

Основы экспериментального моделирования биопроецессов

Плотников Евгений Владимирович, к.х.н.,

Доцент, Инженерная школа химических и био-медицинских технологий ТПУ

Истоки биомоделирования

- ▶ В своих трудах Гиппократ пишет: «Действительно, надгортанник есть крышка, не дающая прохода ничему, кроме питья. Вот доказательство: если кто окрасит воду в голубой цвет и даст ее выпить очень жаждущему животному, лучше свинье, ибо это животное не отличается разборчивостью, потом перережет ей горло, то он найдет надгортанник окрашенным питьем». Чем не прообраз биомоделирования в эксперименте?

Основные вехи

- ▶ Основоположник - ученый Клод Бернар (1813–1878), сформулировал основные понятия общей патологии и ввел в научный обиход эксперимент на животных;
- ▶ В России активное развитие экспериментальной патологии началось в XIX в. Учебные курсы профессоров: А.М. Шумлянский (1748–1795), М.М. Тереховский (1740–1790), В.В. Пашутина (1845–1901)
- ▶ С 20 века активное развитие. Работы И.П. Павлова и А.А. Богомольца.

Соотношение человека и животных, как прототипа и биомоделей

- ▶ Биомоделирование предполагает создание или использование организма по совокупности признаков или по изучаемому параметру наиболее близкого к прототипу (человек!).
- ▶ Получаемые на модели результаты позволяют по аналогии делать выводы – экстраполировать их на эффекты у прототипа.
- ▶ Пример: схожесть анатомических или физиологических параметров. (табл.)

Основные сравнительные физиологические показатели человека и крупных лабораторных животных

Показатель	Человек	Мини-свинья	Овца	Собака	Кошка
Масса тела, кг	70	37,3	95	12	3
Площадь поверхности тела, см ²	18 000	8 750	9 000	5 820	2 466
Температура тела, °C	37,2 (рект.) 36,6 (кожа)	39	38,5-40	38,5	38-39,5
Пульс (уд./мин)	60-70	112	70-80	70-130	110-140
Частота дыхательных движений	20	15-20	12-15	14-26	10-20
Продолжительность жизни, лет	75	15 и более	9-15	10-15	14-20
Масса внутренних органов в процентах от массы тела, %					
Головной мозг	1,9	0,24	0,11	1-2,7	0,7-1,1
Печень	2,14-2,43	1,79	0,66-1	3,0	3,11
Сердце	0,36-0,47	0,3-0,4	0,24-0,25	0,69-1,3	0,39
Почки	0,4-0,57	0,66	0,6-0,7	0,5-0,7	0,34
Легкие	0,53	0,56	0,43-0,47	1,1-1,66	0,62
Поджелудочная железа	0,1-0,17	0,11-0,15	0,1-0,18	0,13-0,35	0,15-0,28
Селезёнка	0,21-0,28	0,13	0,13-0,17	0,08-0,4	0,2

Основные сравнительные параметры крови человека и крупных лабораторных животных

Показатель	Человек	Мини-свинья	Овца	Собака	Кошка
Гемоглобин, г/дл	11,5-14,5 (ж) 13,2-16,4 (м)	1,6-16,8	10-15	11-18	12,9
Гематокрит, %	36-42 (ж) 40-48 (м)	43,1	32,4	50,4	35-40
Эритроциты, млн. в мм ³	3,7-4,7 (ж) 4-5,1 (м)	5-8	10,03	5,5-8	7,34
Лейкоциты, тыс. мм ³	4-8,8	15-20	8-10	8-18	15,1
Лимфоциты, %	19-37	18,7-61,7	47-70	13-32	23
Моноциты, %	3-11	0,3-4	1-5	0-0,3	2
Нейтрофилы, %	48-78	32-78,7	20-45	60-82	65-69
Эозинофилы, %	0,5-5	0,0-6,0	2-15	2-4	5-7
Базофилы, %	0-1	0-1,3	0-1	0-2	0-2
Билирубин, мг/дл	0,5-1,2	0,2-1,1	0,3-1,8	0-0,5	2-4
Глюкоза, мг/дл	60-100	80-110	18-57	60-87	39-61
Креатинин, мг/дл	0,5-1,5	0,5-1,37	0,7-1,8	0,3-1,0	0,5-1,1
Тромбоциты, тыс. мм ³	180-320	200-500	150-250	200-600	285-500

Экстраполяционные возможности биомоделирования

- ▶ Экстраполяция полученных результатов на человека — обязательный, сложный и неоднозначный этап любого экспериментального моделирования.
- ▶ Наиболее полно принципы экстраполяции разработаны в области оценки острой и хронической токсичности веществ для человека на моделях первого порядка лабораторных животных-млекопитающих.
- ▶ Используется либо прямой перенос данных с животных на человека, либо вводятся корректирующие коэффициенты.
- ▶ Лабораторные животные — это классические биологические модели, реакции которых на действие веществ во многом подобны эффектам этих же веществ у человека. На клетках экстраполяция гораздо сложнее и не всегда правомерны.

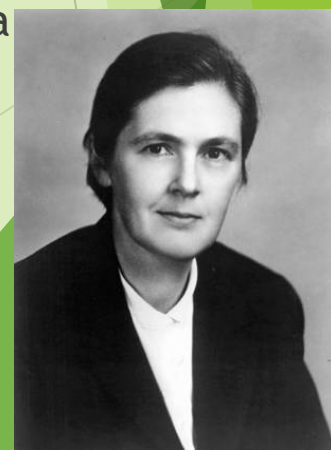
Исследование активности и безопасности ЛС

- ▶ В 1938 году, американская компания S.E. Massengill выпустила новую лекарственную форму сульфаниламида (СА) - сироп на основе диэтилен-гликоля со вкусом малины для детей. В то время не было жестких испытаний ЛС.
- ▶ Стали поступать сообщения о смертях пациентов. В итоге FDA удалось вернуть 885 из 908 л сиропа. Остальные 23л на момент расследования уже были употреблены и привели к смерти более 100 человек, в основном детей.
- ▶ По итогам, в 1938 году конгресс принял новый федеральный акт о еде, лекарствах и косметике. Он предоставил государству контроль над разработкой медикаментов и обезопасил нацию, что сыграло свою роль в ситуации с талидомидом.

Исследование активности и безопасности ЛС



- ▶ Талидомид — (компания ФРГ, Grünenthal) седативное снотворное лекарственное средство, получившее широкую известность из-за своей тератогенности, после того, как было установлено, что в период с 1956 по 1962 годы в ряде стран мира родилось по разным подсчётам от 8000 до 12 000 детей с врождёнными уродствами, обусловленными тем, что матери принимали препараты талидомида во время беременности.
- ▶ Повреждения плода, вызванные талидомидом, касаются самых разнообразных частей тела. Среди наиболее распространённых внешних проявления выделяются дефекты или отсутствие верхних или нижних конечностей, отсутствие ушных раковин, дефекты глаз и мимической мускулатуры. Дефекты конечностей - фокомелия и амелия («тюленья конечность» и «отсутствие конечности»), которые проявляются в виде некоего подобия тюленьих лап вместо конечности или практически полного их отсутствия.
- ▶ 8 сентября 1960 года в США Richardson-Merrell Company представила талидомид на рассмотрение Управления контроля качества продуктов и лекарств США. Однако доктор Фрэнсис О. Келси, назначенная FDA для контроля над лицензированием препарата, несмотря на серьёзное давление со стороны Richardson-Merrell, не одобрила препарат, и он не поступил на рынок США.



Новое применение

Талидомид (в настоящее время):

Мирин (талидомид) – является иммуномодулирующим препаратом, который обладает антиангиогенным и противовоспалительным действием. Препарат одобрен для лечения ряда заболеваний: стоматита, системной красной волчанки, проказы и различных злокачественных опухолей. В настоящее время Талидомид используется для борьбы с множественной миеломой (при неэффективности предыдущей терапии).

Особые указания:

Принимать препарат следует под наблюдением врача.

Ввиду того, что препарат обладает тератогенными свойствами, он категорически противопоказан беременным, кормящим женщинам, а также женщинам, планирующим беременность. Если пациентка обладает способностью к деторождению, то талидомид ей может быть назначен только при неэффективности иных способов лечения. Даже прием однократной дозы талидомида может спровоцировать аномалии плода.



Другие случаи опасных ЛС

- ▶ 1960 - 1967 гг. Англия, Новая Зеландия, Австралия - несколько тысяч детей с бронхиальной астмой погибли от использования аэрозоля изопротеренола. Препарат не был токсичным, но дозировка была слишком велика для детского организма.
- ▶ 1962 г. Европа и США - препарат MER-29 (средство для понижения холестерина в крови) вызывало катаракту (помутнение хрусталика глаза). Лекарство быстро удалили с рынка.
- ▶ 1971 - 1986 гг. США - был разработан препарат диэтилстильбэстрол (ДЭС), который, как считалось, помогал вынашивать детей. Вскоре стали рождаться девочки (точное число неизвестно, свыше 380 случаев только в Бостоне), у которых обнаружилась редкая разновидность рака влагалища. Препарат сняли с производства лишь в 1998 году.
- ▶ 1980-е гг. США - поступил на рынок препарат флекаинид, разработанный для лечения ишемической болезни сердца. В 1989 году начали исследовать эффект, и выяснилось, что люди, которым его назначали, умирают чаще, чем те, кого не лечили вовсе. К тому времени флекаинид контролировал 20% рынка антиаритмических средств.

Другие случаи опасных ЛС

- ▶ Сахароснижающие препараты: троглитазон. Новое оральное антигипергликемическое лекарство, рекомендованное для продажи в США в 1997 г. В 1999 г. срочно изъят из обращения в США из-за токсического действия на печень, которое проявилось печеночной недостаточностью и смертью у нескольких пациентов и повышением уровня печеночных ферментов у остальных.
- ▶ «Коксибовый кризис» - Коксибы – группа лекарств, разработанная для борьбы с болью и воспалением с минимальным побочным действием на ЖКТ. Однако выяснилось, что некоторые из них существенно повышают риск развития инфаркта. 2004 г. Был отозван с мирового рынка заменитель аспирина Виокс (международное название - рофекоксиб), который назначается при остеоартрите, различных болях. Выяснились страшные факты – постоянное использование такого коксиба, как рофекоксиб, увеличивает риск инфаркта. Риски вырастают на 37 %.
- ▶ Исследования продолжаются до сих пор.

Этические правила. Эксперименты на людях.

- ▶ В 1929 году минздрав США провело массовые тесты на сифилис среди чернокожего населения в 6 южных округах. В одном из них врачи обнаружили эпидемию: из 3'600 проверенных у 40% тест дал положительный результат.
- ▶ С 1932 по 1972 год в городе Таскиги исследование проводилось под эгидой Службы общественного здравоохранения США и имело целью исследовать все стадии заболевания сифилисом на 600 из числа бедного афроамериканского населения
- ▶ Для исследования методов лечения и стадий течения заболевания были сформированы 2 группы людей: одна — из больных сифилисом и вторая — контрольная группа, состоявшая из здоровых людей. В первой группе было 399 человек, а во второй — 201.
- ▶ И хотя в 1940 годы появился пенициллин, экспериментальные группы не лечили новыми препаратами...
- ▶ К моменту прекращения эксперимента, в живых из 399 людей, на которых проводились исследования, осталось лишь 74. 28 умерли от сифилиса, 100 — от осложнений, вызванных им, остальные по другим причинам.
- ▶ Результаты этого исследования, а также других экспериментов над людьми в США, привели к созданию Национальной комиссии по защите прав субъектов биомедицинских и поведенческих исследований и принятию Закона о национальных исследованиях.

Фармакология как основной потребитель биомоделей

Эффективность и безопасность ЛС оценивается на

1. Дорегистрационном этапе

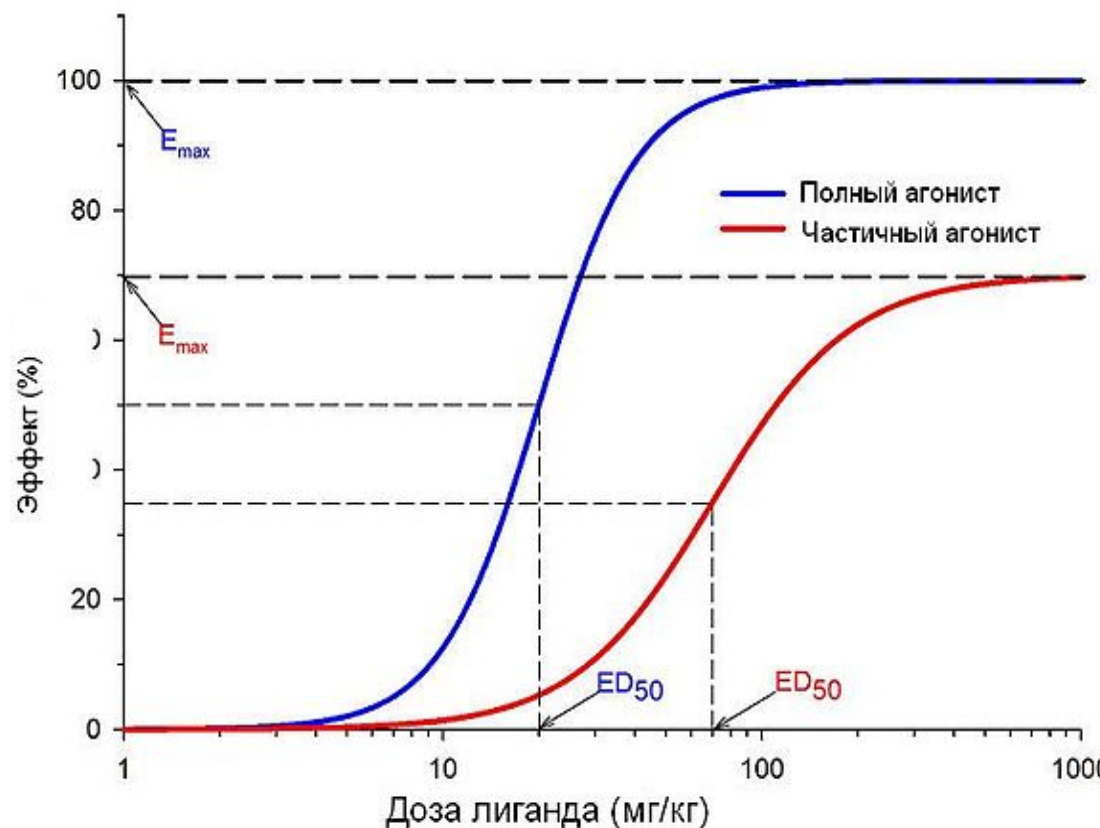
доклинические и клинические исследования

2. Пострегистрационном этапе

клинические (разные виды) исследования

Требования к современным БАС

- ▶ Высокая активность (доза-эффект)
- ▶ Избирательность действия
- ▶ Продолжительность эффекта (особенности метаболизма)
- ▶ Низкая токсичность (трагедия талидомида)
- ▶ Отсутствие побочных эффектов
- ▶ Стабильность при хранении
(подбор Лекарственной Формы)



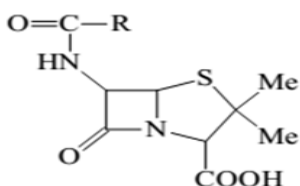
Сложности поиска новых БАС – длительный скрининг

- ▶ Пауль Эрлих. Поиск противосифилитических средств. Подошел только вариант 606 на основе мышьяка – сальварсан, «спасительный мышьяк».
- ▶ Стюарт Адамс и Джон Николсон (исследовательский отдел компании Boots Pure Drug Company Ltd.). Искали альтернативу аспирину. Перебрали более 200 вариантов салицилатов за 10 лет. В итоге - Открытие Ибупрофена 1962 год.
- ▶ Китайский фармаколог Ту Юю (Институт традиционной медицины) в 1960-е годы занималась поиском рецептов и созданием препаратов от малярии (тяжелый паразитоз с высокой смертностью до сих пор). Перебрали более 2000 трав и рецептов. Долго подбирали способы выделения субстанции и, наконец, - препарат от малярии – Артемизинин.

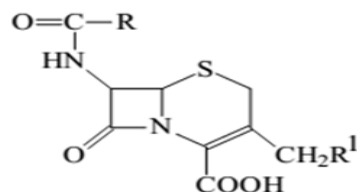
Принципы поиска и разработки новых БАС

1. **Скрининг** (проверка множества различных химических соединений на проявление желаемых свойств)
 - ▶ ежегодно синтезируется около 400 тысяч новых веществ, всего более 20 млн.).
 - ▶ Сальварсан (также известен как «препарат 606», лекарство от сифилиса, создан П. Эрлихом после неудачного тестирования 605 соединений)
 - ▶ по статистике, скрининг позволяет из 25 тысяч синтезированных соединений выбрать одно, обладающее нужной активностью.
2. *Копирование известных биологически активных веществ (например, химический синтез природных антибиотиков)*
3. *Модифицирования структуры (улучшение известного)*

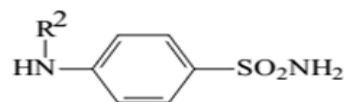
модификация структуры вещества по варьируемым радикалам R, в итоге новые препараты с улучшенными свойствами. Например:



пенициллины
(оксациллин,
ампициллин,
ампиокс)



цефалоспорины
(цефазолин(кефзол),
цефотаксим,
цефалексин)



сульфаниламиды
(фуросемид, клопамид,
ксипамид, буфенокс)

Принципы поиска и разработки новых БАС

4. **Введения фармакофорной группы** известного лекарственного вещества в молекулу нового вещества. Фармакофорным называют структурный элемент или фрагмент молекулы, который обеспечивает фармакологическую активность, например, на основе азотистого иприта получено семейство противораковых препаратов путем введения в различные вещества N,N-дихлордиэтиламинного или азиридинового фрагмента (например, сарколизин и др.).
5. **Создание комбинированных препаратов** (комбинации двух и более соединений с дополняющей активностью). Например, бисептол (бактрим), где комбинация триметоприма и сульфаметоксазола, - характеризуется синергизмом (усилением действия) при их сочетании. В итоге – снижение доз и токсичности.
6. **Поиск антиметаболитов** (известная мишень и подбор антиметаболита). Например, сульфаниламиды являются структурными геометрическими аналогами пара-аминобензойной кислоты и нарушают синтез фолиевой кислоты, т.к. фермент, ответственный за синтез последней, использует вместо аминбензойной кислоты, ее неактивный аналог - сульфаниламид. Это приводит к прекращению роста бактериальных клеток, вследствие прекращения фолиевозависимый синтез ДНК и РНК.
7. **Поиск новых мишеней** (главная задача – найти новый участок воздействия в организме, приводящий к биологическому эффекту (ответу). Есть новая мишень – запускается цикл подбора веществ кандидатов.

Принципы поиска и разработки новых БАС

9. Компьютерное моделирование - *In silico*

- ▶ компьютерный скрининг - HTS-метод (High Through-put Screening),
- ▶ установление структуры рецептора и подбор лиганда,
- ▶ моделирование структурной активности с помощью специальных программ типа QSAR (Quantitative Structure Activity Relationship),
- ▶ моделирование активной молекулы в трехмерном пространстве с помощью программ типа CAD (Computer Assisted Design).
- ▶ оценка свойств «подобия лекарству»;
- ▶ моделирование связывания лиганд-мишень.



Стадии создания ЛС



Фармакологический цикл

Кандидаты ЛС, полученные в результате скрининга, подвергаются модификации с целью удовлетворить разнообразным требованиям, налагаемым на реальное лекарственное вещество. Работают самые разные специалисты: молекулярные биологи, фармакологи, специалисты по компьютерному моделированию и медицинские химики. Каждым оборотом такого «фармакологического цикла» прототип приближается к предшественнику лекарства, который дальше тестируется непосредственно на животных (доклинические испытания)



Стадии создания ЛС

Доклинические испытания.

Задача - доказать параметры безопасности и терапевтической эффективности препарата, а также возможности проведения контроля качества в условиях конкретного производства.

1 этап

- ▶ Аналитическое изучение активной субстанции.
- ▶ Подача заявления на получение патента.

2 этап

- ▶ Углубленное изучение механизма действия (основное действие, нежелательные реакции, длительность действия).
- ▶ Фармакокинетика (всасывание, распределение, метаболизм, выведение).

3 этап

- ▶ определение острой, хронической и специфической (мутагенность, канцерогенность и т.д.) токсичности;
- ▶ оценка способности вызывать лекарственную зависимость.

4 этап

- ▶ Синтез в условиях производства.
- ▶ Разработка аналитических методов контроля.
- ▶ Исследование стабильности.
- ▶ Производство лекарственных форм для клинических исследований.

Стадии создания ЛС

Клинические испытания

- ▶ I фаза (изучают действие лекарственного средства в различных дозах у здоровых добровольцев (5— 10 человек), чтобы оценить переносимость препарата; определяют параметры фармакокинетики при однократном и повторном приеме, взаимодействие с пищей)
- ▶ II фаза (Эффективность и безопасность лекарственного средства в сравнительном плане (плацебо, эталонное средство) изучают у ограниченного контингента пациентов (100 — 200) с заболеванием, для лечения которого препарат предназначен; определяют диапазон его терапевтических доз)
- ▶ III фаза (Сравнительное исследование лекарственного средства в установленных терапевтических дозах и конкретных лекарственных формах проводят у большого числа больных разного возраста, пола). На основании результатов этой фазы испытаний принимают решение о регистрации препарата.
- ▶ IV фаза (Фаза начинается еще в ходе регистрации лекарственного средства и продолжается после его появления на рынке. Ее задачи: решение дополнительных вопросов по применению препарата, расширение показаний к его назначению, приобретение врачами опыта его использования, позиционирование препарата на фармацевтическом рынке).

Требования к учреждениям для работы с биомоделями:

- 1) Наличия вивария (экспериментально-биологической клиники), оборудованного в соответствии с санитарными требованиями
- 2) Наличия экспериментальной операционной (лаборатории) с соответствующим оборудованием;
- 3) Наличия штата **сотрудников**, обеспечивающих уход за животными.

Условия содержания животного в виварии (клинике) должны обеспечивать для него нормальный биологический фон и соответствовать требованиям СНИП.

Выполнение опытов:

- ▶ Все процедуры на животном, которые могут вызвать у него боль или иного рода мучительное состояние, проводятся при достаточном обезболивании (под местной анестезией или под наркозом), кроме особо оговоренных случаев.
- ▶ Запрещается использование животного для болезненных процедур более чем один раз, кроме животных, используемых для контрольных экспериментов в хронической серии.
- ▶ При проведении экспериментов и других процедур в условиях повышенного риска для жизни животных или при выполнении работ на животных малоопытными лицами (например, студентами) строго обязательно присутствие лица, ответственного за исполнение процедуры, контролирующего адекватность обезбоживания и состояние животного.

- ▶ В послеоперационном периоде животное должно получать квалифицированный уход и адекватное обезболивание.
- ▶ По завершении учебных или научных манипуляций на животном, приводящих к нарушению его физиологических функций и жизнеспособности, животное должно быть своевременно умерщвлено с соблюдением всех требований гуманности.
- ▶ Гуманное умерщвление животного, производится ответственным лицом или под его непосредственным наблюдением.
- ▶ Оптимальным и универсальным методом умерщвления животных является передозировка наркоза - введение анестетика в летальной дозе (дозировка для наркоза $\times 3$).

ПЕРСПЕКТИВЫ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ЖИВОТНЫХ В ЛАБОРАТОРНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ

1. отношение к животным как морально значимым существам
2. защита животных на законодательном уровне
3. использование концепции «трех R» Рассела -Берча