослідженні гострої токсичності фармакологічного речовини, його здатністю викликати кумулятивний ефект, а також максимальними добовими дозами, в яких фармакологічне речовина рекомендовано для клінічного вивчення.

Введення вищої дози передбачає виявлення можливих токсичних ефектів і загибель частини тварин. Ця доза може бути розрахована з урахуванням ЛД₅₀, отриманої при вивченні гострої токсичності досліджуваної речовини для даного виду лабораторних тварин. Мінімальна доза повинна бути близька до терапевтичної дози, що рекомендується для клінічного вивчення. Третя доза є проміжною. При постановці експериментів обов'язкова наявність контрольної групи тварин, що утримуються в таких же умовах, як і піддослідні, і одержуючих допоміжні інгредієнти, що входять до складу досліджуваної лікарської форми фармакологічного засобу, тим же способом, при якому вивчають токсичність самого речовини.

Фармакологічні речовини, призначені для щоденного застосування у людини, вводять експериментальним тваринам 7 днів на тиждень.

Протягом усього досвіду тварини повинні знаходитися під щоденним наглядом; відзначають споживання корму та води, стан волосяного покриву і слизових оболонок, поведінку. 1 раз на тиждень тварин зважують, регулярно (в досвіді тривалістю до 1 міс. - Не менше 2 разів, при більш тривалому дослідженні - не менше 3 разів) досліджують функціональний стан серцево-судинної, нервової, ендокринної, видільної і травної систем, вивчають морфологічні та біохімічні показники крові. Методи дослідження для оцінки функціонального стану органів і систем організму вибирає дослідник: вони повинні бути сучасними і досить чутливими, щоб забезпечити реєстрацію ознак можливого шкідливого дії досліджуваного фармакологічного речовини.

Всі тварини, загиблі протягом досвіду, піддаються розтину для встановлення характеру пошкоджуючої дії фармакологічного речовини. Після закінчення введення фармакологічного речовини проводять максимально повне обстеження експериментальних тварин за допомогою гематологічних, біохімічних і фізіологічних тестів. Частина тварин з кожної групи забивають для патоморфологічних досліджень. Визначають масу органів і проводять їх гістологічне дослідження. За тваринами, залишеними в живих, проводять спостереження протягом. 1 місяця, після чого їх обстежують в тому ж обсязі, що і тварин, забитих відразу після закінчення введення фармакологічного речовини. Для дослідження динаміки розвитку можливої інтоксикації періодично визначають досліджувані параметри. Досліди на дрібних лабораторних тварин проводять з таким розрахунком, щоб отримані результати можна було піддати статистичній обробці.

При оцінці змін, які спостерігаються у тварин у хронічному токсикологічному експерименті, необхідно виключити можливість впливу всіх побічних чинників, не пов'язаних з прийомом препарату (захворювання тварин, їх харчування, зміст тощо.).

Можуть виникнути спонтанні зміни гемограм, біохімічних показників і анатомічних характеристик, які слід враховувати при поясненні результатів. Не слід нехтувати непоясненими даними, їх належить піддати подальшого вивчення.

У ряді випадків на додаток до зазначених вище методам може знадобитися застосування електронної мікроскопії, гістохімічних, авторадіографічних та інших методів дослідження.

Патологічні зміни, що виникають у тварин після введення високих доз фармакологічного речовини, дають цінну інформацію для характеристики його токсичних властивостей, проте ця інформація повинна бути піддана ретельному аналізу і отримані результати слід розглядати як попередження, а не протипоказання для клінічних випробувань. '

При вирішенні питання про можливість передачі препарату на клінічне вивчення дослідник повинен врахувати наступні фактори:

1. Терапевтичну широту фармакологічного речовини, тобто співвідношення мінімальної токсичної і терапевтичної доз;
2. Характер і оборотність виявленої патології;

Висновок повинен містити судження дослідників про ступінь небезпечного гострого і хронічного отруєння на підставі проведених досліджень, прогноз можливих побічних реакцій і необхідних обмежень, при клінічних випробуваннях,

Результати доклінічних токсикологічних досліджень фармакологічного речовини є частиною матеріалів, оцінюваних в аспекті користі й ризику при дозволі клінічних випробувань.

5. Дослідження специфічної токсичності

5.1 Вивчення репродуктивної токсичності тест-зразка

1. Метою доклінічного вивчення репродуктивної токсичності тест-зразка є вивчення побічної дії лікарського засобу на статеву функцію і фертильність дорослих самців і самок лабораторних тварин, а також токсичного впливу на розвиток потомства.

2. Доклінічне вивчення впливу тест-зразка на статеву функцію і фертильність самців і самок лабораторних тварин включає вивчення:

- а) порушень репродуктивної системи;
- б) побічної дії на статеву зрілість;
- в) утворення і транспорту гамет;
- г) відповідності нормі циклу репродукції;
- г) статевої поведінки;
- д) здатності до відтворення потомства;
- е) протікання пологів;
- є) результатів вагітності;
- ж) передчасного репродуктивного старіння;
- з) змін інших функцій, що визначають цілісність репродуктивної системи.

3. Доклінічне вивчення побічної дії тест-зразка на розвиток потомства включає визначення відповідності нормам розвитку ембріона, а також потомства після народження за умов дії тест-зразка на кожного з батьків до запліднення і статевого дозрівання потомства в постнатальний період.

4. Основними показниками репродуктивної токсичності є:

- а) загибель організму, що розвивається;
- б) наявність у потомства лабораторних тварин структурних аномалій, порушень росту, функціональних дефектів.

5.2. Вивчення ембріотоксичності і тератогенності тест-зразка

1. Вивчення ембріотоксичності і тератогенності спрямоване на виявлення токсичного впливу тест-зразка на ембріон та плід за умови введення його самкам лабораторних тварин у період вагітності.

2. Відмова від проведення таких доклінічних досліджень у зв'язку з тим, що лікарський засіб не буде призначатися жінкам дітородного віку або з будь-яких інших причин, повинна бути обґрунтована.

3. Вивчення ембріональної/фетальної токсичності проводиться на двох видах ссавців, один з яких не повинен належати до гризунів. Дослідження в постнатальний період можуть проводитися на тваринах одного виду. Використовується вид тварин, для якого метаболізм тест-зразка подібний до такого самого у людини (за можливості). Один з видів тварин у дослідженнях ембріональної/фетальної токсичності має (за можливості) відповідати виду лабораторних тварин, що був використаний при вивченні токсичності при повторному уведенні тест-зразка.

5.3. Вивчення мутагенного та канцерогенного потенціалів тест-зразка

1. Метою вивчення мутагенної активності є виявлення змін у генетичному матеріалі "in vivo" або в клітинах "in vitro" під впливом досліджуваного лікарського засобу, здатних призвести до стійких спадкових змін порівняно з пращурами.

2. Вивчення генотоксичної дії тест-зразка проводиться з використанням методів "in vitro" та "in vivo". Набір тестів для дослідження генотоксичної дії містить:

тест генних мутацій у бактерій;

цитогенетичну оцінку хромосомних порушень у клітинах ссавців "in vitro" або аналіз генних мутацій у клітинах лімфоми миші "in vitro";

тест "in vivo" хромосомних порушень в клітинах гематопоезу гризунів.

3. Вивчення канцерогенної дії проводиться у разі, якщо:

а) досліджуваний лікарський засіб подібний за хімічною будовою до відомих канцерогенів;

б) при проведенні довготривалих токсикологічних досліджень тест-зразок спричинив підозрілі зміни;

в) виявлено мутагенну дію тест-зразка;

г) лікарський засіб планується призначати для регулярного прийому пацієнтові протягом тривалого періоду життя.