



Введення в експериментальну токсикологію.  
Експериментальне вивчення токсичної дії  
потенційних лікарських засобів. Види  
токсичності. Дослідження гострої  
токсичності. Спостереження за тваринами

*Навчально-науковий тренінговий центр медико-  
біологічних досліджень Навчально-наукового  
інституту прикладної фармації*



# Основні терміни та поняття

---

- **Випробування** - експеримент або серія експериментів з вивчення досліджуваної речовини з метою одержання даних про її властивості та/або безпечність для здоров'я людини.
- **Гостра токсичність** визначається як короткотривала шкідлива дія на організм досліджуваної речовини в умовах одноразового або багаторазового протягом 24 год її введення.
- **Доза** - кількість речовини, яка діє на організм. Доза виражається як маса (об'єм) досліджуваної речовини (г, мг, мл тощо) або маса (об'єм) досліджуваної речовини на одиницю маси тварини (напр., мг/кг, мл/кг).

# Основні терміни та поняття

---

- **Доза максимально переносима ( $DL^0$ )** - найбільша кількість отрути, введення якої в організм не викликає загибелі піддослідних тварин.
- **Доза середня ефективна ( $DE^{50}$ )** - кількість речовини, яка викликає певний ефект у 50 % стандартної групи піддослідних тварин протягом певного терміну спостереження.
- **Доза середня смертельна ( $DL^{50}$ )** - статистично розрахована доза речовини, введення якої викликає загибель 50 % стандартної групи піддослідних тварин протягом певного терміну спостереження. Величина  $DL_{50}$ , виражається відношенням маси (об'єму) досліджуваної речовини до одиниці маси тіла тварини (мі/кг, мл/кг та ін.).

# Основні терміни та поняття

---

- *На початкових етапах доклінічних досліджень (первинний токсико-фармакологічний скринінг) предметом вивчення є потенційна фармакологічна речовина (сума речовин, нове сполучення), яка не має визначеної лікарської форми.*

# Основні терміни та поняття

---

- **Токсикологічні дослідження** нової фармакологічної речовини, відібраної в результаті первинної токсико-фармакологічної оцінки біологічної дії, проводяться за схемою програмованого скринінгу з реєстрацією критеріїв гострої, підгострої та хронічної токсичності та використанням набору тестів, які дають змогу оцінити тип дії речовини.
- **Експериментальні дослідження** нової фармакологічної речовини проводяться у порівнянні з контрольною речовиною. Ефективність та безпечність є критерієм доцільності подальшого.
- Доклінічне токсикологічне вивчення нових лікарських форм повинно включати як контроль вихідну лікарську форму.

# Вивчення оригінальних речовин

---

- Перед початком випробувань потенційного лікарського засобу *необхідно* для кожної партії *мати відомості* щодо його походження, хімічного складу, основних характеристик:
- чистота;
- стабільність індивідуальної речовини та в суміші з носієм;
- склад;
- структура;
- фізико-хімічні властивості (агрегатний стан, розчинність, точка плавлення/кипіння, рН);
- методи визначення.

# Вивчення оригінальних речовин

---

- *Ємкості* для досліджуваної та контрольної речовин *повинні* обов'язково *забезпечуватися етикетками*, зробленими відповідно до СОП. На них вказується назва речовини або номер коду, номер партії, термін придатності та ін.
- *Токсикологічні дослідження обов'язкові* як для субстанції, так і лікарської форми.
- *Умови зберігання* повинні забезпечувати збереження складу, концентрації, чистоти та стабільності як досліджуваної, так і контрольної речовин.

# Вивчення оригінальних речовин

---

- На процедуру визначення їх ідентичності, чистоти, складу та стабільності, а також наявності контамінантів слід *розробити відповідні СОП.*
- При необхідності використання носія (розчинника) при проведенні випробувань розробляються *СОП щодо визначення його гомогенності та стабільності.*
- На *етикетці*, яка супроводжує ємкість з носієм (розчинником) досліджуваної та контрольної речовин, *вказується стабільність їх складу та гомогенність.*
- *Результати* вказаних досліджень реєструються в *спеціальному журналі.*



# Гостра токсичність

---

## *Принцип методу досліджень*

- При визначенні токсикологічних характеристик речовин (лікарських засобів) *визначення гострої токсичності, як правило, є першим етапом*, метою якого є одержання інформації щодо небезпечності досліджуваної речовини для здоров'я в умовах короткотривалої дії.

Ці дані можуть братись за основу для визначення класу токсичності і є першим кроком до встановлення режимів дозування при проведенні досліджень *нідгострої, хронічної, специфічної токсичності та інших випробувань*, а також надавати первинну інформацію про токсичну дію речовини або фармакологічного препарату.

# Гостра токсичність

---

- *Визначення параметрів гострої токсичності дозволяє отримати необхідну інформацію для вирішення наступних завдань:*
- встановлення рівня токсичності досліджуваної фармакологічної речовини та отримання даних щодо його токсикодинаміки;
- визначення співвідношення між дозою та негативними ефектами;
- визначення видової та статевої чутливості лабораторних тварин щодо дії досліджуваної речовини;

# Гостра токсичність

---

- встановлення параметрів токсичності для визначення доз при проведенні підгострих та хронічних експериментів та дослідження спеціальних видів токсичності;
- порівняльна оцінка токсичності досліджуваної речовини з найактивнішим з існуючих прототипів або аналогом, які використовуються в практичній медицині.

# Гостра токсичність

---

- Вирішення цих завдань вимагає визначення основних параметрів токсичності речовин, а саме: середньосмертельної дози та її стандартної помилки ( $DL^{50} \pm m$ ), максимально переносимо! дози ( $DL^0$ )
- Дослідження гострої токсичності потенційних лікарських засобів необхідно проводити при трьох шляхах введення, серед яких обов'язковим є рекомендований для клінічного використання.

Враховуючи можливість випадкових ситуацій, які спричиняють нещасні випадки, суїцидальні та кримінальні отруєння, доцільним є визначення гострої токсичності при *пероральному шляху введення*.

# Гостра токсичність

---

## *Експериментальні тварини*

- Гостра токсичність нових речовин вивчається *на трьох видах експериментальних тварин*: двох видах гризунів та одному негризунів.
- При дослідженні гострої токсичності необхідно, щоб кількість груп та тварин в кожній групі забезпечувала визначення вірогідності параметрів гострої токсичної дії та встановлення середньої смертельної дози.

# Гостра токсичність

---

- Для кожної дози повинно бути *не менше 6 тварин* кожної статі.

В окремих випадках допускається визначення гострої токсичності на тваринах однієї статі з наступною перевіркою чутливості щодо досліджуваної речовини тварин протилежної статі (використовується одна доза).

Отримання достатніх даних про токсичність досліджуваної речовини в залежності від статі в даному випадку свідчить про можливість обмеження досліджень з використанням тварин протилежної статі.

# Гостра токсичність

---

- Вибір доз може базуватись на результатах попередніх пошукових досліджень.
- *Кількість окремих дозових рівнів і проміжки між ними повинні забезпечувати можливість віднесення досліджуваної речовини за токсичністю до конкретного класу і бути достатніми для побудови кривої «доза - ефект» та визначення  $DL^{50}$ .*
- Рекомендується використовувати *5 рівнів доз.*

# Гостра токсичність

---

- За певних експериментальних умов будь-яка речовина, введена в досить великій кількості, здатна викликати токсичну дію. Тому *лімітуючим показником* при визначенні гострої токсичності є *максимальна доза четвертого класу токсичності* (малотоксичні речовини) з урахуванням шляху введення (табл. 8).

*Наприклад* для внутрішньошлункового введення ця доза складає 5 г/кг маси тіла. Якщо при цьому не спостерігається загибелі, введення більшої дози, як правило, є недоцільним. У разі, якщо має місце загибель тварин внаслідок дії досліджуваної речовини, необхідно проводити випробування у повному обсязі.



# Підготовка тварин

---

- Відібрані після карантину і попередньо індивідуально помічені тварини розподіляються на групи за методом випадкового вибору з використанням комп'ютерної програми або таблиці рандомних номерів.
- До введення досліджуваної речовини експериментальні тварини протягом не менше 5 днів мають пройти акліматизацію в умовах кімнати для проведення випробувань.

# Підготовка тварин

---

- *Перед оральним введенням досліджуваної речовини тварини повинні голодувати: щури - протягом ночі, миші - 3-4 год.*

Потому їх зважують і вводять досліджувану речовину.

Якщо за один раз неможливо ввести всю кількість речовини, необхідна доза може бути введена дрібно протягом періоду, що не перевищує 24 год.

Після перорального введення допуск до їжі надається не раніше, ніж через 3-4 год, що також необхідно враховувати за умов дрібного дозування при забезпеченні тварин їжею та водою в проміжках між введеннями.

# Спостереження за тваринами

---

## *Тривалість спостережень*

- *Тривалість спостережень* за станом тварини після одноразового (або багаторазового протягом 24 год) введення фармакологічної речовини *складає не менше 14 днів.*

Але цей період не є жорстко фіксованим, оскільки визначається токсичними реакціями, швидкістю їх настання та тривалістю періоду відновлення, і, отже, при необхідності може бути пролонгований.

- *Терміни виникнення та зникнення токсичних проявів, а також загибелі є важливими показниками, особливо за наявності відкладеної загибелі.*

# Спостереження за тваринами

---

## *Спостереження за клінічними проявами інтоксикації*

- Дослідження гострої токсичності зводиться не лише до визначення  $DL^{50}$ .
- Дуже важливою, особливо за відсутності загибелі тварин при вивченні малотоксичних речовин, є інформація, отримана на підставі реєстрації дозозалежного впливу на різні функції організму.
- Індивідуальна маса тіла тварин повинна визначатись незадовго до введення досліджуваної речовини, через 3, 7 діб після її введення та перед забоем (загибеллю); зміни маси тіла необхідно реєструвати, якщо термін виживання перевищує один день після введення речовини.

# Спостереження за тваринами

---

- Систематична *реєстрація показників стану* кожної тварини повинна здійснюватись *не рідше одного разу на день*.
- Ці *спостереження повинні включати* реєстрацію інтегральних показників (загальний стан, зміни положення тіла, стан шкіри, колір слизових оболонок, температура тіла) та окремих симптомів (міоз, сльозоточивість, салівація, діарея, зміни кольору сечі та фекалій, сонливість, тремор, судоми та ін.). Інтерпретацію результатів клінічних спостережень подано в табл.

# Спостереження за тваринами

---

- З метою мінімальної втрати тварин внаслідок канібалізму часто виникає необхідність огляду тварин частіше, ніж раз на день.
- Час загибелі тварин слід реєструвати якомога точніше.
- Тварин, знайдених мертвими, необхідно піддавати морфологічним дослідженням відразу або поміщати в холодильну камеру.
- Ослаблених або агонізуючих тварин слід ізолювати або забивати з використанням методів евтаназії.

# Методи визначення гострої токсичності

Методи визначення гострої токсичності можна розподілити *на дві категорії*.

- *До першої належать експрес-методи*, що використовуються з метою попередньої оцінки токсичності на стадії скринінгу, яка передує детальному вивченню нових лікарських засобів (субстанцій), при проведенні випробувань експертного характеру (напр., порівняльні випробування генеричних препаратів), а також в досліджах з використанням великих (свині, собаки) або дорогих (мави) тварин.
- Вони дають змогу визначити  $DL_{50}$  з використанням обмеженої кількості тварин, але ставлять високі вимоги до стандартизації тест-системи, оскільки індивідуальний стан та чутливість окремих тварин до досліджуваної речовини можуть суттєво впливати на результати дослідження.

# Методи визначення гострої токсичності

---

- *Найбільш універсальним* та таким, що дозволяє отримувати порівняно повну інформацію, незважаючи на ряд недоліків (напр. необхідність великої кількості тварин), *є метод пробіт-аналізу* з використанням математичних розрахунків або графічного способу згідно з Litchfield та Wilcoxon
- *Останній є графічно ілюстративним* і дає можливість значно ширшої інтерпретації одержаних результатів.



# Методи визначення гострої токсичності

---

*Дослідження гострої токсичності та встановлення DL50 дозволяє отримати відомості щодо:*

- класу токсичності фармакологічної речовини
- загальної інформації щодо токсикодинаміки та токсикокінетики;
- порівняльної характеристики параметрів токсичності фармакологічної речовини та прототипу (або аналога) шляхом співставлення їх DL50, зон токсичної дії, кривих залежності летальності від дози;

# Методи визначення гострої токсичності

---

- відносної токсичності речовини в залежності від шляху надходження до організму, видової та статевої чутливості
- дозозалежних ефектів
- характеру функціональних порушень та морфологічних змін;
- можливого механізму дії;
- умов подальшого визначення підгострої, хронічної токсичності (вид тварин, дози, терміни, шляхи введення, спосіб введення) та напрямки поглибленого вивчення.

# Токсичність при повторних введеннях (Підгостра, субхронічна та хронічна токсичність) Загальні положення

- Незважаючи на те, що за даними гострої токсичності досліджувана речовина може не проявити ознак токсичності, пролонговане її введення, навіть в низьких дозах, часто здатне привести до розвитку інтоксикації внаслідок накопичення в організмі, метаболічних змін, порушення гомеостазу.

Дослідження можливої небезпеки для здоров'я *повторних введень речовини*, що вивчається, проводиться на підставі первинної інформації, отриманої в гострому експерименті.

- *Дослідження підгострої токсичності* передбачає одержання даних щодо токсичної дії речовини внаслідок введення її до тест-системи протягом обмеженого часу.

# Токсичність при повторних введеннях (Підгостра, субхронічна та хронічна токсичність) Загальні положення

---

- *Метою субхронічних досліджень є визначення шкідливої дії повторних введень протягом певної частини тривалості життя експериментальних тварин.*
- *Належне планування субхронічного дослідження дає змогу одержувати цінну інформацію щодо кумулятивних властивостей речовини, впливу на органи та системи, а також переносимість даної речовини при невисоких (порівняно з гострою токсичністю) дозах за умов її введення протягом періоду, який не перевищує 10 % тривалості життя відповідного виду експериментальної тварини.*

# Токсичність при повторних введеннях (Підгостра, субхронічна та хронічна токсичність) Загальні положення

---

- Завдяки моніторингу різноманітних параметрів, включаючи гістопатологічний аналіз, *ці дослідження дозволяють виявити* різноманітні прояви шкідливої дії, а також визначити дози для вивчення хронічної токсичності, канцерогенності та впливу на репродуктивну функцію організму.
- Вважається, що дані субхронічної токсичності можуть бути достатніми для передбачення небезпечності тривалого введення окремих речовин в низьких дозах.

# Токсичність при повторних введеннях (Підгостра, субхронічна та хронічна токсичність) Загальні положення

---

*Необхідність вивчення хронічної токсичності визначається двома обставинами:*

- по-перше, дослідження токсичних ефектів внаслідок проведення тривалих випробувань;
- по-друге, виявлення рівнів доз, при яких не спостерігається токсична дія за даних умов експерименту.

**DANK U WEL**

**ДЗЯКУЮ**

**DAKUJEM**

**MERCI**

**ДІДІ МАДЛОБА**

**GRACIAS**

**ДЯКУЮ**

**THANK YOU**

**D KUJI**

**HVALA**

**GRAZIE**

**DANKE**

**DANKIE**

**DZIEKUJE BARDZO**