

Дизайн экспериментов - вклад биохимических методов

Фаустова Наталья Михайловна
Руководитель лаборатории иммуноферментного анализа,
АО «НПО «ДОМ ФАРМАЦИИ»

Доклинические исследования. Модуль 4 отчеты о доклинических исследованиях

4.2.1. Фармакология

4.2.1.1. Первичная фармакодинамика

4.2.1.2. Вторичная фармакодинамика

4.2.1.3. Фармакология безопасности

4.2.1.4. Фармакодинамические лекарственные взаимодействия

4.2.2. Фармакокинетика

...

4.2.3. Токсикология

4.2.3.1. Токсичность при введении однократной дозы

4.2.3.2. Токсичность при введении повторных доз (включая токсикокинетические данные)

4.2.3.3. Генотоксичность

4.2.3.4. Канцерогенность

4.2.3.5. Репродуктивная и онтогенетическая токсичность

4.2.3.6. Местная переносность

4.2.3.7. Другие исследования токсичности



Доклинические исследования (ДКИ) безопасности лекарственных средств

Основные цели состоят в выявлении:

- токсического влияния на органы-мишени,
- зависимости доза-эффект,
- связи с системной экспозицией,
- обратимости эффектов.

Данные ДКИ необходимы для:

- определения начальной (стартовой) дозы для клинических исследований
- определения диапазона безопасных доз
- **установления параметров клинического мониторинга потенциальных нежелательных явлений**

Исследование фармакологической безопасности		Патоморфологическое и гистологическое исследования
Оценка нефротоксичности	Общий и биохимический анализ мочи, микроскопия мочевого осадка.	<i>Массовые коэффициенты и гистологический анализ почек.</i>
Оценка гепатоксичности	Биохимический анализ крови и оценка системы гемостаза (ПВ, АЧТВ, фибриноген)	<i>Массовые коэффициенты и гистологический анализ печени</i>
Оценка дыхательной системы	Оценка частоты дыхательных движений, плетизмография, концентрация O ₂ и CO ₂ в крови	<i>Массовые коэффициенты и гистологический анализ легких</i>
Оценка кардиотоксичности	Электрокардиография; артериальное давление	<i>Массовые коэффициенты и гистологический анализ сердца</i>
Оценка функционального состояния ЦНС	Тест Ирвина	<i>Массовые коэффициенты и гистологический анализ головного мозга, спинного мозга</i>



Перечень «стандартных» показателей при токсикологических исследованиях

Клинический анализ крови

1. Количество эритроцитов
2. Уровень гемоглобина
3. Среднее содержание гемоглобина в эритроцитах
4. Гематокрит
5. Количество лейкоцитов
6. Лимфоциты
7. Лимфоциты
8. Моноциты
9. Моноциты
10. Гранулоциты
11. Количество тромбоцитов
12. Тромбокрит

Биохимический анализ крови

1. Глюкоза
2. Общий холестерин
3. Триглицериды
4. Мочевина
5. Креатинин
6. Общий белок
7. Альбумин (А)
8. Глобулины (G)
9. Отношение А/G
10. Общий билирубин
11. Аланинаминотрансфераза
12. Аспартатаминотрансфераза
13. Щелочная фосфатаза
14. Лактатдегидрогеназа
15. Ионы (натрий, калий, хлор, кальций, железо)

Оптимальный дизайн экспериментов



Концепция «3R»:
усовершенствования,
уменьшения и замены
методов исследований
на животных.
(Refinement, Reduction,
Replacement)

Несмотря на этические
проблемы и
альтернативные
методы оценки
токсичности и фарм.
активности **полный
отказ от ДКИ на
животных невозможен**

Принцип
«Reduction» -
реализация
методических
подходов, чтобы
получить **больше
данных на том же
или меньшем
количестве
животных**



Биохимические маркеры «спешат на помощь»...

- Разрабатываются новые методы использования биомаркеров для оценки биологических изменений, указывающих на будущие неблагоприятные последствия для здоровья
- Анализ биожидкостей (кровь, моча, слюна и др.)
• Кровь - биоматериал, который взаимодействует с каждой живой клеткой, и считается наиболее подходящей биожидкостью для выполнения различных анализов.
- Количественные данные о содержании и распределении биомаркеров и их соотношения используются токсикологами



Классы биомаркеров

«**Биомаркер** - практически любой измеряемый показатель, отражающий взаимодействие между биологической системой и фактором окружающей среды (химический, физический или биологический). Этот показатель может быть функциональным, физиологическим или биохимическим и отражает взаимодействие на клеточном или молекулярном уровне»

Биомаркеры делят на три класса:

- биомаркер экспозиции,
- биомаркер эффекта,
- биомаркер чувствительности.

Выявление пригодных для практического использования биомаркеров в ДКИ, требует междисциплинарных исследований и сотрудничества, особенно при изучении токсичности, канцерогенеза, нейротоксичности, иммунотоксичности.



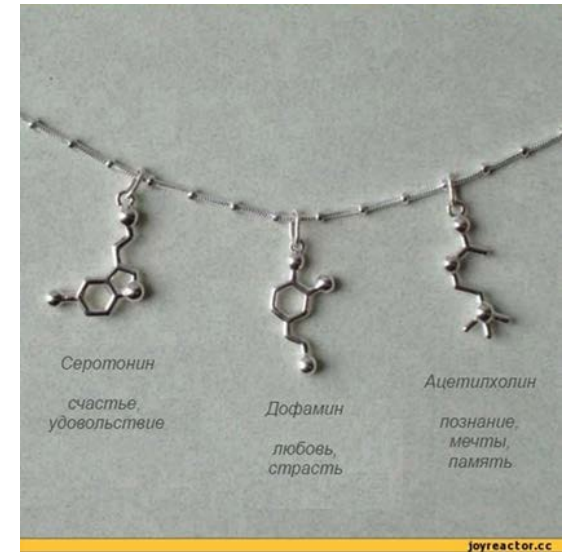
Примеры биомаркеров эффекта в токсикологии

Биомаркеры токсического действия	Определяемые показатели
➤ <i>на систему крови</i>	Общий клинический анализа крови; клеточный состав костного мозга животных
➤ <i>на выделительную систему (нефротоксичность)</i>	Креатинин, мочеви́на и б-микроглобулин в сыворотке крови; анализ мочи; KIM-1 (молекула повреждения почек), NAGN (ацетил-D-глюкозаминидаза), цистатин С
➤ <i>на печень (гепатотоксичность)</i>	АЛТ и АСТ в сыворотке крови; щелочная фосфатаза (+соотношения ферментов АЛТ/АСТ ; ЩФ/АЛТ); лактатдегидрогеназа, 5-нуклеотидаза, алкогольдегидрогеназа и др.; тиостатин [tiostatin (Tt)]
➤ <i>на респираторную систему</i>	Число нейтрофилов и количество белков, содержащихся в бронхо-альвеолярном лаваже, концентрация цитокинов (ФНО-альфа), концентрация O ₂ и CO ₂ в крови, HIF-1 (фактор, индуцируемый гипоксией-1)
➤ <i>на репродуктивную систему и развитие</i>	ФСГ, ЛГ, эстрадиол , тестостерон в сыворотке крови
➤ <i>на нервную систему (нейротоксичность)</i>	Белок S100b, основной белок миелина (МВР) в сыворотке крови / в тканях мозга

Эндокринная система:

оценка изменений при токсикологических исследованиях?

Эндокринная система координирует работу практически всех органов и систем организма позвоночных, в том числе такие биологические функции, как метаболизм, развитие, размножение и поведение.



На сегодняшний день накоплено значительное количество информации **об эндокринных нарушениях при использовании химических соединений, в том числе лекарственных средств (эндокринных дизрапторов), в различных отраслях деятельности человека**

Что такое эндокринный дизраптор?

Эндокринный дизраптор – это экзогенное вещество или смесь веществ, которые изменяют функцию эндокринной системы и, как следствие, оказывают неблагоприятные последствия для здоровья организма, его потомков или (суб)популяцию.

[The World Health Report 2002. Reducing Risks, Promoting Healthy Life. WHO, 2002].

Эндокринные дизрапторы — экзогенные вещества; содержатся в почве, воде, воздухе, пищевых продуктах и некоторых промышленных изделиях, которые, поступая в организм, оказывают гормоноподобные эффекты: нарушают гомеостатические механизмы регуляции эндогенными гормонами процессов жизнедеятельности живых организмов.

[Яглова НВ, Яглов ВВ. Эндокринные дизрапторы новое направление исследований в эндокринологии. Вестник Российской академии медицинских наук. 2012;67(3):56-61]

Влияние на эндокринную систему

Эндокринные дизрапторы →

проблемы метаболизма, развития, поведения и др.

Основные концепции эндокринных нарушений:

➤ *длительный латентный период между воздействием и проявлением дисфункции*

(«эмбриональная основа болезней взрослого»);

➤ *нелинейная дозозависимость*

(противоположность фундаментальному токсикологическому принципу «*Sola dosis facit venenum*»);

➤ *зависимость степени нарушений от времени воздействия.*

Основные вертикальные оси гормональной регуляции

1. Тиреотропная ось:

Гипоталамус – Гипофиз – Щитовидная железа

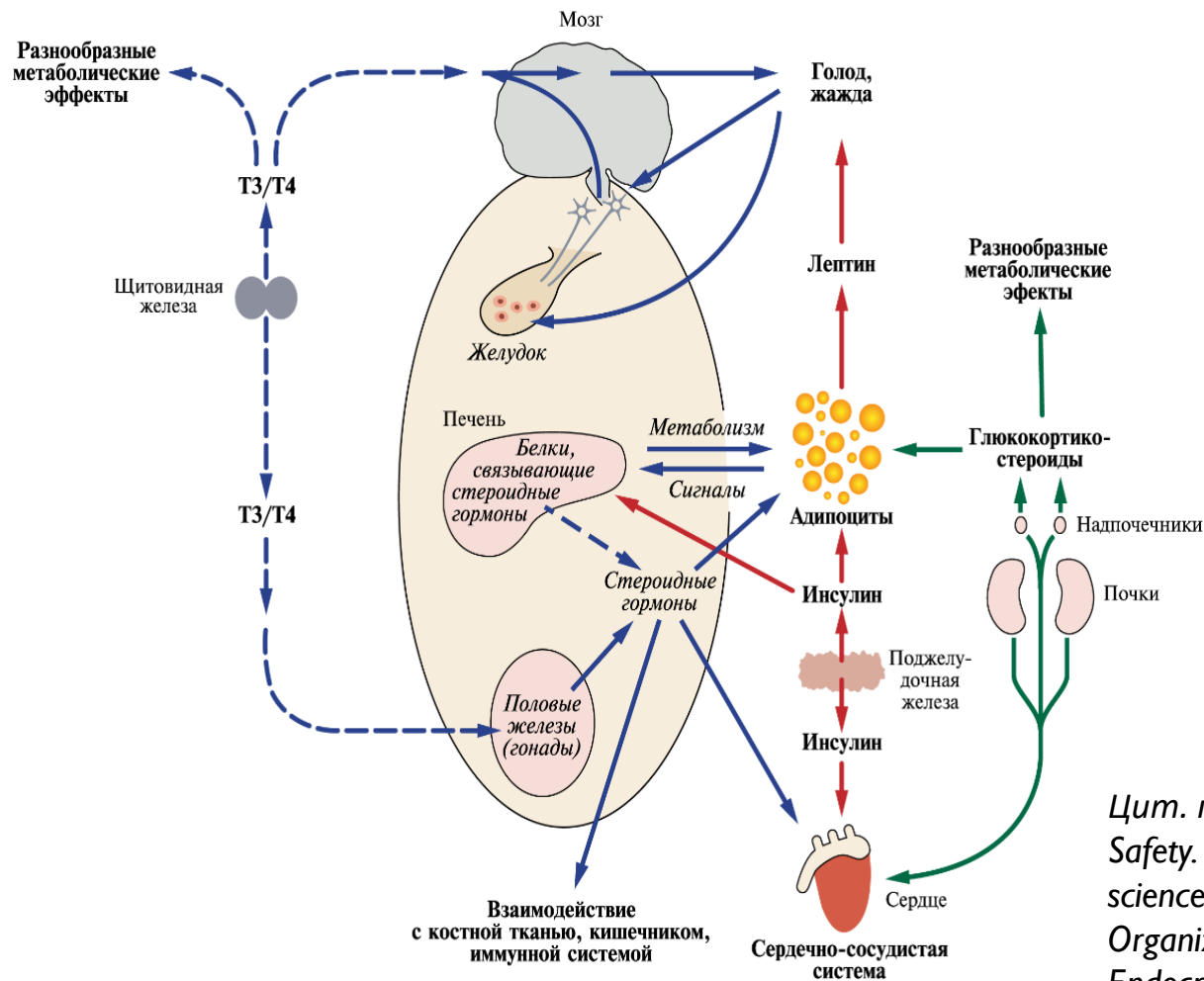
2. Гонадотропная ось:

Гипоталамус – Гипофиз – Гонады

3. Кортикотропная ось

Гипоталамус – Гипофиз – Кора надпочечников

Схематическая диаграмма для иллюстрации некоторых перекрестных механизмов взаимодействия эндокринных осей



Важное следствие взаимодействия осей:

Изменения, индуцированные в одной эндокринной оси, оказывают влияние на изменения в других.

Цит. по: International Programme on Chemical Safety. Global assessment on the state of the science of endocrine disruptors. World Health Organization. Chapter 3: Endocrinology and Endocrine Toxicology. 2002.

ОСНОВНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ ЭНДОКРИННЫХ ДИЗРАПТОРОВ

4. Эпигенетические механизмы в гормон-продуцирующих клетках или клетках-мишенях (модификация хроматина, метилирование ДНК ...)

1. Взаимодействие с гормональным рецептором по принципу лиганда или агониста

5. Влияние на внутриклеточный сигналинг

6. Влияние на транспорт гормонов через клеточные мембраны

2. Антагонизм к гормональному рецептору

7. Влияние на синтез гормонов (изменение экспрессии ферментов)

8. Влияние на уровень циркулирующих гормонов (через изменения белков-переносчиков)

3. Влияние на экспрессию гормонального рецептора

9. Изменение метаболизма и клиренса гормонов

10. Влияние на структуру и организацию тканей

Примеры лекарственных препаратов, влияющих на эндокринную систему

МНН	Фармакотерапевтическая группа	Известные негативные эффекты
Функции щитовидной железы		
Амиодарон	Антиаритмическое средство	Гипотиреоз (вследствие ингибирования поглощения йода фолликулярными клетками)
Алемтузумаб	Селективный иммунодепрессант	Гипертиреоз (следствие активации аутоиммунных механизмов)
Интерлейкин-2	Цитокин	Гипотериоз (из-за повышенного уровня антитироглобулина и антитиреоидных микросомальных антител)
Половая функция		
Вальпроевая кислота	Противоэпилептическое средство	Прямое токсическое действие на ткани яичек, приводит к эректильной дисфункции
Карбамазепин	Противоэпилептическое средство	Увеличение синтеза глобулина, связывающего гормоны; снижение уровня половых гормонов
Тамоксифен	Противоопухолевое средство	Остановка овуляции (снижение синтеза ЛГ, блокирование рецептора эстрогена)

Примеры лекарственных препаратов, влияющих на эндокринную систему

МНН	Фармакотерапевтическая группа	Известные негативные эффекты
Углеводно-липидный обмен*		
Ставудин, зидовудин; Ритонавир	Противовирусное [ВИЧ] средство	Усиление процессов липолиза, приводящее к увеличению свободных жирных кислот в плазме и резистентности к инсулину
Хлорталидон	Диуретическое средство	Повышенный уровень глюкозы в крови натошак, являющийся следствием гипокалиемии, что приводит к снижению секреции инсулина
Симвастатин, аторвастатин	Гиполипидемическое средство – ингибитор ГМГ- КоА-редуктазы	Повышенная резистентность к инсулину и снижение экспрессии GLUT4 в адипоцитах

* В качестве дополнительного маркера оценки влияния препаратов на углеводный обмен можно рекомендовать измерение уровня гликозилированного гемоглобина (кроме карликовых свиней)

Регуляторные аспекты оценки безопасности эндокринных дизрапторов

Руководства	Краткая характеристика
1. Guidance document on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. Paris: OECD; 2012	Интерпретации результатов отдельных тестов и сбора доказательств того, может ли вещество быть эндокринным дизраптором
2. Revised guidance document 150 on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption. Paris: OECD; 2018.	Концепция и программа тестирования, а также подходы к анализу данных
3. Test No. 408: Repeated dose 90-day oral toxicity study in rodents. Paris: OECD; 2018	Анализ стандартных клинико-лабораторных показателей + <u>обязательная оценка уровней гормонов щитовидной железы Т3, Т4 и ТТГ в сыворотке крови как индикаторов гормональной активности.</u> Дополнительные рекомендуемые параметры: тестостерон, эстрадиол, ФСГ, ЛГ; спермограмма

Уровни гормонов в крови животных как индикаторы гормональных нарушений

Стандартные ДКИ

- Оценка влияния лекарственных средств на эндокринную систему путем гистологического исследования эндокринных желез

НО: отсутствие микроскопических изменений ткани не всегда отражает функциональные нарушения в работе эндокринной системы

Рекомендации

- Определение уровня ключевых гормонов в крови животных в исследованиях общей токсичности при многократном введении или при изучении репродуктивной токсичности

Для специалистов ДКИ и врачей важна информация не только о присутствии биомаркера в организме, а отклонение от того, что было принято за «норму».

Содержание некоторых гормонов основных вертикальных осей у человека и лабораторных животных

Гормон	Мужчины	Женщины	Крысы	Кролики	Карликовые свиньи
Тиреотропная ось					
<i>Тиреотропный гормон (ТТГ), мМЕ/л</i>	0,3 – 5,0		0,07–0,10	0,56 –0,70	<u>≥0,03</u> 0,01–0,38
<i>Трийодтиронин (Т3), нмоль/л</i>	1,2–3,1		6,1–7,2 ; 0,38–1,53	2,3 – 2,7; 1,7 – 2,1	<u>1,3 – 2,7;</u> 4,1 – 98,7
<i>Тироксин (Т4), нмоль/л</i>	39–155		<u>44,1–51,5*</u> ; 45,3–61,0; 37,5–87,5	23,8–51,3; 52,4–72,0	<i>Самцы:</i> <u>35 – 43;</u> 43–356 <i>Самки:</i> <u>30 – 89;</u> 17 – 243

* - Собственные данные выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

Содержание некоторых гормонов гонадротопной оси у человека и лабораторных животных

Гормон	Мужчины	Женщины	Крысы	Кролики	Карликовые СВИНЬИ
<i>Тестостерон, нмоль/л</i>	4,5–35,4	0–3,1	<i>Самцы:</i> <u>0,64–21,2*</u> <i>Самки:</i> 0,94–3,47	<i>Самцы:</i> 50,6–56,2 <i>Самки:</i> 0,08–0,14	<i>Самцы:</i> <u>4,4–27,8;</u> 5,1–25,2
<i>Эстрадиол, пг/мл</i>	30 – 68	28 – 178 // 51 – 549	<i>Самцы:</i> 37,2–43,4 <i>Самки:</i> <u>47–191</u>	<i>Самки:</i> 408–564	<i>Самки:</i> <u>29–85;</u> 30–90
<i>Прогестерон, нмоль/л</i>	0,5 – 6,0	0,5 – 6,0 // 10 – 94	18,7–21,3	4,6 – 10,0	66,8 – 270; 63,6 – 175
<i>ФСГ, нг/мл</i>	0,05 – 0,55	0,07 – 0,68 // 1,04 – 6,78	<i>Самцы:</i> 8,6 – 12,2 <i>Самки:</i> 4,0 – 7,0	1,1 – 5,5	<i>Самцы:</i> <u>1,1-4,5</u> <i>Самки</i> <u>1,5 – 7,2</u>
<i>Лютеинизирую щий гормон (ЛГ), нг/мл</i>	0,13 – 2,0	0,13 – 2,34// 1,75 – 13,4	<i>Самцы:</i> 0,3 – 0,5 <i>Самки:</i> 0,1 – 0,5	0,55 – 1,4	<i>Самцы:</i> <u>0,64 – 3,1;</u> <i>Самки:</i> <u>1,2 – 7,8</u>

► * - Собственные данные выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

Содержание некоторых гормонов кортикотропной оси у человека и лабораторных животных

Гормон	Мужчины	Женщины	Крысы	Кролики	Карликовые свиньи
<i>Адренокортикотропный гормон (АКТГ), пг/мл</i>		6 – 76	<i>Самцы</i> <u>83 – 162</u> 6,3 – 12,7 Самки: 12,0 – 7,0	95-165	90 – 170
<i>Кортизол, нмоль/л</i>	138 – 635 (утро) 82 – 441 (вечер)		<u>65-106</u> 26,6-44,0	22-27 (утро) до 38 (вечер)	<i>Самцы</i> 25-33; <i>Самки:</i> 14,1 – 18,5
<i>Кортикостерон, нмоль/л</i>	3,8 – 66,5		<i>Самцы</i> <u>197-1205</u> 655-855 <i>Самки:</i> <u>258-387;</u> 1015 -1415	<u>252 – 284;</u> 59-73	Нет данных No date

► * - Собственные данные выделены жирным шрифтом и подчеркнуты

Интерпретация результатов

- Оценка только уровня того или иного биохимического маркера (в том числе гормонов) с позиции нормы или выхода за пределы нормальных значений не всегда является достаточной.
- В клинической практике наблюдается тенденция к использованию показателей, изменение которых происходит на ранних сроках биологических нарушений, поэтому дополнительно к определению абсолютных значений уровней гормонов рассчитывают интегральные показатели.
- В ДКИ используют животных, у которых интактный гормональный фон может отличаться от гормонального фона человека, поэтому важно знать нормальные значения уровней отдельных гормонов и их соотношений для разных видов животных.

Использование соотношения гормонов как дополнительных биохимических маркеров

Соотношение гормонов	Характеристика как маркера
Интегральный тиреоидный индекс (ИТИ): отношение суммы гормонов щитовидной железы (Т3, Т4) к ТТГ	Наиболее ранний маркером развития дисфункции органа: повышение ИТИ свидетельствует о гипертиреозе, снижение ИТИ – о начальных стадиях гипотиреоза
Соотношение Т3/Т4	Состояния тиреотоксикоза, синдром эутиреоидной слабости (встречается часто у крыс и не связано с развитием патологии)
Соотношение гормонов ЛГ/ФСГ	Увеличение соотношения ЛГ/ФСГ больше, чем в 2,5 раза: развитие заболеваний яичников, нарушения гипоталамо-гипофизарной системы, синдром истощения яичников. Уменьшение соотношения: нарушение созревания яйцеклеток

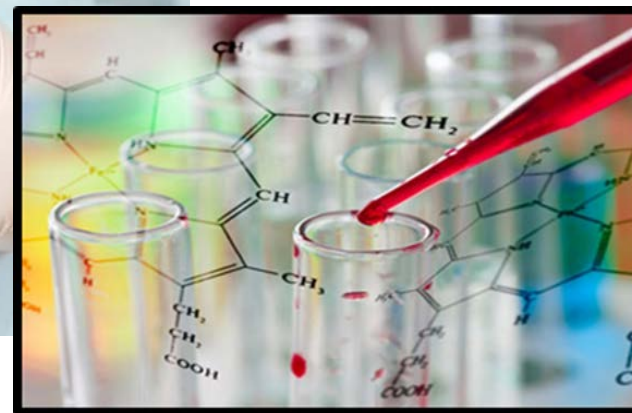
Заключение

- ✓ За последние годы предложено большое количество новых маркеров различных заболеваний как в клинической практике, так и для доклинических исследований.
- ✓ Большинство из них требуют приобретения специфичных ИФА наборов.
- ✓ Работы, связанные с выбором маркеров, обладающих прогностической ценностью, ведутся постоянно и представляют большой интерес, так как при минимизации численности животных возможно получение большего количества информации в ходе ДКИ.

Заключение

- ✓ Вопросы прогнозирования влияния экзогенных соединений на эндокринную систему становятся все более актуальными наравне с оценкой канцерогенных или генотоксических свойств.
- ✓ Международные регуляторные требования и методические подходы к тестированию безопасности химических веществ и лекарственных средств относительно эндокринной системы находятся на этапе формирования и развития.
- ✓ **Предлагается включить измерение уровней основных гормонов в биологических жидкостях в протоколы оценки общей и специфической токсичности как ранних индикаторов гормональных нарушений, возникающих еще до развития структурных изменений тканей и органов**
- ✓ При планировании таких исследований необходимо учитывать видовые особенности гормональной регуляции. Биологическое разнообразие животных моделей позволит увеличить прогностическую ценность получаемых результатов.

СПАСИБО ЗА ВНИМАНИЕ!



Литература

- ▶ La Merrill MA, Vandenberg LN, Smith MT, et al. Consensus on the key characteristics of endocrine-disrupting chemicals as a basis for hazard identification. *Nature Reviews Endocrinology*. 2020; 16(1): 45-57.
- ▶ Яглова НВ, Яглов ВВ. Эндокринные дизрапторы – новое направление исследований в эндокринологии. *Вестник Российской академии медицинских наук*. 2012;67(3):56–61.
- ▶ Муслимова ОВ, Евтеев ВА, Мазеркина ИА, Сокова ЕА, Прокофьев АБ, Шапченко АВ., Александрова ТВ Биомаркеры нефротоксичности: роль и значимость в диагностике лекарственного повреждения почек. *Безопасность и риск фармакотерапии*. 2021;9(4):173-184.
- ▶ Patisaul HB, Adewale HB. Long-term effects of environmental endocrine disruptors on reproductive physiology and behavior. *Front Behav Neurosci*. 2009;3:10. <https://doi.org/10.3389/neuro.08.010.2009>
- ▶ Andersen ME, Conolly RB, Faustman EM, Kavlock RJ, Portier CJ, Sheehan DM, et al. Quantitative mechanistically based dose-response modeling with endocrine-active compounds. *Environ Health Perspect*. 1999;107(Suppl 4):631–8.
- ▶ Sheehan DM. No-threshold dose–response curves for nongenotoxic chemicals: findings and applications for risk assessment. *Environ Res*. 2006;100(1):93–9. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.09.002>
- ▶ Andersen ME, Conolly RB, Faustman EM, Kavlock RJ, Portier CJ, Sheehan DM, et al. Quantitative mechanistically based dose-response modeling with endocrine-active compounds. *Environ Health Perspect*. 1999;107(Suppl 4):631–8. <https://doi.org/10.1289/ehp.99107s4631>
- ▶ Sheehan DM. No-threshold dose–response curves for nongenotoxic chemicals: findings and applications for risk assessment. *Environ Res*. 2006;100(1):93–9. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.09.002>
- ▶ Andersen ME, Conolly RB, Faustman EM, Kavlock RJ, Portier CJ, Sheehan DM, et al. Quantitative mechanistically based dose-response modeling with endocrine-active compounds. *Environ Health Perspect*. 1999;107(4):631–638.
- ▶ Sheehan DM. No-threshold dose–response curves for nongenotoxic chemicals: findings and applications for risk assessment. *Environ Res*. 2006;100(1): 93–99. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.09.002>