



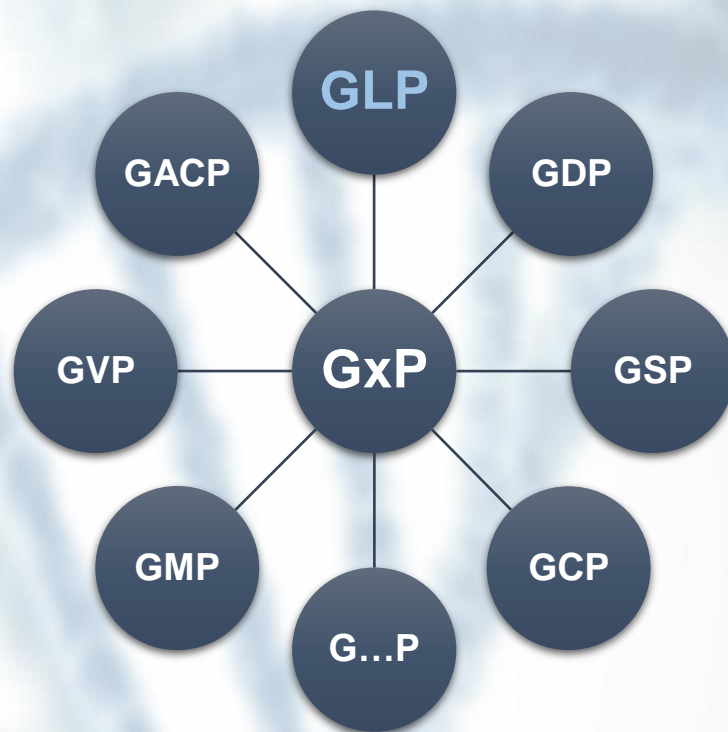
СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ



Конференция GLP – Planet

30 июня 2020
Санкт-Петербург

LD50: прошлое, настоящее, будущее



Филиппова

Ольга Всеволодовна

*Профессор кафедры промышленной фармации
Первого МГМУ им. И.М.Сеченова, д.м.н.*

Humanities > Issues

What is the LD50 Test?

SHARE FLIP EMAIL

PRINT

Тест LD50 является одним из самых противоречивых и бесчеловечных экспериментов, проводимых на лабораторных животных.



annedde/E+/Getty Images



Issues

▶ Animal Rights

Animals In Entertainment

By Doris Lin

Updated November 27, 2017

Updated and edited on May 20, 2016 by Michelle A. Rivera, About.com Animal Rights Expert

The LD50 test is one of the most controversial and inhumane experiments endured by laboratory animals. “LD” stands for “lethal dose”; the “50” means that half the animals, or 50 percent of the animals forced to endure testing the product, will die at that dose.

Основные претензии к ЛД50

- Тест LD 50 ненадежен
- Не все LD 50 были получены в условиях GLP
- Дорого и безжалостно
- LD 50 плохо определяет токсичность для человека

Значение LD50



LD50: разные исследователи

Литературные данные о ЛД50 препарата X

Значение LD50	Источник
200 мг/кг	(Cayman Chemical Company, 1996)
1124 мг/кг	(VHG Labs, Inc, 2013)
1480 мг/кг	(Bayer inc., 2013)
1500 мг/кг	(SigmaAldrich, 2014)

Калатанова А.В. И соавт., 2015

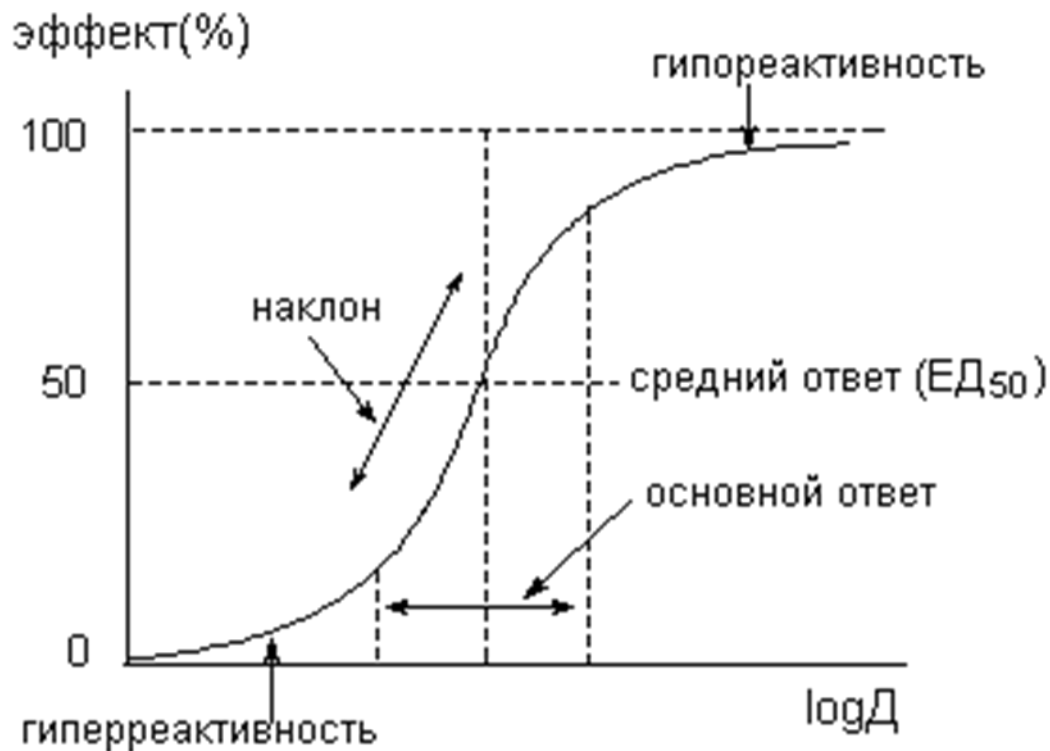
Острая токсичность: нормативная база

- Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств /Под ред. Миронова А.Н. и др. М., ЗАО «Гриф и К», 2012;
- Изучение острой токсичности в соответствии с OECD протоколами по тестированию химических веществ:

402	Острая кожная токсичность
403	Острая ингаляционная токсичность
404	Острое кожное раздражение
405	Острое глазное раздражение
420	Острая токсичность при внутрижелудочном введении, метод фиксированных доз
423	Острая токсичность при внутрижелудочном введении, кластерный метод
425	Острая токсичность при внутрижелудочном введении, метод «доза-ответ»
436	Острая ингаляционная токсичность, кластерный метод
439	In Vitro раздражение кожи: метод оценки реконструкции эпидермиса человека (оценка цитотоксичности — МТТ-тест)

Изучение острой токсичности по Руководству по проведению доклинических исследований лекарственных препаратов

Минимальный размер группы 5–6 особей грызунов, при использовании собак или кроликов 3–5 особей (самцы и самки отдельно).
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.



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

LD50 и протоколы OECD

- **Метод фиксированной дозы (протокол OECD 420 ГОСТ 32296-2013 «Методы испытаний по воздействию химической продукции на организм человека. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении методом фиксированной дозы»);**
- **Классовый метод (протокол OECD 423 ГОСТ 32644-2014 «Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Острая пероральная токсичность - метод определения класса острой токсичности»);**
- **Метод вверх-вниз (протокол OECD 425 ГОСТ 34557-2019 Методы испытания по воздействию химической продукции на организм человека. Испытания по оценке острой токсичности при внутрижелудочном поступлении);**

Классы опасности химической продукции, обладающей острой токсичностью по воздействию на организм

Класс	Критерии		
	При проглатывании (в/ж) *	При попадании на кожу (н/к) *	При вдыхании (инг.) *
1	$DL_{50} \leq 5$ мг/кг	$DL_{50} \leq 50$ мг/кг	$CL_{50} \leq 100$ ppm (газ) $CL_{50} \leq 500$ мг/м ³ (пар) $CL_{50} \leq 50$ мг/м ³ (пыль, аэрозоль)
2	$5 < DL_{50} \leq 50$ мг/кг	$50 < DL_{50} \leq 200$ мг/кг	$100 < CL_{50} \leq 500$ ppm (газ) $500 < CL_{50} \leq 2000$ мг/м ³ (пар) $50 < CL_{50} \leq 500$ мг/м ³ (пыль, аэрозоль)
3	$50 < DL_{50} \leq 300$ мг/кг	$200 < DL_{50} \leq 1000$ мг/кг	$500 < CL_{50} \leq 2500$ ppm (газ) $2000 < CL_{50} \leq 10000$ мг/м ³ (пар) $500 < CL_{50} \leq 1000$ мг/м ³ (пыль, аэрозоль)
4	$300 < DL_{50} \leq 2000$ мг/кг	$1000 < DL_{50} \leq 2000$ мг/кг	$2500 < CL_{50} \leq 20000$ ppm (газ) $10000 < CL_{50} \leq 20000$ мг/м ³ (пар) $1000 < CL_{50} \leq 5000$ мг/м ³ (пыль, аэрозоль)
5	<p>$2000 < DL_{50} \leq 5000$ мг/кг, в/ж или н/к.</p> <p>Имеются данные о существенном токсическом воздействии на организм человека.</p> <p>Имеются сведения о случаях гибели подопытных животных при испытаниях ($DL_{50} \leq 2000$ мг/кг, в/ж или н/к; $CL_{50} \leq 20000$ ppm (газ); $CL_{50} \leq 20000$ мг/м³ (пар); $CL_{50} \leq 5000$ мг/м³ (пыль, аэрозоль)).</p> <p>Наблюдались признаки серьезного клинического отравления при испытаниях ($DL_{50} \leq 2000$ мг/кг, в/ж или н/к; $CL_{50} \leq 20000$ ppm (газ); $CL_{50} \leq 20000$ мг/м³ (пар); $CL_{50} \leq 5000$ мг/м³ (пыль, аэрозоль)), за исключением случаев диареи, пилоэрекции или неопрятного вида.</p> <p>Имеются сведения о потенциальной возможности токсического поражения, полученные в ходе других исследований</p>		
* в/ж - внутривенно; н/к - наочно; инг. - ингаляционно			

LD50 *in silico*

Прогноз острой токсичности для препарата Прокаин: Результаты прогноза и экспериментальные данные, полученные для мышей

Животные, путь введения	Прогноз LD50, мг/кг	Эксперимент LD50, мг/кг [17]
Мыши, внутрибрюшинно (IP)	288	165
Мыши, внутривенно (IV)	1211	33
Мыши, перорально (Oral)	92	175
Мыши, подкожно (SC)	222	192

Общедоступный веб-ресурс MetaTox (<http://www.way2drug.com/mg>) для интегральной оценки токсичности ксенобиотиков.

Общий технический документ для регистрации лекарственных препаратов для медицинского применения. Безопасность (ICH M4S)

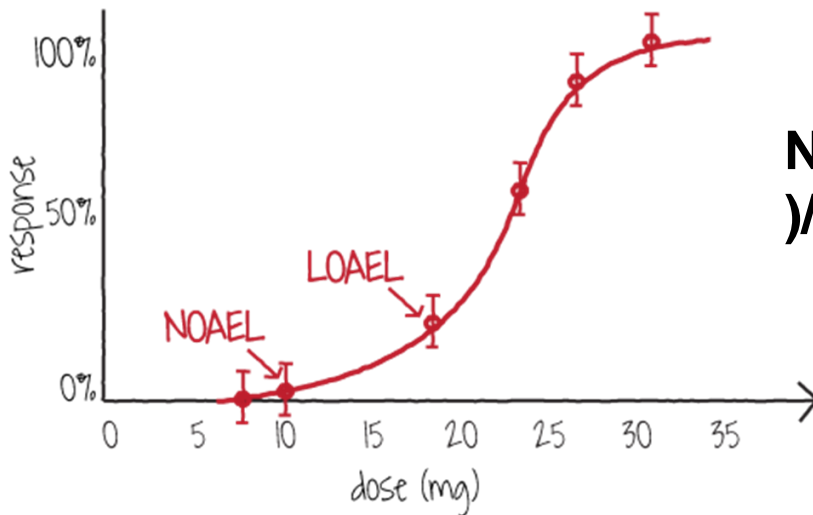
Токсичность при однократном введении:

- **Отчет:**
 - **Использованные дозы**
 - **Наблюдавшаяся максимальная нелетальная доза (мк/кг)**
 - **Приблизительная летальная доза (мк/кг)**
 - **Заслуживающие внимания данные**

NOAEL и LD₅₀

NOAEL - доза, не оказывающая видимого нежелательного эффекта (No-Observed Adverse Effect Level) - максимальная доза, при которой критический эффект еще не наблюдается; устанавливают для каждого из возможных критических эффектов (например, гепатотоксичность, летальность)

LOAEL - наименьшая доза, оказывающая явный нежелательный эффект" (Lowest Observed Adverse Effect Level) - наименьшая концентрация или количество действующего вещества, оказавшее в эксперименте нежелательное влияние на морфологию, функционирование, рост, развитие или продолжительность жизни организма-мишени, которое можно было бы отличить от аналогичных параметров у контрольных организмов-мишеней, относящихся к тому же биологическому виду и линии при заданных условиях экспозиции;



$$\text{NOAEL} = (\text{LD}_{50} * \text{вес человека (70 кг)}) / 2000$$

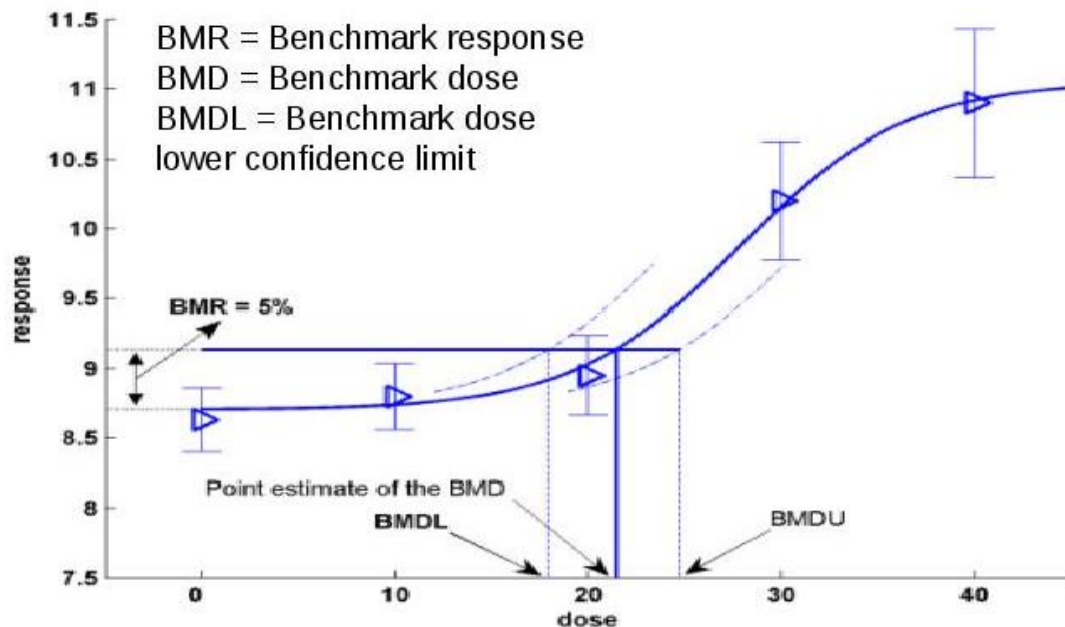
NOAEL, mg/kg

	Rat, мг/кг	Rabbit	Rat/Rabbit
FLUCONAZOLE	50	≤ 25	2
5-FLUOROURACIL	15	Not determined, <40 mg/kg	0,375
TOPIRAMATE	100 mg/kg	10 mg/kg	10
SAXAGLIPTIN	900 mg/kg	200 mg/kg	4,5

Ограничения NOAEL

- **зависит от дизайна исследования**
- **не учитывает изменчивость в оценке дозы-ответа**
- **не учитывает наклон кривой доза-ответ**
- **не всегда может применяться**

Метод пороговой (эталонной) дозы: Benchmark Dose (BMD)



Crump, K.S. (1984) A new method for determining allowable daily intakes. *Fundamental and Applied Toxicology* 4:854--871.

Рекомендован Агентством по охране окружающей среды США (EPA);

BMD - воздействие, обусловленное дозой вещества, связанной с определенной низкой частотой риска, обычно в диапазоне от 1% до 10%; или доза, связанная с определенной мерой или изменением биологического эффекта.

LD50 и GMP

- Оценка рисков
 - Персонал
 - Пациенты
 - Окружающая среда



LD50 и GMP

Решение Коллегии Евразийской экономической комиссии от 14.01.2020 N 1 "Об утверждении Руководства по установлению допустимых пределов воздействия на здоровье в целях идентификации рисков при производстве лекарственных средств на общих производственных (технологических) линиях"

Начало действия документа - 17.07.2020

Инструменты подхода к идентификации рисков

- **допустимое ежедневное воздействие (PDE)**
- **порог токсикологической угрозы (TTC)**
- **приемлемое суточное воздействие (ADE),**
- **предельно допустимая концентрация на рабочем месте (OEL)**

Параметры безопасности на рабочем месте

- PDE (Permitted Daily Exposure) - допустимая ежедневная экспозиция - максимальная допустимая доза конкретного действующего вещества, не вызывающая негативных последствий при **ежедневном** применении в течение всей жизни человека;

$$PDE = \frac{NOAEL \times \text{поправка на массу}}{F1 \times F2 \times F3 \times F4 \times F5},$$

- Предел воздействия на рабочем месте (OEL - Occupational Exposure Limit) - предельно допустимая концентрация в мкг/м³ - максимально допустимая ежедневная средняя концентрация АФИ во вдыхаемом воздухе для человека, которая может поглощаться без какого-либо вреда для здоровья.

$$OEL = NOAEL \cdot BW / SF \cdot V$$

- ОЕВ: (диапазон воздействия на рабочем месте) - объединение зон подобных OEL, чтобы упростить определение стратегий защиты от загрязнений.

LD50: проблемы и перспективы

- Сокращение количества животных
- Единая база данных
- компьютерное моделирование токсических процессов (Toxtree, QSAR Tool box и т.д.)





"Что является и что не является ядом? Все вещества являются ядами и не бывает веществ без ядовитости.

Только доза определяет ядовитость"

**Теофраст Бомбаст фон
Гогенгейм**

(Парацельс)

(1493—1541)



Спасибо за внимание!

ffiona@mail.ru