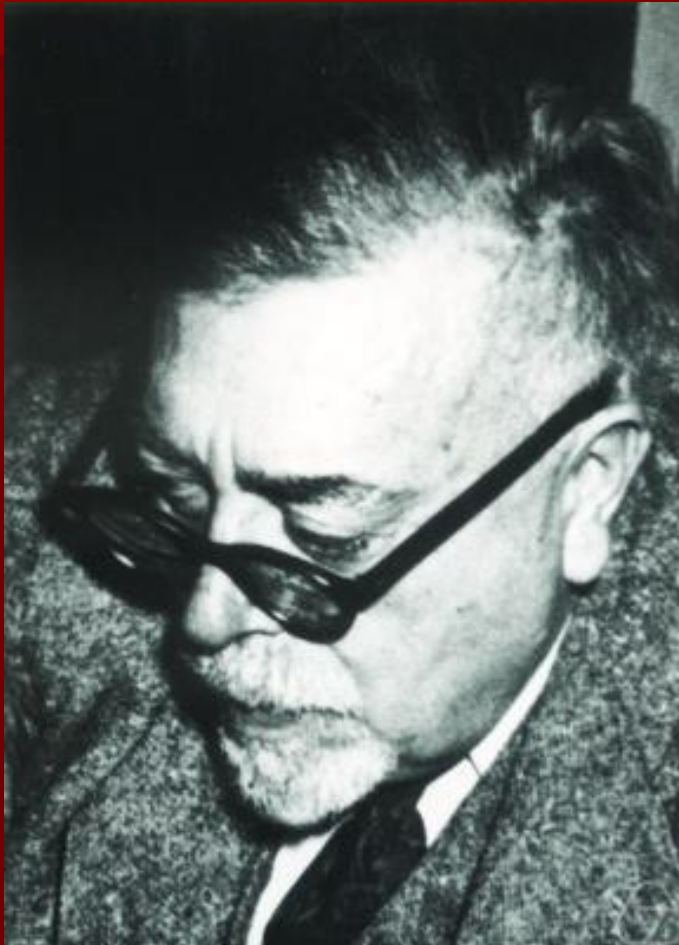




Биомоделирование в интересах фармакологических исследований

**Научный руководитель Научного центра
биомедицинских технологий ФМБА
России, академик РАН,
член-корреспондент РАМН
Н.Н.КАРКИЩЕНКО**

Истоки биомоделирования



■ 1946 г

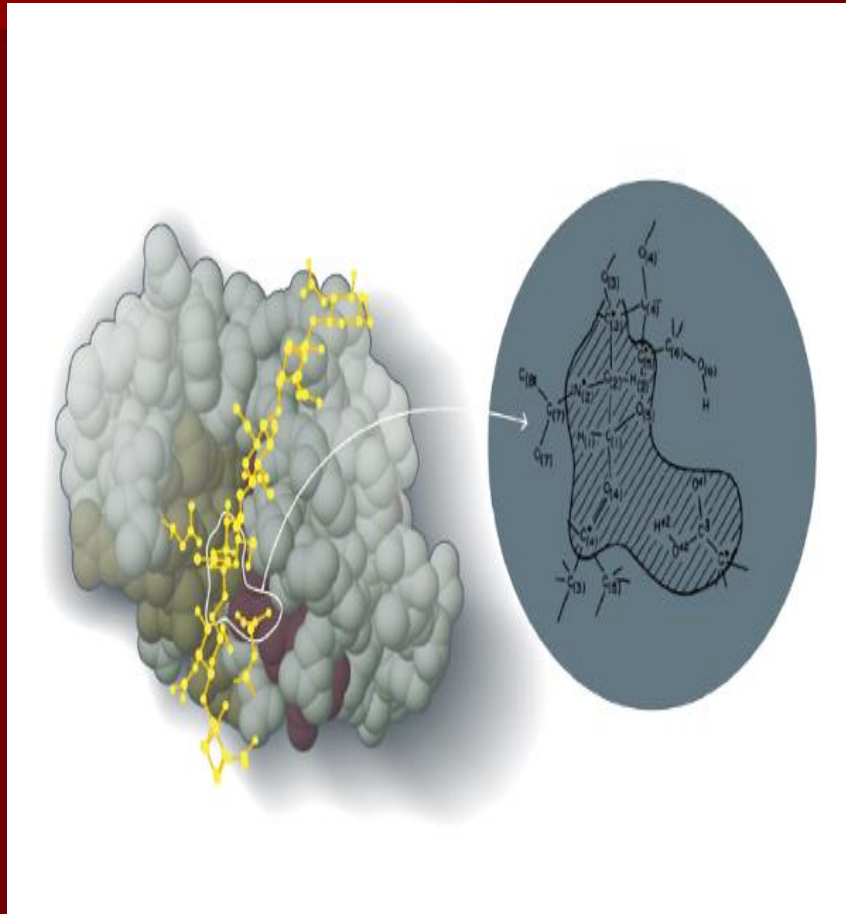
Норберт Винер, будущий родоначальник кибернетики, во время работы в кардиологическом институте Мехико совместно с кардиологом Роземблютом разработал модель фибрилляций миокарда



Моделирование - мощный инструмент анализа и базовый метод биомедицины

- Модели первого порядка – лабораторные животные
- Модели второго порядка - альтернативные модели (различные гидробионты, бактерии, ферменты, культуры клеток и др.)
- Модели третьего порядка - математические модели, описывающие биологические процессы
- Модели четвертого и более высоких порядков – используют для описания взаимодействия неспаренных электронов, квантово-химических, микроволновых процессов, синглетных и триплетных отношений и т.п.

Нобелевская премия 2013 года по химии



Мартин Карплус,
Майкл Левитт и
Арье Варшел
получили премию
за разработку
«многошкальных
моделей
комплексных
химических систем»

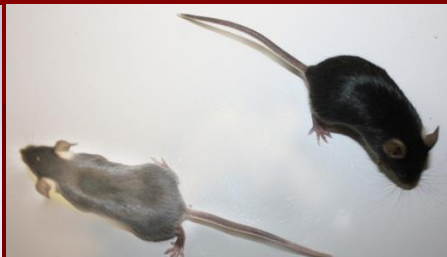


Место биомоделей в фармакологии

Иерархии биомоделирования	Детерминанты биомоделирования	Задачи, цели, функции биомоделей
Квантово-атомарные процессы	Нанобиотехнологии, элементарные частицы, ионы	Донорно-акцепторные отношения атомов, фрагментов молекул
Молекулярный (ДНК и РНК, аминокислоты, белки)	Пурины, пиримидины, аминокислоты, металлохелаты	Синтез ДНК, РНК, пептидных связей, ферментов, энергоперенос
Клеточный, органный	Клетки, ткани, органы	Создание и хранение кода клетки и белков, тканевых структур, перераспределение энергии
Структуры организм, системы анализа и адаптивного поведения	Физиологические системы, внутренняя среда, взаимоотношения с внешней средой	Адаптация к природным экологическим системам, отражение явлений
Целостный организм	Системы сенсорики и перцепции	Анализ и синтез обобщенных признаков в модели образов
Человеческая популяция	Разум, мышление, сознание; коллективное сознание	Обитание в техногенных экосистемах и социальной сфере



Классические и новые животные-модели



кролик
шиншилла

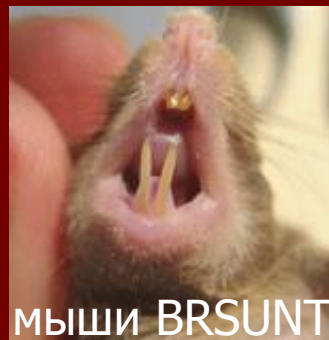


macaca mulata

мыши C57BL/KsJYLeprdb/+ и C57BL/Ks-
Leprdb+/+m



мыши B10.GFP



мыши BRSUNT



МИНИ-СВИНЬИ SG/Y-03



мыши A/SnY



Хомяки
тетрагибриды



Собака Бигль



Романовские овцы⁶



крысы CD1



Улучшение качества лабораторных ЖИВОТНЫХ

Для качественных фармакологических исследований на принципах GLP особое значение имеет очистка лабораторных животных гнотобиотическими методами, получение SPF-статуса и содержание их в вентилируемых клетках и изоляторах

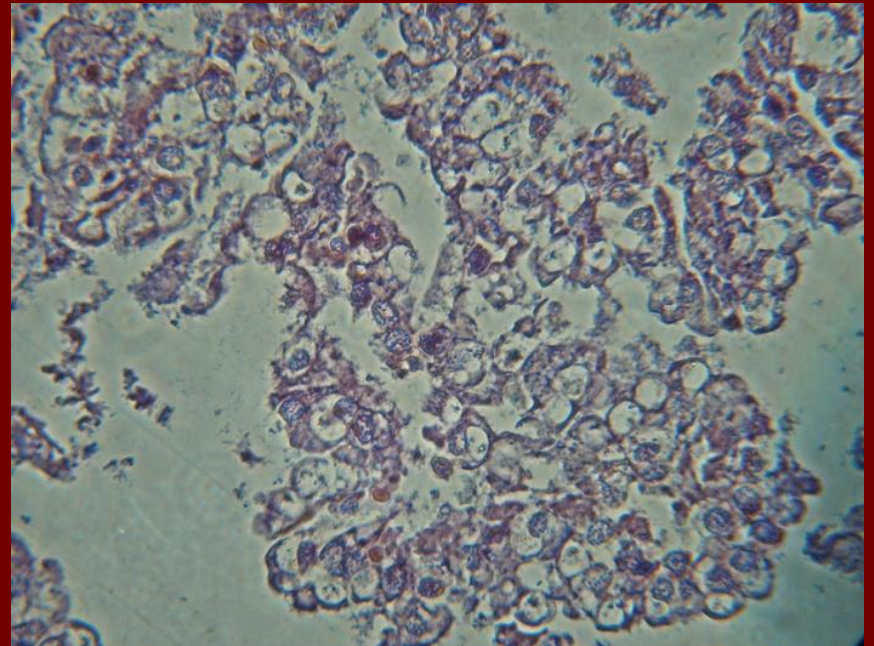




Перспективы перехода от животных-моделей к «МОДЕЛЯМ ЖИВОТНЫХ»

- **Переход от выбора животных для эксперимента к созданию специализированных линий под задачи конкретного фармакологического исследования.**
- **Планирование эксперимента начинается с постановки задачи для специалиста-генетика по получению генно-модифицированных животных под будущие фармакологические исследования.**
- **Нельзя просто «взять животное», а следует выбрать между все возрастающим числом хорошо описанных видов животных, инбредных, трансгенных, нокаутных и иных генно-модифицированных линий.**

Альтернативные биомодели

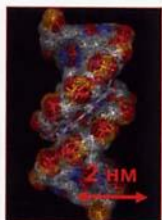


Альтернативные биомодели

- Рыбы – поджелудочная железа содержит повреждаемые аллоксаном инсулин-продуцирующие β -клетки, что позволяет использовать их как модель сахарного диабета
- Ракообразные – гепатопанкреас может быть использован при моделировании гепатитов, гепатопанкреатитов, панкреатитов
- Культура клеток миокарда – модель регенерации после инфаркта миокарда



НАНОТЕХНОЛОГИЯ – научно-технологическая революция начала XXI века



Нанометр = 10^{-9} м – одна миллиардная доля метра

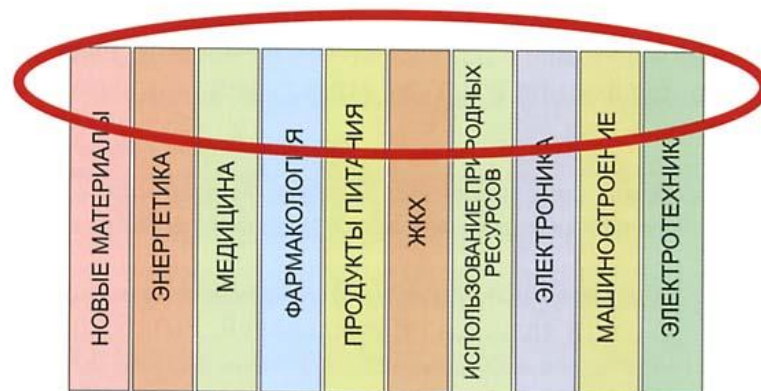
Изменение парадигмы научного развития
анализ → синтез

Основная цель:
целенаправленный синтез «снизу – вверх»
различных материалов и систем
на атомно-молекулярном уровне

Создание технологии
и оборудования
атомно-молекулярного
конструирования

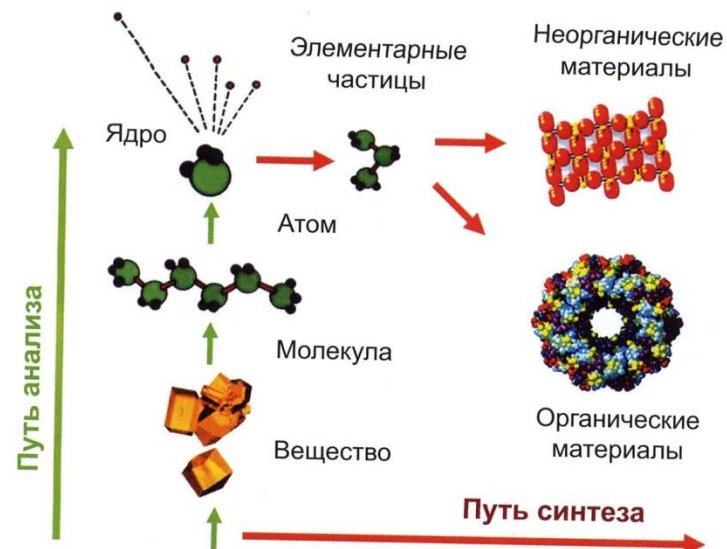
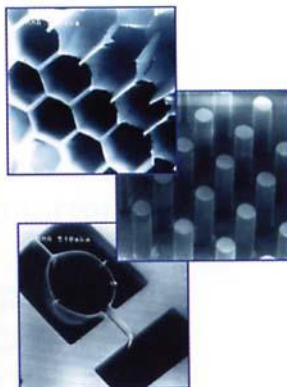
Создание методов
диагностики с атомарным
разрешением

НАНОТЕХНОЛОГИИ



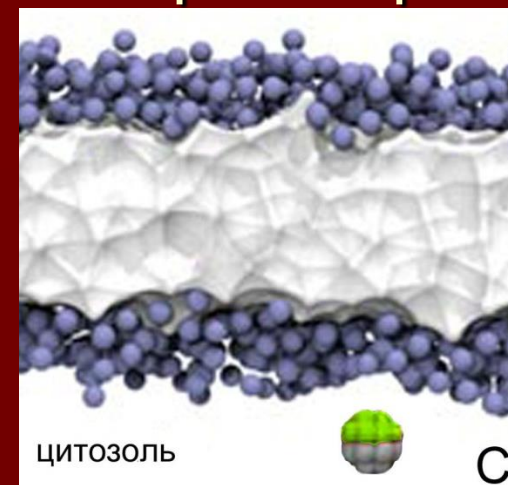
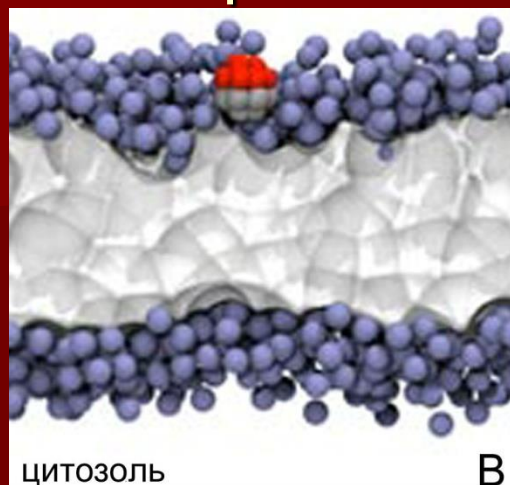
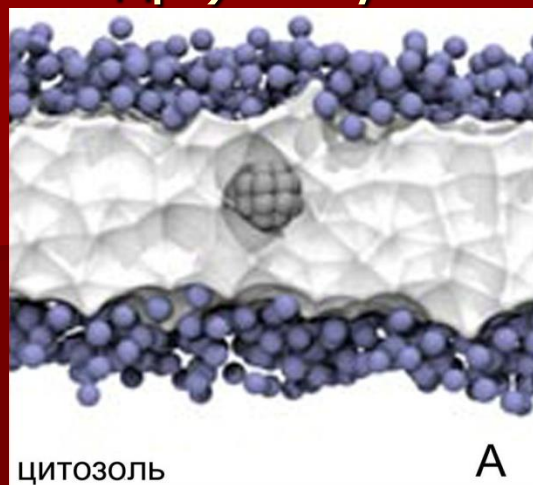
РОССИЙСКИЙ НАУЧНЫЙ ЦЕНТР «КУРЧАТОВСКИЙ ИНСТИТУТ»
Курчатовский центр синхротронного излучения
и нанотехнологий

СТАНЦИЯ ГЛУБОКОЙ РЕНТГЕНОВСКОЙ ЛИТОГРАФИИ «ЛИГА»



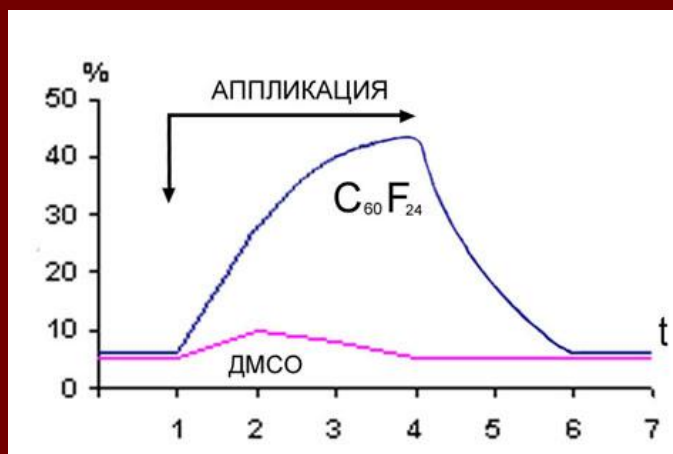


Наночастицы (углеродные, кремниевые, металлические и др.) могут обеспечить направленный транспорт лекарств



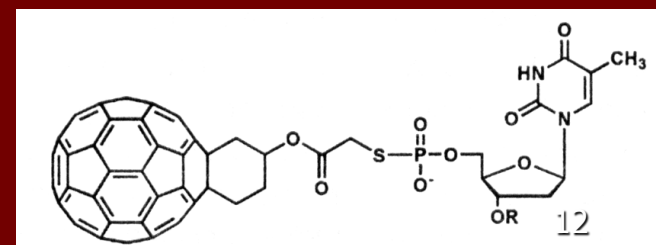
Фуллерен C_{60} «застревает» в гидрофобном участке (A), $C_{60}(OH)_{20}$ остается в гидрослое мембраны (B), а $C_{60}(OH)_{10}$ проникает в цитозоль (C).

Схема представлена на основе Оксфордской компьютерной модели



Взаимодействие фулеренила $C_{60}F_{24}$ с аденозиновым рецептором A3 системы GPCR. Аппликация $C_{60}F_{24}$ (верхняя кривая) производилась в ДМСО (нижняя кривая, контроль). Это характерно и для более сложных молекул.

Данные НЦБМТ

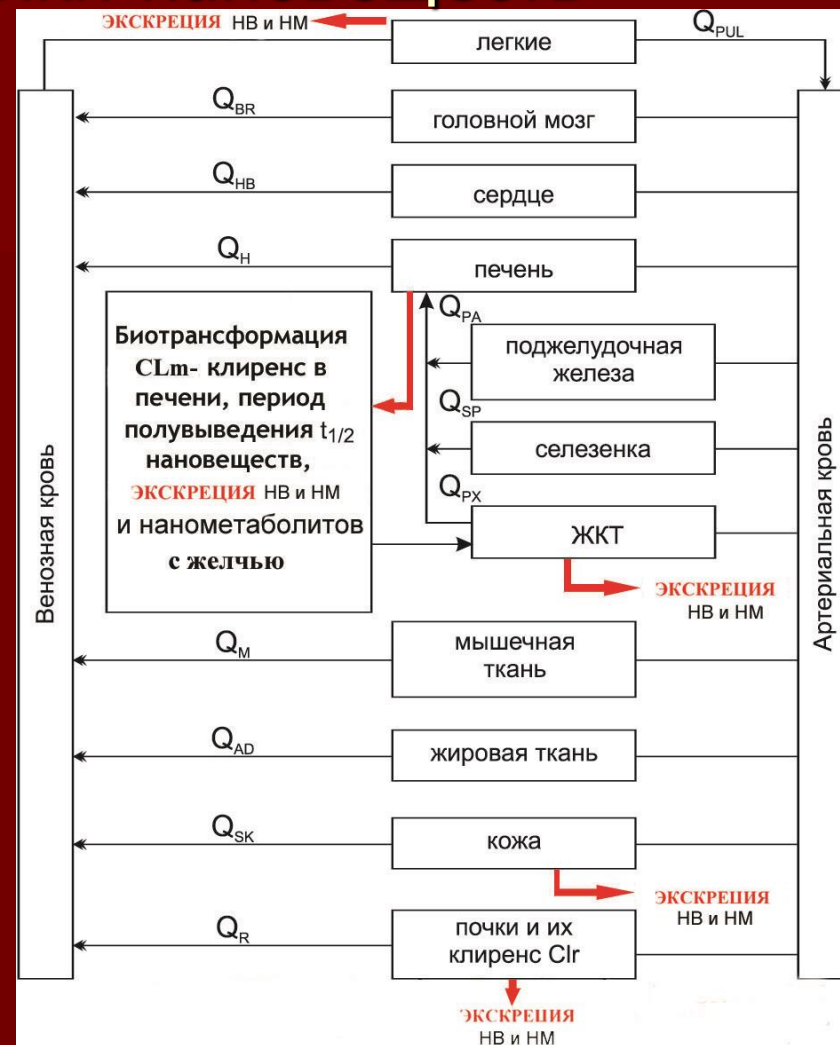
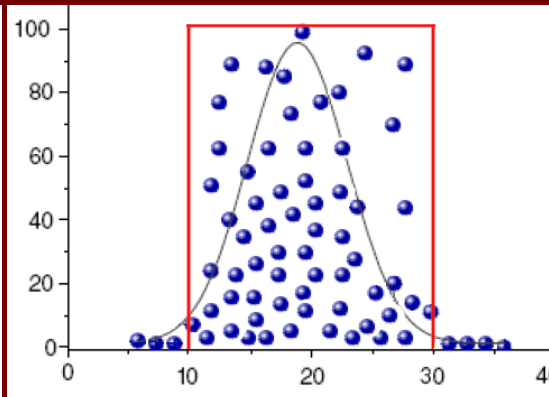
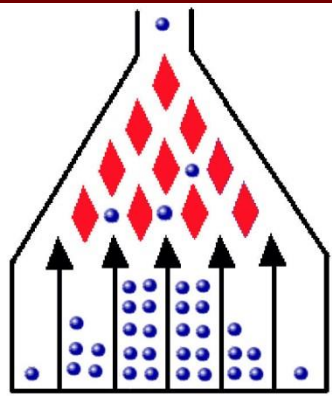




Модели фармакокинетики нановеществ

В отличие от «больших» веществ у наночастиц иной химизм, т.к. отсутствуют реакции замещения. Фуллеренилы всасываются, транспортируются и выводятся одновременно несколькими путями.

Необходимы новые математические нанофармакокинетические модели, например построение модели методом Байеса или Монте-Карло осуществляется по формуле $S = S_n(K/N)$, где K – число экспериментальных точек под графиком функции



Существующие двух-, трехкомpartmentные математические модели фармакокинетики недостаточны для описания фармакокинетики нановеществ. Требуются модели более высокого порядка.



Трансмембранные белки GPCR (G-protein couple receptors) как модели в системе транспорта лекарств



GPCR осуществляют блокировку сообщения в клетку, пока нановещества (фуллерены) или сигнальные молекулы (гормон, нейромедиатор, лекарство и т.д.) не обволакиваются активной зоной и образуют сайт



Лиганд-рецепторное обволакивание нановеществ (фуллеренов) может обеспечивать активацию молекул G-протеина, которая переключает серию внутримолекулярных взаимодействий и изменяет поведение клетки через серпантинные белки

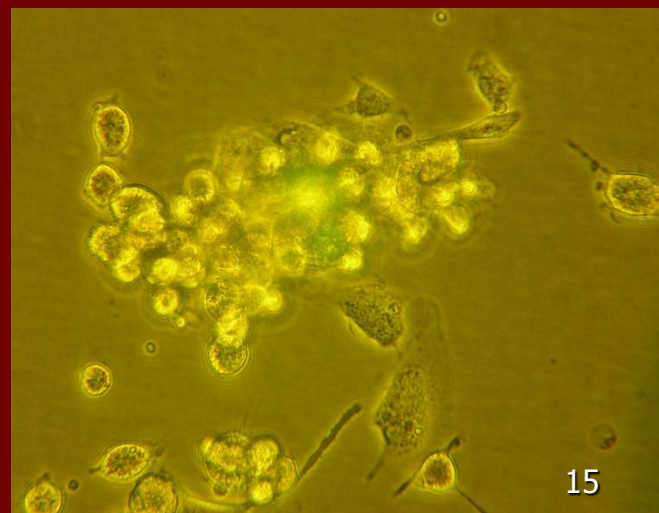
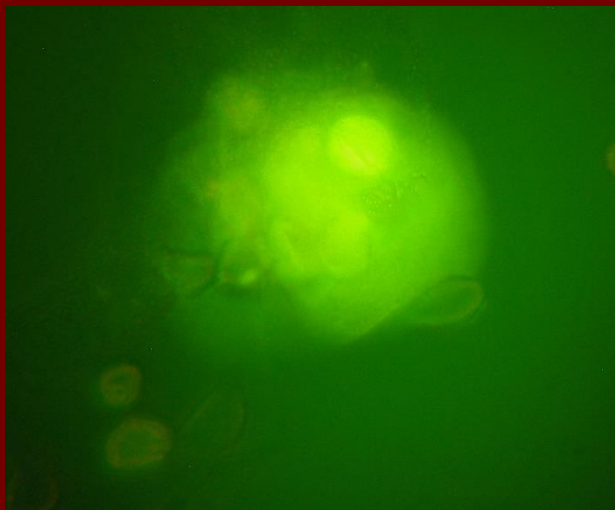
Препараты	Показания
Albuterol	Бронхо-легочные заболевания
Cetirizine	Спастические симптомы
Famotidine	Язвенная болезнь
Fentanyl	Нейролептаналгезия
Fexofenadine	Антиаллергическое средство
Methyluracil	Регенерация и лейкопоз
Metoprolol	Гипертоническая болезнь
Montelukast	Воспаления бронхо-легочной системы
Olanzapine	Антипсихотическое средство
Oxycodone	Обезболивающее средство
Parokcetin	Антидепрессант
Pomethazine	Антигистаминный препарат
Pseudoephedrine	Кровоостанавливающее средство
Ranitidine	Гиперацидный гастрит, язвы ЖКТ
Salmeterol	Антиастматическое средство
Sumatriptan	Лечение мигрени
Tamsulosin	Простатит и опухоли простаты
Uteplex	Противоязвенное средство

**Более 60% используемых в
медицине лекарственных средств
осуществляют свое действие через
GPCR-рецепторы**



Создание новых генно-модифицированных линий животных-моделей в НЦБМТ

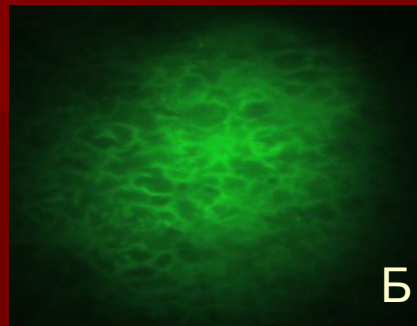
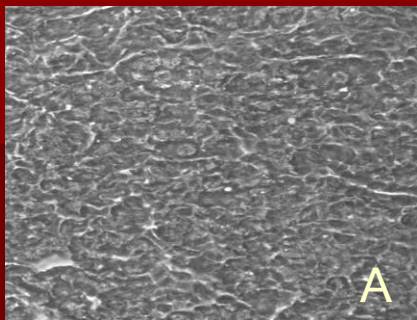
- Выполнены научно-исследовательские работы по формированию племенного ядра создаваемой в Центре линии мышей Ks-Lep⁺/+ с введением гена анализатора «мисти».
- Проводится работа по переводу гена зеленого белка на генотипы мышей линий C57BL/6, IOR/Hab, мышам аутбредной популяции ICR, крысам и мини-свиньям.
- Получено 23 поколения мышей B10.GFP и 11 поколений мышей B10C^{Walb}.GFP с геном зеленого белка, осуществляется перевод гена зеленого белка на мышей линий IOR/Hab, BL/6 и GCR.



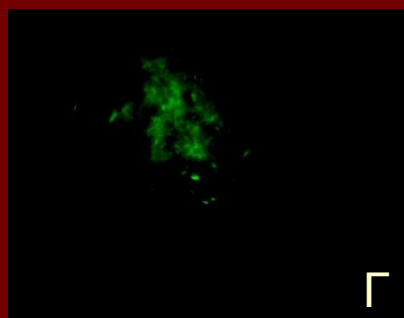


Биомоделирование на основе клеток, несущих ген зеленого белка

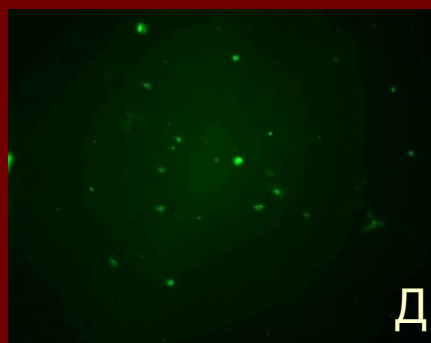
Распределение донорских ККМ (мыши B.10GFP) в органах через 60 суток после внутрибрюшинного введения их реципиентам C57BL/KsJYLeprdb/+



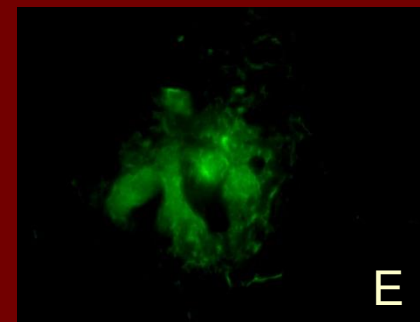
поджелудочная железа донора B.10.GFP (А, Б) и реципиента (В)



поджелудочная железа (ККМ)



селезенка (ККМ)

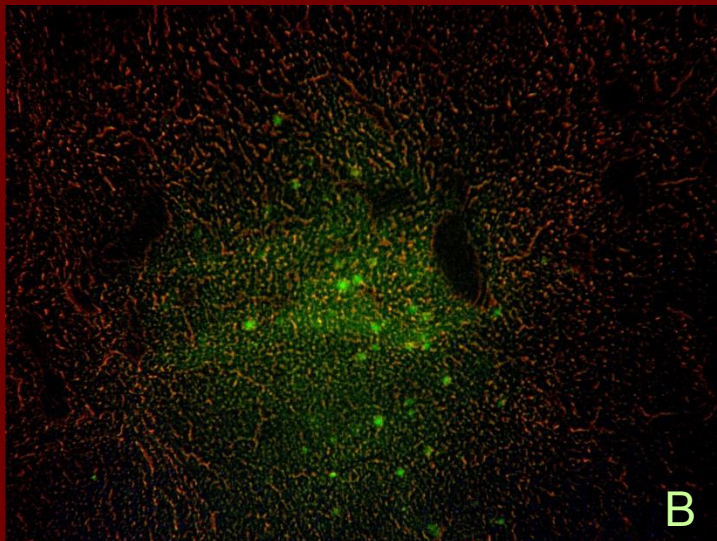
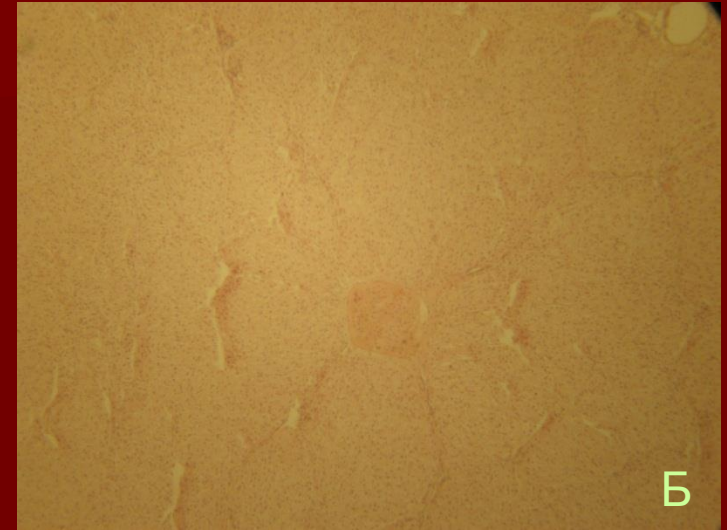
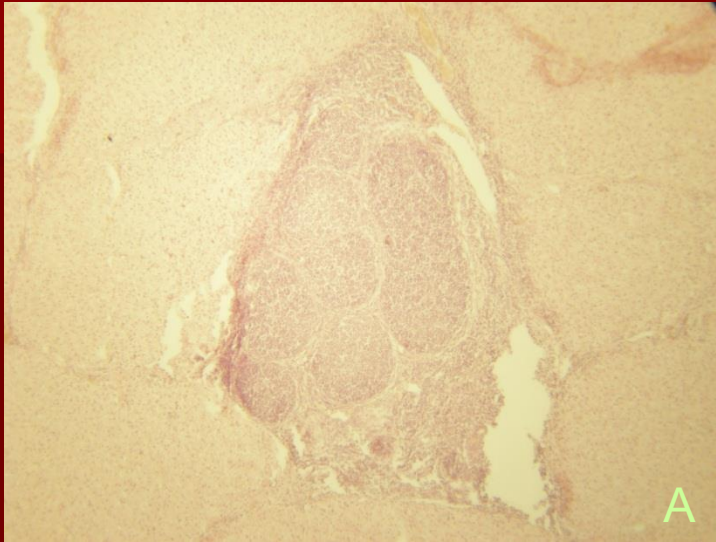


почка (ККМ)

- А - поджелудочная железа донора B.10GFP (с геном зеленого белка); фазово-контрастная микроскопия;
Б - поджелудочная железа донора B.10GFP; люминесцентная микроскопия;
В - поджелудочная железа реципиента db/db с СД 2 типа без введения ККМ;
Г - поджелудочная железа реципиента после введения ККМ;
Д - селезенка после введения ККМ; Е - почка после введения ККМ;



Моделирование токсико-аллергического гепатита и его коррекция стволовыми клетками на мини-свиньях светлогорской популяции

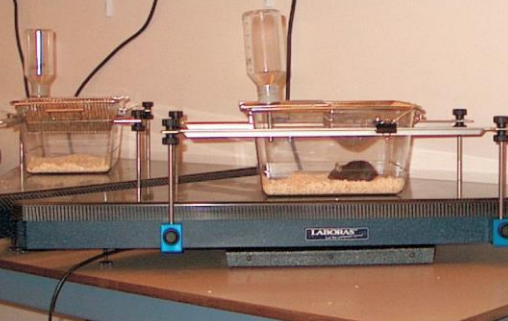


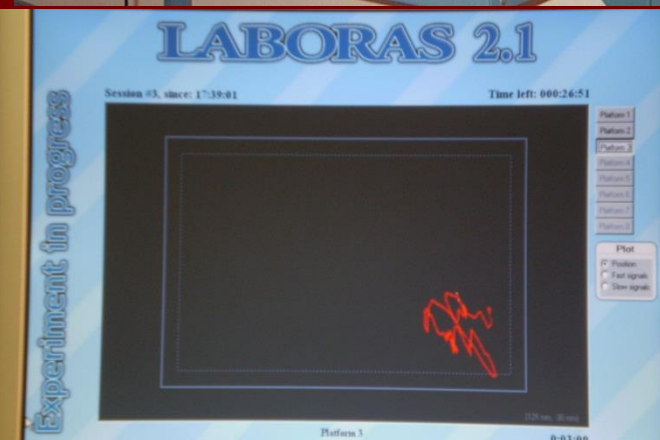
А - контроль, очаговая лимфоидная инфильтрация по типу лимфоидного фолликула.

Б - клетки печени мини-свиньи после введения стволовых клеток, полнокровие центральных вен.

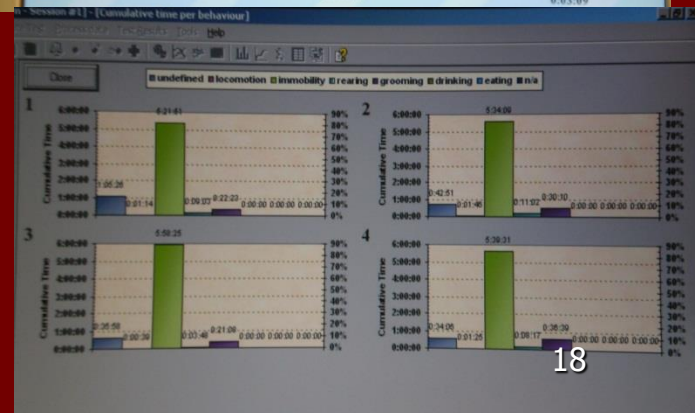
В - прижившиеся стволовые клетки от мышей GFP.B10 в пораженном органе



- 

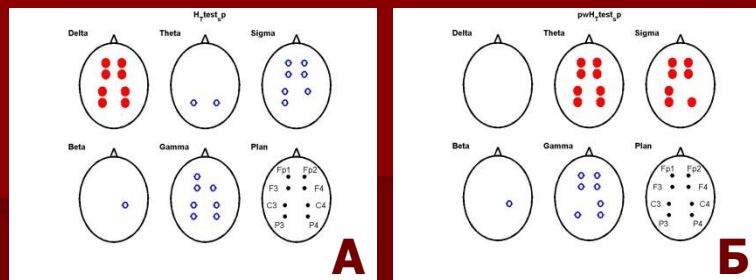


Microsoft Excel - all_f005_01																12/21
Файл Видок Вкладка Сервис Данные Справка																Введите формулу
Анализ																
WINDOW																
A1	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	
WINNOG	T-BEGIN	T-END	SESSION	CAGE	ANIMAL	CODE	UNDEF_D [s]	LOCOM_D [s]	IMMOB_D [s]	REAR_D [s]	GROOM [s]	DRINK_D [s]	EAT_D [s]	TOTAL_D [s]	TOTAL_UN [s]	
1	0006:30:00	00:07:00:00		1	1 rat_077	0	96,62	1,23	1702,96	0	0	0	0	0	1800	
2	0006:30:00	00:07:00:00		1	2 rat_078	0	71	0	1729	0	0	0	0	0	1800	
3	0006:30:00	00:07:00:00		1	3 rat_079	0	84,17	0	1705,26	0	10,21	0	0	0	1800	
4	0006:30:00	00:07:00:00		1	4 rat_080	0	261,05	4,14	1492,06	27,86	24,46	0	0	0	1800	
5	0006:30:00	00:07:00:00		2	1 rat_077	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
6	0006:30:00	00:07:00:00		2	2 rat_078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
7	0006:30:00	00:07:00:00		2	3 rat_079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
8	0006:30:00	00:07:00:00		2	4 rat_080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
9	0006:30:00	00:07:00:00		3	1 rat_077	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
10	0006:30:00	00:07:00:00		3	2 rat_078	0	107,26	0	1692,75	0	0	0	0	0	1800	
11	0006:30:00	00:07:00:00		3	3 rat_079	0	269,64	15,61	1239,6	64,4	220,75	0	0	0	1800	
12	0006:30:00	00:07:00:00		3	4 rat_080	0	63,94	0,97	1731,65	3,04	0	0	0	0	1800	
13	0006:30:00	00:07:00:00		4	1 rat_077	0	58,38	0	1741,62	0	0	0	0	0	1800	
14	0006:30:00	00:07:00:00		4	2 rat_078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
15	0006:30:00	00:07:00:00		4	3 rat_079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
16	0006:30:00	00:07:00:00		4	4 rat_080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
17	0006:30:00	00:07:00:00		5	1 rat_077	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	0006:30:00	00:07:00:00		5	2 rat_078	0	206,37	17,82	1223,65	65,11	207,06	0	0	0	1800	
19	0006:30:00	00:07:00:00		5	3 rat_079	0	50,92	0	1749,05	0	0	0	0	0	1800	
20	0006:30:00	00:07:00:00		5	4 rat_080	0	177,65	0	1362,85	4,26	235,25	0	0	0	1800	
21	0006:30:00	00:07:00:00		6	1 rat_077	0	0	0	1074	0	0	0	0	0	1800	
22	0006:30:00	00:07:00:00		6	2 rat_078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
23	0006:30:00	00:07:00:00		6	3 rat_079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
24	0006:30:00	00:07:00:00		6	4 rat_080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
25	0006:30:00	00:07:00:00		7	1 rat_077	0	207,89	8,92	1294,7	18	270,49	0	0	0	1800	
26	0006:30:00	00:07:00:00		7	2 rat_078	0	33,95	0	1766,05	0	0	0	0	0	1800	
27	0006:30:00	00:07:00:00		7	3 rat_079	0	38,45	0	1761,55	0	0	0	0	0	1800	
28	0006:30:00	00:07:00:00		7	4 rat_080	0	188,25	0	1613,75	0	0	0	0	0	1800	
29	0006:30:00	00:07:00:00		8	1 rat_077	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
30	0006:30:00	00:07:00:00		8	2 rat_078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
31	0006:30:00	00:07:00:00		8	3 rat_079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
32	0006:30:00	00:07:00:00		8	4 rat_080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
33	0006:30:00	00:07:00:00		9	1 rat_077	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
34	0006:30:00	00:07:00:00		9	2 rat_078	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
35	0006:30:00	00:07:00:00		9	3 rat_079	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
36	0006:30:00	00:07:00:00		9	4 rat_080	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
all_f005_01																

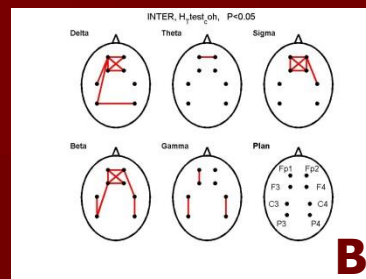




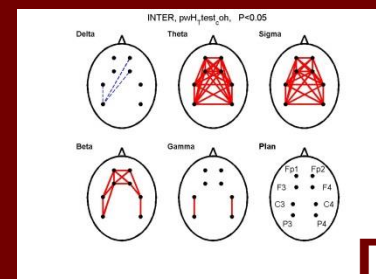
Электрографические характеристики мозга крыс при действии Идебенона в норме и работе «до отказа»



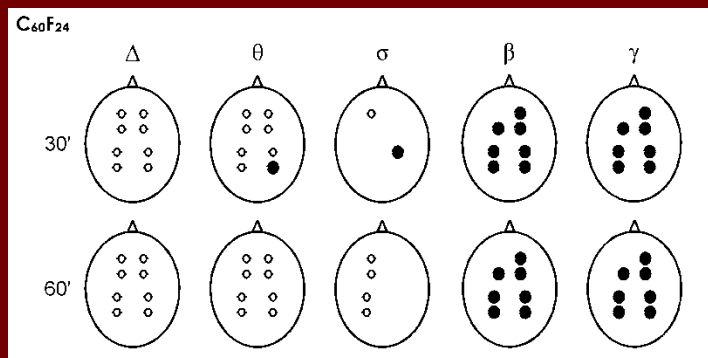
Распределение мгновенных значений спектральных мощностей электрической активности (СМ ЭАМ). А - без нагрузки ; Б – после физической нагрузки (тест ROTA-ROD)



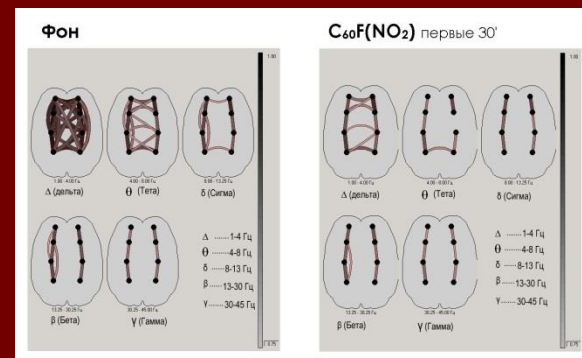
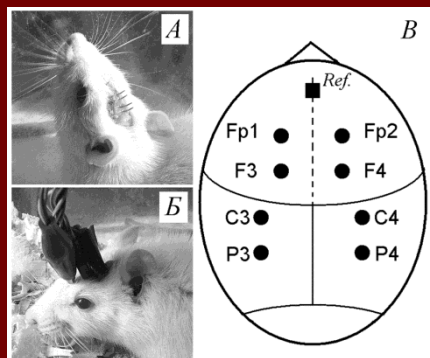
Распределение функций когерентности В - без нагрузки ; Г – после физической нагрузки (тест ROTA-ROD)



Характерные изменения спектральной мощности и паттерно-когерентных связей для фторсодержащих фуллеренилов



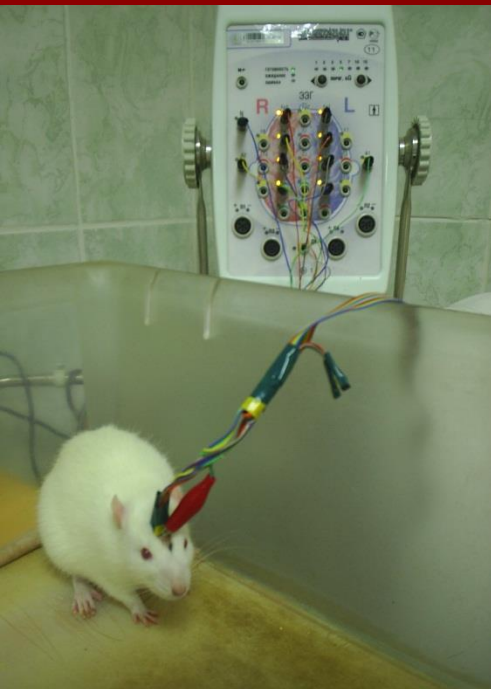
Изменение СМ ЭАМ после инъекции фуллеренила $C_{60}F_{24}$



Инъекции фуллеренов приводили к изменениям в спектральной мощности электрической активности мозга и в когерентных связях в низкочастотных диапазонах 19



Экстраполяция экспериментальных данных на человека или необходимость непрерывности неклинических исследований



Для человека токсичность новых фармацевтических средств предсказывается примерно в 70% случаев уже на стадии проведения доклинических испытаний.

Поэтому при клинической апробации и широком медицинском применении лекарств необходимы неклинические исследования их безопасности



По данным ВОЗ летальность от неправильного применения лекарств вышла на 4-е место в мире по смертности населения, после сердечно-сосудистых, онкологических заболеваний и травм

■ В НЦБМТ проведено испытание различных радикалов, переносимых фуллеренами $C_{60}F_{24}$, $C_{60}F_{48}$, $C_{60}F(NO_2)_2$, $C_{60}F_{36}(NH_2)_{12}$, $C_{60}[FNC_5H_5]^+F^-$, на поведение крыс WAG/GY.

■ Показано, что фуллеренилы при интраперитонеальном введении проникают через ГЭБ, значимо изменяют функциональное состояние головного мозга.

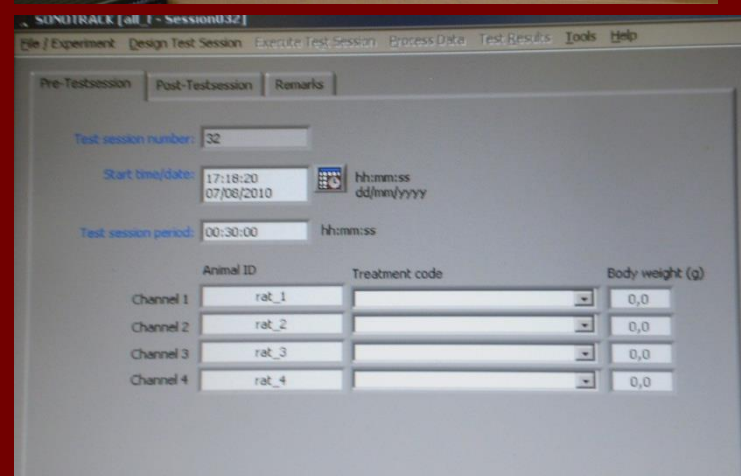


Новым методом биомоделирования является изучение вокализации животных в ультразвуковом диапазоне (УЗВ)

Высокочастотные колебания свидетельствуют об эмоциональных и мотивационных изменениях лабораторных животных.

УЗВ может применяться для исследования состояния животного и человека, обнаружения болевых ощущений, изменений при действии фармакологических веществ, стрессов, а также при изучении трансгенных животных.

Психотропные препараты существенно влияют на интенсивность и характер УЗВ



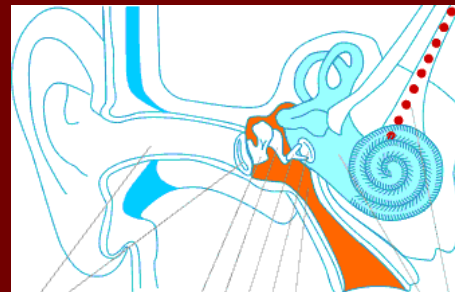
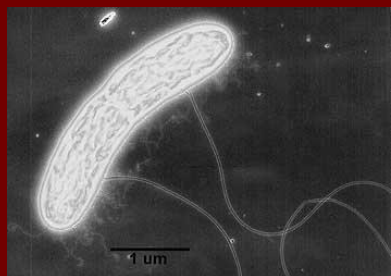
	A	B	C	D	E
1	Experiment	Stress.st			
2	Session n°	2			
3	channel	channel_1			
4	Measurem	#####			
5	Start time	16:00:01			
6	Samplerate	200000			
7					
8	DATA:				
9	Filename:	Time of ca	Seconds a	Frequency	Duration of
10		(HH:MM:S	start (s)	call (ms)	
11		16:00:57	56,336	38333	72
12		16:01:37	96,156	81250	4
13		16:02:21	140,114	36626	8
14		16:04:39	278,491	41952	62
15		16:04:39	278,575	30696	23
16		16:08:06	484,297	38756	41
17		16:09:02	541,775	35841	63
18		16:09:02	541,979	31625	8
19		16:10:25	624,268	35312	32
20		16:10:25	624,309	37130	23
21		16:12:46	755,799	40562	68
22		16:16:15	974,978	39773	126
23		16:16:16	975,252	37200	5
24		16:16:16	975,981	39500	4
25		16:16:16	975,989	39300	2
26		16:16:29	988,664	27250	12
27		16:16:29	988,692	33571	21
28		16:16:37	996,111	22455	11
29		16:16:37	996,138	31657	18
30		16:17:10	1029,141	35473	55
31		16:17:10	1029,787	37376	8
32		16:17:29	1048,036	36169	63
33		16:17:32	1051,476	31562	16
34		16:17:32	1051,851	36729	69
35		16:18:51	1130,123	36750	60





Принципиально новые биомодели для экстраполяции результатов фармакологических исследований

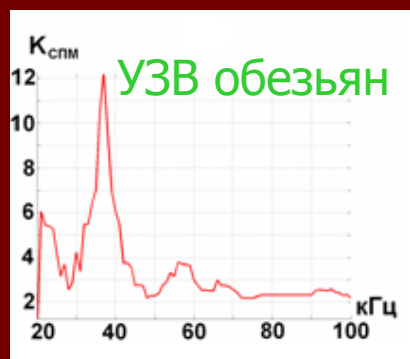
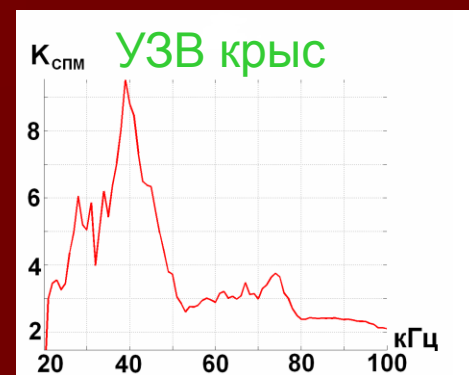
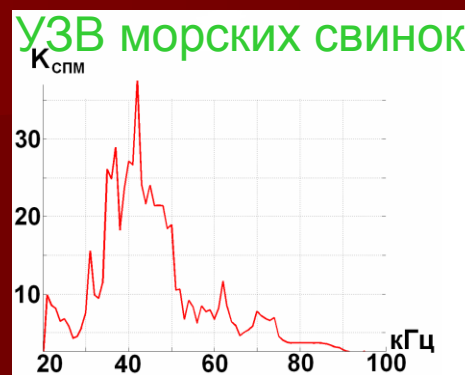
■ В 2010 году в НЦБМТ мы установили, что не только животные, но и человек способен генерировать сигналы в ультразвуковом диапазоне. Нами установлены сходства и различия информативных параметров УЗВ, которые позволяют использовать УЗВ как инструмент при моделировании разнообразных психоэмоциональных состояний, включая стрессорное воздействие, а также для исследования эффектов фармакологических средств. Полученные данные позволяют осуществлять экстраполяцию результатов исследований на лабораторных животных в отношении человека.



■ Группа ученых [Yang Liu, James A. Cotton, Bin Shen, Xiuqun Han, и др., 2010] из Мичиганского и Лондонского университетов установили роль **белка престины**, а также генов, ответственных за этот процесс, под воздействием ультразвука. В этих условиях престин способен удлинять волоски клеток улитки внутреннего уха и, вследствие этого, усиливать звуковой сигнал определенной частоты. Были использованы гены, отвечающие за синтез престины у 25 различных видов млекопитающих (дельфины, собаки, коровы, мыши, свиньи, кошки, летучие мыши). Хотя в этой группе только летучие мыши, киты и дельфины способны к ориентированию с помощью эхолокации, у всех животных имеется определенная схожесть гена престины.



Ультразвуковая вокализация как модель коммуникативных отношений у животных и человека

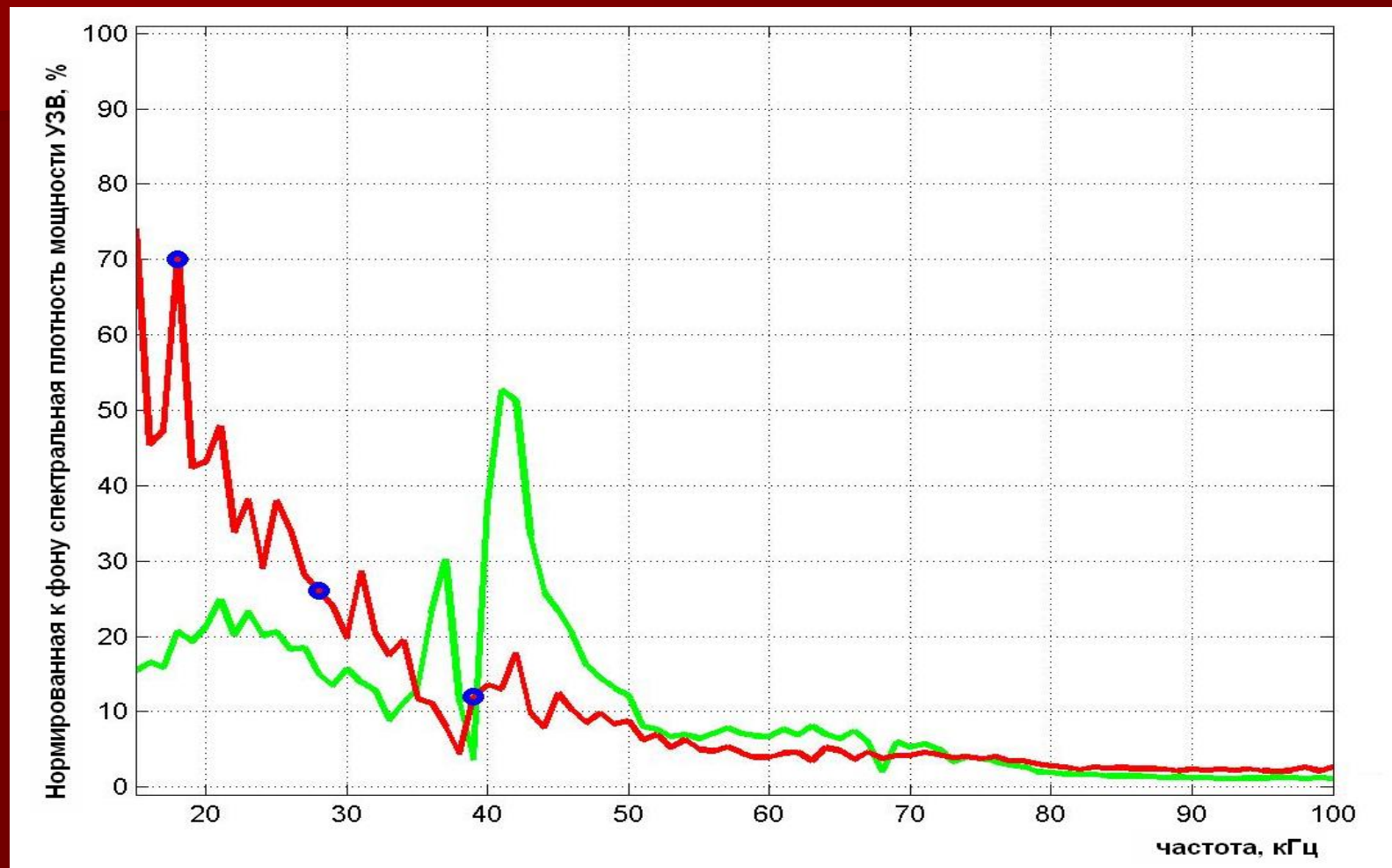


По оси абсцисс – частота (кГц), по оси ординат $K_{СПМ}$



Изменения УЗВ отображают стрессорное состояние организма и
корректируются введением анксиолитических препаратов.

Тест Порсолта («отчаяния»)

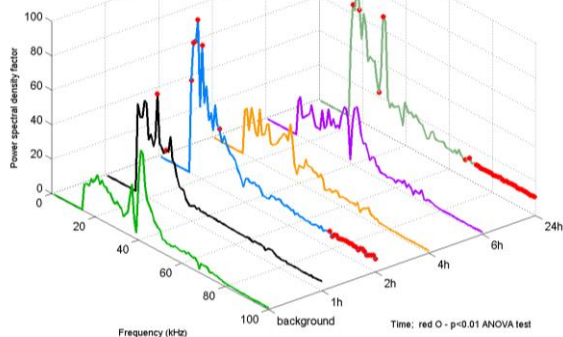


**Действие стресс-фактора проявляется в смещении частот УЗВ с 35-45 кГц к
диапазону 15-20 кГц. Крысы WAG/GY. Фон – зеленый, стресс – красный²⁴**



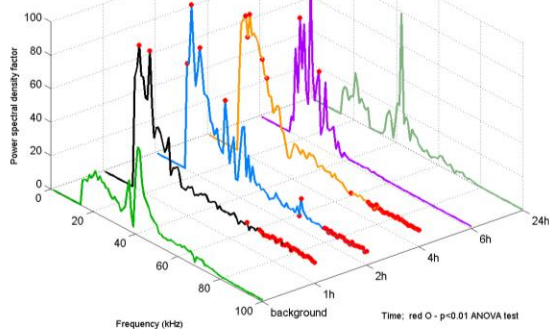
Изменения УЗВ во времени при изменении концентрации нейромедиаторов в мозге

ацетилхолин



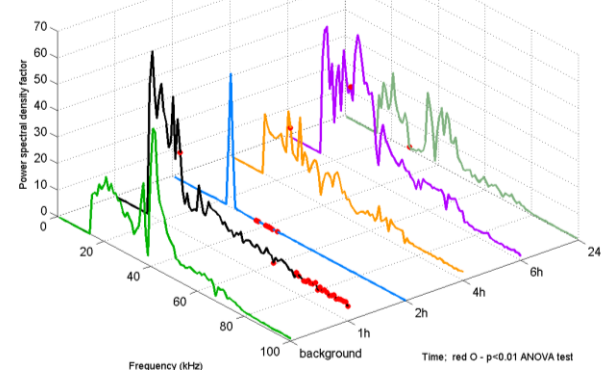
- В первые 2 часа – повышение Кспм в полосе 15-30 и 80-100 кГц;
 - через 4 и 6 часов – отличий от фона нет;
 - через 24 часа –преобладание частот 15-30 и 80-100 кГц
- Крысы WAG/GY, препарат Нивалин в дозе 1 мг/кг**

дофамин



- В первые 4 часа – повышение Кспм в полосе 15-33 и 75-100 кГц и уменьшение колебаний в диапазоне «покоя» (35-45 кГц);
 - через 6 часов – преобладание низкочастотных колебаний (15-30 кГц);
 - через 24 часа – отличий от фона нет
- Крысы WAG/GY, препарат Наком в дозе 180 мг/кг**

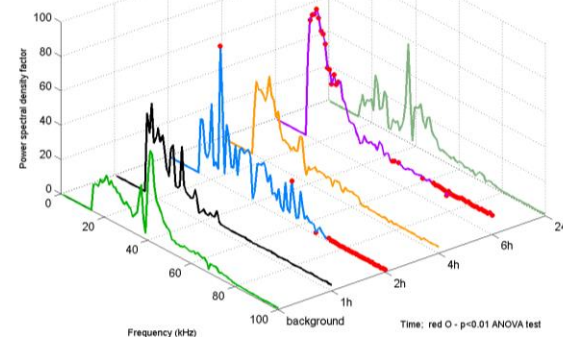
ГАМК



- Через 1 час – повышение Кспм на частоте около 28 кГц;
- через 2 часа – снижение Кспм в полосе 36-45 кГц и повышение в полосе 23-27 кГц;
- через 4, 6 и 24 часа –наличие частот 26-28 кГц, другие частоты незначимо отличаются от фона

Крысы WAG/GY, препарат Аминалон в дозе 60 мг/кг

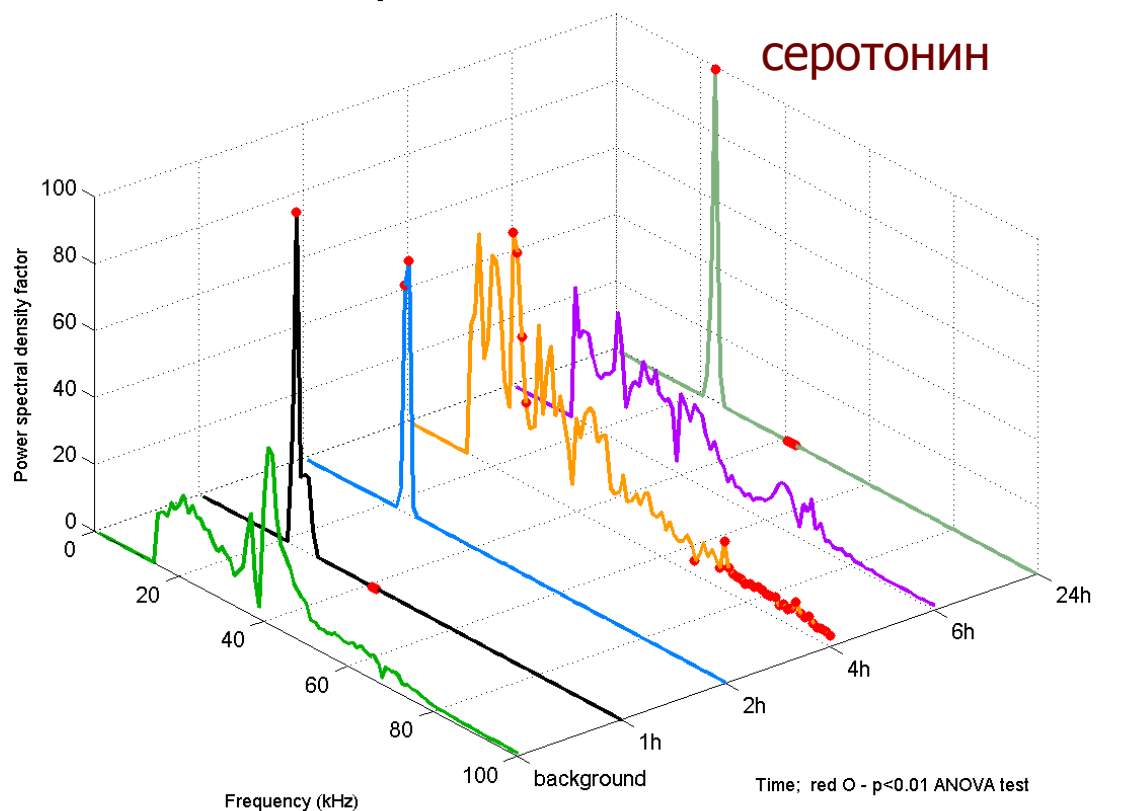
норадреналин



- В первые 2 часа – нарастание Кспм в полосе 15-37, 74-100 кГц;
через 6 часов – повышение в полосе 15-37 кГц;
через 24 часа –отличий от фона нет
- Крысы WAG/GY, препарат Страттера в дозе 1 мг/кг**



Изменения УЗВ во времени при изменении в мозге серотонина



- Через 1 и 2 часа – преобладание частот 23-26 кГц и подавление Кспм на частотах «покоя» (35-45 кГц);
- через 4 часа – повышение Кспм в полосе 75-100 кГц;
- через 24 часа – изменения, характерные для первых двух часов действия.
- Кспм Стимулотона (в диапазонах 15-30 кГц и 80-100 кГц) указывает на преимущественно серотонинэргический механизм формирования УЗВ.

Крысы WAG/GY, препарат Стимулотон в дозе 17 мг/кг



Технологическая схема создания и неклинической оценки лекарств



Обозначения: ГГЖ – гетерогенные животные, ГМЖ – генетически модифицированные животные, КрЖ – крупные животные (мини-свиньи, собаки), АМ – альтернативные модели

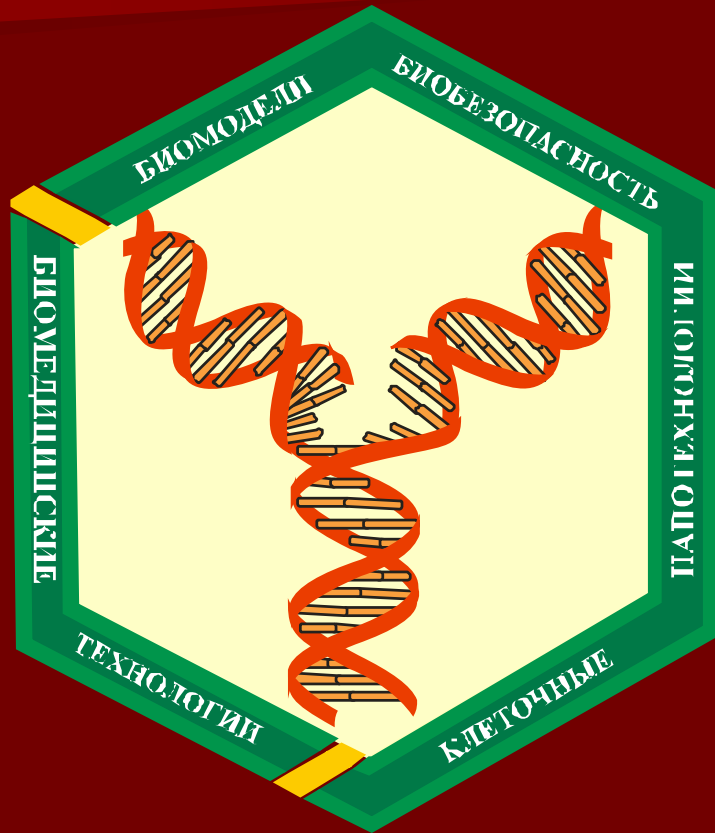




Основные публикации



Научный центр биомедицинских технологий ФМБА России



Наш сайт:

www.scbmt.ru

**Благодарю за
внимание !!!**