



Классические и альтернативные модели в лекарственной токсикологии

Н.Н. Каркищенко

Научный центр биомедицинских технологий РАМН, Москва

Даны генетически обусловленные и экспериментальные модели для оценки острой и хронической токсичности фармакологических веществ, общетоксического действия ксенобиотиков, специальных средств защиты. Приводятся стандартизованные и альтернативные модели оценки острой и хронической токсичности, альтернативные батареи тестов и основные стратегии токсикокинетики, токсикопротеомики, токсикогеномики, а также подходы к компьютерному моделированию токсичности.

Ключевые слова: токсикологические тесты, острая и хроническая токсичность, альтернативные токсикологические модели, токсикокинетика, токсикогеномика, токсикопротеомика, репродуктивная и ювенильная токсикология.

Главной целью тестирования на токсичность является классификация химических средств в соответствии с присущей им токсичностью в соответствии с директивой ЕЕС (Council Directive 67/548/ЕЕС [10]). Это требование связано с необходимостью защитить здоровье населения при регулярном соприкосновении с потенциально опасными материалами, оценкой токсичности биологически активных веществ, ксенобиотиков, а также потенциальных лекарственных средств и средств медицинского назначения.

Поскольку в Руководстве по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ [2] достаточно полно описаны методические рекомендации и указания по использованию традиционных методов оценки общетоксического действия лекарственных средств, мы не будем приводить здесь эти данные. Рассмотрим лишь наиболее перспективные направления оценки токсичности, общепринятые в мировой практике.

NB! Токсичность – это параметры веществ или лекарств, способных при попадании в определенных количествах, обычно превышающих лечебные, в организм человека или животного вызывать их отравление или гибель.

Классификация химических средств дана на основе средней летальной дозы (LD_{50}), определенной как "статистически достоверная доза вещества, от которой может последовать гибель 50% животных экспериментальной группы".

Концепция LD_{50} впервые была введена в 1927 г. для установления токсичности биологически активных компонентов, подобных дигоксину [42]. С того времени и до конца 70-х гг. тест на LD_{50} был раскритикован как с позиций науки, так и с позиций защитников животных [4, 51], и процедура тестирования была модифицирована [51], что позволило снизить моральный ущерб от использования животных [3]. Эта модификация классичес-

кого теста LD_{50} включает процедуру фиксированной дозы (Fixed Dose Procedure – OECD TG 420; [24]) метод определения класса острой токсичности (acute Toxic Class method – OECD TG 423; [25]) и процедуру Вверх-и-Вниз (Up-and-Down Procedure – OECD TG 425; [26]). В 2002 г. был исключен из руководства OECD оригинальный тест (OECD TG 401; [21])

NB! До настоящего времени не существует полностью отлицензированных альтернативных методов, способных заменить использование животных при определении токсичности.

Список тестов *in vitro*, представленных в этой главе, не может быть применен для оценки токсичности веществ, как единственный метод, но он становится хорошей альтернативой, если включается в ряд других подходов или батарею тестов. Такая стратегия должна включать батарею тестов, изучающих цитотоксичность, метаболизм, токсикокинетику и определение токсичности для отдельных конкретных органов. Валидация альтернативных моделей важна для поиска системных точек в таких экспериментах, как субхроническая токсичность и развивающаяся и репродуктивная токсичность. Мультицентровые оценки цитотоксичности *in vitro* (Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity – MEIC) показало, что тесты на определение цитотоксичности дают приблизительно одинаковые результаты в отношении действия веществ на клеточные культуры, их рост и жизнеспособность [50]. Анализ данных MEIC также показал, что в ряде случаев более предпочтительно использовать в тестировании клетки животных и человека [16].

Классические и стандартизованные модели

Определяющим принципом при оценке острой токсичности является минимизация количества животных при исследовании химических,

биологических или минеральных соединений. Общепринятый прием оценки LD₅₀ в соответствии с Системой глобальной гармонизации (Globally Harmonised System – GHS; [43]), предусматривает интервалы достоверности, ранжирования и классификации субстанции. Базовым методом является процедура фиксированной дозы, с общепринятым обозначением TG 420 (Test Guideline, Руководств по тестам), для условий перорального введения веществ.

NB! Острая токсичность – это когда введенное в однократной или многократных дозах в течение 24 ч вещество нарушает функции, морфологическую картину органов, вызывает гибель животных.

В соответствии с тестом TG 420 в исследованиях включают группы животных, предпочтительно одного пола, обычно самок, получающих дозы препарата, в ступенчатой процедуре. Предпочтительный вид грызунов – крыса, подвергаемая субстанции вводится в одинарной дозе через желудочный зонд. Допускается дробное введение субстанции небольшими частями, в течение периода не превышающего 24 часа. Используются фиксированные дозы по 5, 50, 300 и 2000 мг/кг, а в отдельных случаях может быть исследована доза в 5000 мг/кг. Первоначальный уровень дозы выбирают, исходя из ожидаемого уровня, при котором наблюдаются сразу несколько симптомов токсичности без причинения явных эффектов отравления или летального исхода, и основанного на данных *in vivo* или *in vitro*. Если такой информации нет, то стартовая доза принимается равной 300 мг/кг. Следующие группы животных могут получать более высокие или низкие дозы, в зависимости от наличия или отсутствия симптомов отравления. Эта процедура продолжается до тех пор, пока не будет определена доза, вызывающая отравление.

Животные наблюдаются ежедневно в течение 14 дней, в течение которых фиксируются изменения кожи и меха, глазных и слизистых мембран, дыхательной, кровеносной, вегетативной и центральной нервной системы, соматомоторной активности и поведения особей. Отмечается явление тремора, конвульсий, слюноотделения, диареи, летаргии, сонливости и комы. В эксперименте должны быть учтены принципы и критерии, включенные в Документ Human Endpoints Guidance Document [23]. Вес каждого конкретного животного, включенного в эксперимент, должен быть определен до и после введения субстанции. Обязательным условием должно быть проведение патоморфологических исследований.

Животные – модели

Выбор животных–моделей для исследований и особенно оценки воздействия различных факто-

ров физического, химического или биологического генеза является ключевой проблемой при планировании, проведении и анализе результатов. В дальнейшем изложении мы будем приводить необходимые материалы для исследователей, которые хотят найти наилучшие способы и формы организации экспериментов. Мы хотели бы обратить внимание на правильность использования этих таблиц. В колонке “исследуемое действие вещества” приводятся модели, ставшие уже классическими при проведении экспериментов, вызванных воздействием фармакологических или иммунотропных средств, химических веществ, воздействия физических факторов. Однако наиболее важными и приемлемыми являются биомодели для исследований, полученные с помощью генетических подходов в создании инбредных, гибридных, конгенных, мутантных, трансгенных, нокаутных и иных линий. Экспериментатор должен руководствоваться собственными целями и задачами при выборе той или иной экспериментальной модели или биомодели [1].

В таблице 1 указывается вид, линия или порода, пол, приемлемые вес и возраст животных.

Мини-свиньи в токсикологии

В течение длительного времени мини-свиньи использовались в фармакологии для решения специфических вопросов, когда не подходили другие виды животных. Из-за их близкого сходства по физиологическим и другим свойствам с человеком, мини-свиньи становятся все более привлекательной моделью в токсикологии. Существует несколько линий мини-свиней (светлогорские, геттингенские, юкатанские, Синклар, Ханфорд и другие). В наших работах в эксперименте использовали светлогорских мини-свиней, полученных в Центре РАМН в 1970-х гг. путем отдаленной гибридизации свиней породы ландрас, вьетнамской породы Й и диких кабанов европейского и азиатского происхождения. В токсикологии мини-свиньи становятся весьма популярными в фармацевтических исследованиях для замещения собак и приматов. Мини-свиньи высоко чувствительны к лекарствам и химическим веществам. Они могут быть использованы в процедурах наблюдения, администрирования, для исследований метаболизма или в фармакологических целях, так как имеют преимущества по сравнению с традиционными видами не-грызунов относительно специфического отклика на определенные классы лекарств.

Существуют разновидности высококачественных мини-свиней с известным статусом болезней, которые имеют преимущества перед традиционными видами не-грызунов. Научные, этические, экономические и социологические

Таблица 1.

Генетически обусловленные и экспериментальные модели для оценки острой и хронической токсичности фармакологических веществ, общетоксического действия ксенобиотиков, специальных средств защиты и радиопротекторов

Исследуемое действие вещества	Лабораторное животное	Линия или порода животного	Пол животного	Вес животного	Возраст животного
Биомодели для оценки общетоксического действия веществ					
Биомодель хлороформного поражения (в минимальных дозах) почек с летальным исходом	Мыши	Линии: A/WySnK1	♀♂	30-40 г	3-10 мес.
		CBA/CaLac	♀♂	«	«
		CBA/LacY	♀♂	«	«
		DBA/2JY	♀♂	«	«
Биомодель озоновой интоксикации (LD ₁₀₀ -34-36 ppm/r)	Мыши	A/WySnKL	♀♂	30-40 г	3-10 мес.
		BALB/cJLac	♀♂	«	«
Биомодель высокой резистентности к токсическому действию хлороформа	Мыши	C57BL/6J	♀♂	30-40 г	3-10 мес.
		C57L/JY	♂	«	«
Гиперчувствительная биомодель токсического действия трихлорфторметана и других хлор- и фторсодержащих интоксикантов и ксенобиотиков	Хомяки	Линия: 82...2 BALB/c C57BR/cd WAG, BUF Светлогорские	♂	120 г	6-18 мес.
	Мыши		♂	30-40 г	3-8 мес.
	Крысы		♂	«	3-10 мес.
	Мини-свиньи		♂	150-200 г 40-50 кг	2-4 мес. 6-18 мес.
Модели для оценки общетоксического действия биологически активных средств и фармпрепаратов	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50	8 мес.-2 года
	Собака	«Английский бигл»	♀♂	до 14 кг	8 мес. - 2 года
	Мыши	гибриды F1(CBA×C57 B1/6J)	♀♂	до 25 г	2-3 мес.
	Крысы	Аутбредные, Линии Wistar	♀♂	до 250 г	2-3 мес.
	Кролики	Порода «Шиншилла»	♀♂	до 2,5 кг	4-6 мес.
Модели для оценки острой токсичности БАВ и фармпрепаратов	Мыши	гибриды F1(CBA×C57 B1/6J)	♀♂	18-20 г	2-2,5 мес.
	Крысы	Аутбредные, Линии Wistar	♀♂	до 250 г	2-3 мес.
Модели для оценки хронической токсичности БАВ и фармпрепаратов	Крысы	Аутбредные, Линии Wistar	♂	150-200 г	2-3 мес.
	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
	Собаки	«Английский бигл»	♀♂	7-14 кг	8 мес. - 2 года
Влияние фармпрепаратов, ксенобиотиков, БАВ, кальмативов и инкапсультантов на ЦНС	Мыши	Гибриды F1(CBA×C57 BL/6J)	♂	18-25 г	2-3 мес.
	Крысы	C57B1/6j	♂	17-24 г	2-3 мес.
		Аутбредные	♂	до 250 г	2-3 мес.
		Линии Wistar	♂	120-200 г	2-2,5 мес.
	Кошки	Аутбредные	♂	3-5кг	1-7 лет
	Мини-свиньи	Светлогорские	♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
Биомодели для исследования антитодов и комплексонов, применяемых для защиты организма от поражающего действия радиоактивных веществ					
Этапы изучения: а. предварительный отбор препаратов (введение изотопа однократно при любой аппликации) б. детальное исследование эффективности	Крысы	Аутбредные	♂	180-220г	2,5-3 мес.
	Мыши	Аутбредные	♂	18-22г	2-2,5 мес.
	Крысы	Аутбредны	♀♂	160-250г	2-4 мес.
	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
	Собаки	Аутбредные	♀♂	8-12кг	1-7 лет

Исследуемое действие вещества	Лабораторное животное	Линия или порода животного	Пол животного	Вес животного	Возраст животного
Определение зависимости доза-эффект	Мыши	Аутбредные	♀♂	40-50г	3-10 мес.
Исследование с введением фиксированной дозы токсиканта (не менее 2-х животных обоего пола в группе)	Крысы	Аутбредные	♀♂	300-350г	5-12 мес.
	Кошки	Аутбредные	♀♂	3-5кг	1-7 лет
	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
	Собаки	Аутбредные	♀♂	10-25кг	1-7 лет
Оценка антидотной активности при внутримышечном (внутривенном) поступлении токсиканта	Мыши	Аутбредные	♀♂	18-22г	2-2,5 мес.
	Крысы	Аутбредные	♀♂	180-200г	2,5-3 мес.
Оценка эффективности антидотов при пероральном поступлении токсиканта	Мыши	Аутбредные	♀♂	18-22г	2-2,5 мес.
	Крысы	Аутбредные	♀♂	180-200г	2,5-3 мес.
	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
Оценка эффективности антидота при ингаляционном поступлении токсиканта	Крысы	Аутбредные	♀♂	180-200г	2,5-3 мес.
	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
Оценка антидотной активности при накожном поступлении токсиканта	Крысы	Аутбредные	♀♂	180-200г	2,5-3 мес.
	Мыши	Аутбредные	♀♂	18-22г	2-2,5 мес.
	Морские свинки	Аутбредные	♀♂	200-300 г	22-27 сут.
	Кролики	Аутбредные	♀♂	2,5-3 кг	6 мес. – 3 года
	Мини-свиньи	Порода «Пинпила» или альбиносы Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
Определение острой токсичности и широты терапевтического действия средств и фармпрепаратов					
а. Исследование на грызунах (введение 4-5 доз однократно, перорально и парентерально)	Мыши	Аутбредные	♀♂	40-50 г	3-10 мес.
	Крысы	Аутбредные	♀♂	300-350 г	5-12 мес.
	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
б. Исследования на негрызунах (введение 2 доз, однократно)	Собаки	Аутбредные	♀♂	10-25 кг	1-7 лет
	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
Изучение фармакокинетики:					
Исследование зависимости концентрации препарата в плазме крови от времени после его введения	Мини-свиньи	Светлогорские	♀♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
	Собаки	Аутбредные	♀♂	15-20 кг	1-7 лет
Изучение общей фармакологической активности, влияния на основные системы жизнеобеспечения организма	Мыши	Аутбредные	♀♂	40-50 г	3-10 мес.
	Крысы	Аутбредные	♀♂	300-350 г	5-12 мес.
Биомодели для исследования антидотов и радиопротекторов					
Первичный отбор	Мыши	Линия C57B16 CBA	♂	18-24 г	2-2,5 мес.
Изучение радиопротекторных свойств	Мыши	Аутбредные	♂	40-50 г	3-10 мес.
	Крысы	Аутбредные	♂	300-350 г	5-12 мес.
	Хомяки	Аутбредные	♂	100-150 г	6-18 мес.
	Мини-свиньи	Светлогорские	♂	40-50 кг	8 мес. - 2 года
	Собаки	Аутбредные	♂	8-12 кг	1,5-5 лет
	Обезьяны	Аутбредные	♂	Ср.вес	Взрослые особи

Продолжение таблицы 1.

Исследуемое действие вещества	Лабораторное животное	Линия или порода животного	Пол животного	Вес животного	Возраст животного
Изучение фармакодинамики, безвредности и механизма радиозащитного действия	Мыши	Аутбредные	♂	40-50 г	3-10 мес.
	Крысы	Аутбредные	♂	300-350 г	5-12 мес.
	Собаки	Аутбредные	♂	8-12 кг	1-7 лет
	Обезьяны	Аутбредные	♂	Ср.вес	Взрослые особи
	Мини-свиньи	Аутбредные	♂	20-30 кг	Взрослые особи
Высокочувствительные биомодели для изучения последствий действия проникающей радиации	Мыши	Линии BALB/cLacY, DBA/2JYJLac	♀♂	30-40г	3-10 мес.
Биомодель чувствительности к облучению рентгеновскими лучами: LD _{50/30} менее 650	Мыши	Линии BALB/Cj, A/J, RF/J, SWR/J, C57BL/6J, AN cJ	♀♂	30-40г	3-4 мес.
	Мини-свиньи	Аутбредные	♀♂	20-30 кг	Взрослые особи
	Мыши	CBA/J, C3HeB/J, SJL/J, C57BR/J, 129/J	♀♂	30-40г	3-4 мес.
	Мини-свиньи	Аутбредные	♀♂	20-30 кг	Взрослые особи
LD _{50/30} более 650					

основы делают мини-свиней хорошей токсикологической и фармакологической моделью. Растущий интерес к мини-свиньям определен тем, что они имеют большую долю сходства с человеком по анатомическим и физиологическим особенностям, чем другие виды не-грызуны; особое сходство с человеком имеют кожа, сердце и почки [1, 41]. Они также являются доступными высококачественными SPF линиями животных.

Фармакокинетика и метаболизм. Фармакокинетические исследования легко проводятся на мини-свиньях с повторяющимся забором образцов крови или образцов других видов жидкостей из тела или тканей. Цитохром P450 – метаболический образец печени – был широко изучен и сравнен с цитохромом человека, а в нашем Центре показана общность функционирования у них N-ацетилтрансферазы [1].

Администрирование доз. Наиболее общие процедуры определения доз – это оральные процедуры с использованием желудочного зонда или дозировки диеты с добавлением медикаментов в корм. Дозирование с помощью желудочного зонда у конвенциональных животных может вызвать тяжелый стресс. Ввиду анатомических и физиологических сходств кожи у человека и мини-свиньи последние будут весьма полезны для сравнительных исследований. Парентеральные дозы могут быть применены в виде инъекций внутримышеч-

но, подкожно, внутривенно и внутривенно. Другие процедуры, такие как аэрозольные дозировки [1, 41], также были успешно применены на мини-свиньях.

Репродуктивная и ювенильная токсикология. Светлогорские мини-свиньи свободны от патогенных бактериальных инфекций или вирусных болезней и свободны от любых паразитических болезней. В тестах на репродуктивную токсичность используют два отряда животных: грызуны и не-грызуны, обычно крысы и кроликов. Мини-свиньи могут быть альтернативным видом в тератогенетических и репродуктивных исследованиях, когда традиционные виды, такие как мыши, крысы, кролики, являются неподходящими. Половой зрелости светлогорские мини-свиньи достигают в 6-месячном возрасте. Обычно самый хороший возраст для включения в эксперимент 5-10 месяцев. В тератогенетических исследованиях период лечения длится от начала имплантации (день 11) до закрытия жесткого неба (день 35), включая беременность. Могут быть использованы различные процедуры наблюдения (администрирования). Наиболее широко применяют оральные процедуры, но может быть также применена процедура продолжающихся внутривенных вливаний [1]. Беременность может контролироваться ультразвукографией на 4-5 неделе беременности. Свиней забивают на 110-112 день

беременности. Так как вес плода составляет 350-400 г, возможно провести полную аутопсию эмбрионов. Светлогорские мини-свиньи также полезны как модель изучения эффектов мужского оплодотворения [1]. Мини-свиньи имеют большее сходство с человеком в норме оплодотворения, проценте морфологически ненормальной спермы, проценте спермы со способностью к движению и вероятностью крипторхизма и варикоцеле.

Традиционно, ювенильные крысы и собаки являются видами, выбираемыми для таких исследований, хотя и мини-свиньи больше подходят для этих работ. Используют различные стандарты техники исследований, такие как оральное или парентеральное дозирование, офтальмоскопия, ЭКГ и повторяющийся забор проб крови для клинической патологии и токсикокинетики. Имплантация венозных портов наиболее удачна, начиная с 7 дня и далее, для ежедневной внутривенной дозировки. Фундаментальные клиничко-патологические данные очень важны, так как многие стандартные параметры изменяются быстро с возрастом.

В связи с этим мини-свинья как модель в тестах на токсичность фармацевтических и других химических веществ в настоящее время принята в Японии, ЕС и США [41]. Свиньи и мини-свиньи упоминаются особо как потенциальный вид негрызунов в руководствах Японии и Канады. Свиньи и мини-свиньи внесены в руководство OECD 409 (OECD = Organization for Economic Cooperation and Development, Организация по экономической кооперации и развитию). Однако, содержание как светлогорских, так и других мини-свиней требует закрытой барьерной системы, т.е. так как они выращиваются в нашем Центре соблюдение этих условий дает в результате надлежащий иммунологический статус.

Стандартизованные модели

Программа OECD обеспечивает механизм развития новых или обновления существующих *Руководств по использованию тестов TG (Test Guideline)*. OECD TG широко используется мировым научным сообществом и признана авторитетами в странах-членах OECD и не-членах OECD. Совместное совещание Химического Комитета с Работавшей группой по химикатам, пестицидам и биотехнологии, выработало политику по дальнейшему улучшению TG.

Разработанные новые методы проходят процедуру включения в Руководство по использованию тестов. Описание метода подается в Рабочую группу, которая рассматривает метод с точки зрения его целей, технического содержания, этических принципов при использовании животных, стоимости, соответствия национальным политическим требованиям. Затем Рабочая группа выносит

метод на Общее обсуждение, которое проводится в среднем 1 раз в 8 месяцев. Вынесенное решение возвращается в Рабочую группу. При необходимости метод дорабатывается и вновь выносится на Общее обсуждение. Общее время, необходимое на внесение нового метода в Руководство, существенно варьирует, но в среднем оно занимает примерно 18 месяцев.

Метод определения класса острой токсичности TG 423 аналогичен по выбору животных, целям и условиям выполнения методу TG 420 и состоит из последовательной процедуры с использованием трех животных одного пола (обычно самок) на каждом шаге. Отсутствие или наличие летальных исходов от определенной дозы вещества определяет следующий шаг, при котором дальнейшее тестирование больше не нужно, а необходимы три дополнительных особи для тестирования с той же самой дозой или по три дополнительных особи для тестирования с более высокой или более низкой дозой. Стартовая доза выбирается из четырех фиксированных уровней.

Конечной дозой является та, которая с наибольшей вероятностью приведет к летальному исходу у некоторых из тестируемых животных. В случаях, когда такой информации нет, то стартовая доза принимается априорно (см. стр. 6).

Процедура вверх-и-вниз TG 425 аналогична целям и условиям TG 420, но содержит прогрессию из одинарных доз, которые проверяются преимущественно на самках крыс в одно и то же время. Первое животное получает дозу на шаг ниже уровня LD50, а если информация по предварительной оценке отсутствует, то стартовая доза берется равной 175 мг/кг. Если животное выживает, то доза следующего животного увеличивается в 3,2 раза от первоначальной дозы; если умирает, то доза следующего животного уменьшается в соответствующей прогрессии.

Предпочтительный вид грызунов – крыса. Проверяемая субстанция вводится в одинарной дозе через желудочный зонд (если это невозможно, то дозу можно дать небольшими частями в течение периода, не превышающего 24 часа).

Оценка острой токсичности ингаляций TG 403 дает информацию о возможности возрастания токсических эффектов при кратковременных аэрозольных воздействиях. Этот тест является основой для классификации и маркировки по параметрам средней летальной концентрации LC50, полученных в острых экспериментах. В течение определенного времени для тестирования субстанции, по меньшей мере в трех заданных концентрациях. Несколько групп крыс по 10 особей (5 самцов и 5 самок) используются для оценки минимум трех заданных концентраций, по одной концентрации на одну группу. Условия эксперимента должны

Таблица 2.

TG (по данным OECD Guidelines for the testing of Chemicals) для краткосрочных и долгосрочных токсикологических тестов

TG	Наименование и комментарий
401	Острая пероральная токсичность (исключен). Принят 12.05.1981. Дата исключения: 20.12.2002 г.
402	Острая дермальная токсичность. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24 февраля 1987 г.: учтено требование уменьшения количества животных в эксперименте, по сравнению с оригинальным методом снижения уровня используемых доз.
403 ТнЖ**	Острая ингаляционная токсичность. Принят 12.05.1981.
404 ТнЖ	Острое раздражение и коррозия кожи. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24.04.2002 как стратегия снижения количества животных и очистки от использования животных в соответствии с требованиями OECD* TG, включая тесты <i>in vitro</i> .
405 ТнЖ	Острое раздражение и коррозия глаз. Принят 12.05.1981. Подтвержден 24.04.2002 как стратегия снижения количества животных и очистки от использования животных в соответствии с требованиями OECD TG, включая тесты <i>in vitro</i> .
406 ТнЖ	Чувствительность кожи. Принят 12.05.1981. Подтвержден 17.07.2002 как стратегия снижения количества животных до 50% по сравнению с оригинальным OECD TG.
407 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у грызунов в повторяющихся дозах в течение 28 -дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 27.07.2002 как стратегия очистки от использования животных по сравнению с оригинальным OECD TG, с большей информацией о практике дозировки и большей информацией о таких же животных.
408 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у грызунов в течение 90-дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 21.09.1998.
409 ТнЖ	Изучение пероральной токсичности у не -грызунов (мини-свиньи) в течение 90-дней. Принят 12.05.1981. Подтвержден 21.09.1998.
410 ТнЖ	Дермальная токсичность. Принят 12.05.1981.
411 ТнЖ	Субхроническая дермальная токсичность в течение 90-дней. Принят 12.05.1981.
412 ТнЖ	Ингаляционная токсичность: тест повторяющихся доз в течение 14/28 дней. Принят 12.05.1981.
413 ТнЖ	Субхроническая ингаляционная токсичность в течение 90-дней. Принят 12.05.1981.
414 ТнЖ	Изучение развития пренатальной токсичности. Принят 12.05.1981. Подтвержден 22.01.2001, дает снижение количества животных по сравнению с оригинальным OECD TG до 20%, дает больше информации об аналогичных животных.
415 ТнЖ	Изучение первого поколения репродукционной токсичности. Принят 12.05.1983.
416 ТнЖ	Изучение второго поколения репродукционной токсичности. Принят 26.05.1983. Подтвержден 22.01.2001.
417 ТнЖ	Токсикокинетика. Принят 04.04.1984. Подтвержден 17.07.1995.
418 ТнЖ	Задержка нейротоксичности фосфорорганических субстанций, следующих за острыми проявлениями. Принят 04.04.1984. Подтвержден 27.07.1995.

TG	Наименование и комментарий
419 ТнЖ	Изучение задержки нейротоксичности фосфорорганических субстанций в повторяющихся дозах в течение 28 дней. Принят 04.04.1984. Подтвержден 27.07.1995.
420 ТнЖ	Острая пероральная токсичность – процедура фиксированной дозы. Принят 17.07.1992. Подтвержден 17.12.2001 использован метод снижения и очищения от использования животных по сравнению с условиями метода TG 401, меньше страданий, меньшее количество животных в эксперименте.
421 ТнЖ	Тест скрининга репродукционной и развивающейся токсичности. Принят 27.07.1995. Метод снижает использование животных в эксперименте по сравнению с оригинальными TG, обеспечивая необходимую информацию с минимальным количеством животных.
422 ТнЖ	Комбинированное изучение токсичности в повторяющихся дозах с тестом скрининга репродукционной и развивающейся токсичности. Принят 22.03.1996. Метод снижает использование животных в эксперименте по сравнению с оригинальными TG, комбинирует новые скрининговые тесты на репродукционную токсичность с TG 407. Еще больше снижает количество животных вплоть до абсолютного минимума при комбинации точек окончания эксперимента.
423 ТнЖ	Острая пероральная токсичность – класс методов острой токсичности (АТС). Принят 22.03.1996. Подтвержден 17.12.2001. Метод снижает количество животных по сравнению с условиями TG 401, т.е. используется значительно меньше животных (10% от требующихся в TG 401).
424 ТнЖ	Изучение нейротоксичности у грызунов. Принят 21.07.1997.
425 ТнЖ	Острая пероральная токсичность: процедура вверх -и-вниз. Принят 21.09.1998. Подтвержден 17.12.2001. Тест снижает количество животных по сравнению с условиями TG 401, требуется меньше животных, обеспечивающих точность оценки LD ₅₀ как в методах TG 420 и 423.
426 ТнЖ	Изучение развития нейротоксичности. Планируется в новом руководстве.
427 ТнЖ	Впитывание кожей: метод <i>in vivo</i> . Принят 13.04.2004.
428	Впитывание кожей: метод <i>in vitro</i> . Принят 13.04.2004. Хорошая альтернатива методу <i>in vivo</i> , для полной замены метода TG 427.
429 ТнЖ	Чувствительность кожи: исследование местных лимфатических узлов. Принят 24.04.2002. Метод, снижающий и очищающий от использования животных по сравнению с TG 406, обеспечивает большим количеством информации и служит причиной меньших страданий.
430	Коррозия кожи <i>in vitro</i> : тест транскожной электрической устойчивости. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест, использует метод замены животных в части коррозии теста TG 404.
431	Коррозия кожи <i>in vitro</i> : модель теста на коже человека. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест, использует метод замены животных в части коррозии теста TG 404.
432	Тест фототоксичности <i>in vitro</i> 3ТЗ. Принят 13.04.2004. Альтернативный тест. Полная замена, поскольку нет аналогичных тестов OECD TG на животных.
433 ТнЖ	Острая токсичность ингаляций: Процедура фиксированной дозы (FDP). Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 403, использует меньше животных и служит причиной меньших страданий.

ТГ	Наименование и комментарий
434 ТнЖ	Острая дермальная токсичность: Процедура фиксированной дозы (FDP). Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 404, использует меньше животных и служит для уменьшения страданий животных.
435 ТнЖ	Коррозия кожи <i>in vitro</i> . Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 404, для специфических целей (только для изучения кислот и оснований).
436 ТнЖ	Острая токсичность ингаляций: класс токсичности АТС. Планируется в новом руководстве. Метод снижает и очищает от использования животных по сравнению с методом TG 403, использует меньше животных и служит для уменьшения страданий животных.
451 ТнЖ	Изучение канцерогенности. Принят 12.05.1981.
452 ТнЖ	Изучение хронической токсичности. Принят 12.05.1981.
453 ТнЖ	Комбинированное изучение хронической токсичности и канцерогенности. Принят 12.05.1981 как комбинирование исследований в тесте TG 453. Может снижать количество животных по сравнению с использованием только TG 451 и TG 452.

* – OECD = Organization for Economic Cooperation and Development
(Организация по экономической кооперации и развитию)

** – ТнЖ = Тест на Животных

предусматривать содержание не менее 19% кислорода, стабильное атмосферное давление и 12-15-кратный воздухообмен в час. Животных наблюдают ежедневно в течение 14 дней. Особое внимание уделяется изменениям глазных и слизистых оболочек, дыхательной, кровеносной систем, кожи и меха. Остальные процедуры выполняются в соответствии с тестом TG 420.

В соответствии с соглашением между странами-членами OECD в июне 2004 г. предложена процедура фиксированной дозы TG 433 как альтернатива оценки острой ингаляционной токсичности по методу TG 403. Различие между TG 403 и новым тестом TG 433 заключается в том, что процедура фиксированной дозы применяется позже со стратегией аналогичной используемой в TG 420. В комбинации с использованием появления симптомов отравления как точки окончания тестирования вместо летального исхода были достигнуты значительные улучшения, касающиеся минимизации страданий животных и уменьшения использования лабораторных животных в эксперименте.

Касаясь достоверности и корректности методов оценки острой токсичности следует отметить, что субстанций, использование которых может привести к задержке летального исхода, должны быть исследованы по методике TG 425, в которой

продолжительность тестирования будет существенно длиннее по сравнению с другими методами тестирования. Однако, внутри методов TG 420 и TG 423, нахождение периода задержки летального исхода может потребовать дополнительно более низких уровней доз для практического использования или повторения исследований. Сравнительный статистический анализ показал, что при всех трех методах корректность результатов исследования зависят от выбора уровня стартовой дозы по значениям LD₅₀. Поскольку TG 420 использует в качестве точки окончания эксперимента развитие отравления вместо летального исхода, он не может быть принят в качестве достоверной информации о токсическом эффекте близком к летальным дозам [49]. Только использование всех трех тестов повысит уровень надежности полученных результатов.

В токсикологических исследованиях комплексная оценка химических рисков основывается на предположении, что эффект, наблюдаемый на лабораторных животных, будет наблюдаться и у человека. Однако, этические нормы и концепции защиты животных, выдвигаемые в последние 20 лет, также как и текущие изменения регулирования охраны окружающей среды, делают очевидным необходимость поиска новых подходов. Очевидно, что необходима замена тестов на живот-

ных для оценки безопасности химических средств и продуктов.

Токсикогеномика в альтернативном моделировании

Необходимость достижения полной замены животных в тестах моделями систем в области токсикокинетики, метаболизма и зародившейся области токсикогеномики предполагает расшифровку механизмов генотоксичности и мутагенеза, которые должны помочь в развитии подходящих моделей *in vitro* [37]. Прогресс будет зависеть от ряда факторов, таких как развитие тестов *in vitro* в области токсикокинетики и метаболизма, развитие тестов *in vitro* для исследований годности лекарств, дальнейший прогресс в области токсикогеномики. Гибкий подход к тестам *in vivo*, уже сегодня может способствовать снижению количества используемых в тестах животных [9]. Оценка некоторых тестов *in vitro* и замена исследований подострой токсичности на животных [30].

Хотя некоторые тесты *in vitro* поддержаны в настоящее время в качестве допустимых для оценки генотоксичности и мутагенеза при воздействии химическими веществами, они имеют ряд ограничений, таких как недостаточная способность быть похожими на метаболизм человека, токсикокинетику, суперчувствительность ситуациям *in vivo*. Использование линий клеток далеко не всегда соответствует изучаемым целевым органам. По этим причинам разрабатывается новая стратегия тестирования, состоящая из четырех стадий. На стадии 1 оценивается изучаемая субстанция на основе существующих данных и знаний, главным образом, на основе существующей информации об изучаемых химических веществах. На стадии 2 проводится батарея тестов *in vitro* для определения рисков. Стадия 3 включает моделирование цели системы *in vitro*, но моделирование проводится в тех ситуациях, когда один или большее число тестов на стадии 2 дали положительный результат. Стадия 4 включает тесты на животных, когда один или большее число тестов на стадии 3 дали положительный результат. Стадия 2 включает в себя тесты, разрешенные для проведения в регуляторных целях (см. ниже TG 471; TG 480; TG 476; TG 473) и/или оптимизированные тесты *in vitro*. Стадия 3 должна включать модели целевых органов/систем *in vitro*, которые необходимо развивать и валидировать (эксперты рекомендуют использовать клетки кожи или модели первой стадии исследований для тестирования косметических продуктов); окончательно, стадия 4 проводится только в тех случаях, когда это необходимо и тогда она включает в себя тесты *in vivo* [22].

С 2005 г. осуществляется международный

интегрированный проект развития стратегий тестирования *in vitro* для оценки системной острой токсичности препаратов у человека, которые могли бы полностью заменить тесты определения острой токсичности на животных, применяемых в настоящее время с целью систематизации. Проект включает сбор, оценку и разработку данных *in vitro* и *in vivo* для сравнительного анализа; определения таких параметров, как кинетика, метаболизм и токсичность для органов. Целью проекта является установление корреляции между изменениями концентраций веществ *in vitro*, дозами токсичности *in vivo*; описание новых инструментов и клеточных систем для определения диапазона эксперимента, стратегий для предварительного определения и имитационного моделирования острой токсичности у животных и человека [12].

Генетическая токсичность

Специальным соглашением по использованию тестов *in vitro* для оценки генотоксичности в перечень исследовательских методов были включены тесты Ames / бактериальной обратной мутации, также как и тесты *in vitro* для хромосомной аберрации, мутации генов клеток и изменений в сестринских хроматидах (OECD TG 471, 473, 476 и 479, соответственно, [3, 9]). Использование этих приемов, самих по себе или в комбинации, дает высокочувствительные тесты определения генетической токсичности (11-12). Научные и этические соглашения по использованию методов *in vitro* для нахождения точки окончания эксперимента, тесты на определение генетической токсичности *in vivo*, послужили отправной точкой для валидации [23].

В соответствии с рекомендациями Агентства по защите окружающей среды США (EPA – Environmental Protection Agency) были предложены тесты по оценке острой токсичности на рыбах, икре рыб, *in silico*. ECVAM валидировала использование эмбриональных стволовых клеток для эмбриотоксичности, а также использования культуральных клеток животных и человека.

Альтернативные тесты на рыбах. В настоящее время Агентство по защите окружающей среды США (EPA) продолжает использовать тесты *in vitro* для оценки острой токсичности у рыб [23]. Одна из альтернатив, которая была описана в TETRATOX, использует рыбок *Tetrahymena*, как биологический маркер в оценке экологического риска загрязнения воды [27]. Биохимия и физиология *Tetrahymena* была изучена еще в 1950-х гг., и *Tetrahymena*, и особенно, *T.pyriformis*, широко используется с 1970-х гг. для определения токсичности в тестах воды. Более того, геномы организмов хорошо изучены. Популяция *T.pyriformis* растет в тесте быстро, инэкстенсивно и широко. Дан-

Таблица 3.

OECD TG для *in vitro* тестов на канцерогенность (по данным [28])

TG	Наименование и комментарий
471	Тест на профиль бактериальных мутаций. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Тест <i>in vitro</i> для точек мутаций. ^{*)} Альтернативный тест как часть общей стратегии тестирования.
472	Генотоксикология: <i>Escherichia coli</i> . Исследование не было валидировано. Принят 26.05.1983. Дата исключения 21.07.1997, метод поглощен TG 471.
473	Тест абберрации хромосом млекопитающих <i>in vitro</i> . Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Альтернативный тест, часть батареи тестов; он не полностью заменяет тесты <i>in vivo</i> .
474 ТнЖ ^{**)}	Тест микронуклеусов эритроцитов млекопитающих. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997. Снижено количество животных по сравнению с версией 1983 г., используется меньше животных.
475 ТнЖ	Тест абберрации хромосом костного мозга млекопитающих. Принят 26.05.1983. Подтвержден 21.07.1997.
476 ТнЖ	Тест мутации генов клеток млекопитающих <i>in vitro</i> . Принят 04.04.1984. Подтвержден 21.07.1997.
477	Генотоксикология: тест на летальность рецессивного гена пола у <i>Drosophila melanogaster</i> . Принят 04.04.1984. Альтернативный тест, так как мухи являются беспозвоночными. Замечание: Directive 86/609/ЕЕС определяет животных как любое живое нечеловекообразное позвоночное.
478 ТнЖ	Генотоксикология: Тест на летальность доминант грызунов. Принят 04.04.1984.
479	Генотоксикология: Исследование <i>in vitro</i> сестринских хроматоидных изменений в клетках млекопитающих. Принят 23.10.1986. Тест <i>in vitro</i> изменений ДНК между сестринскими хроматидами, определение генетической токсичности. ^{*)} Альтернативный тест является частью общей стратегии тестирования
480	Генетическая токсикология: <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , исследование генной мутации. Принят 23.10.1986. Тест <i>in vitro</i> генной мутации <i>Saccharomyces</i> . ^{*)} Альтернативный тест является частью стратегии тестирования.
481	Генетическая токсикология : <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , исследование митотических рекомбинаций. Принят 23.10.1986. Тест на генотоксичность <i>in vitro</i> митотических рекомбинаций у <i>Saccharomyces</i> . ^{*)} Альтернативный тест является частью общей стратегии тестирования.
482	Генетическая токсикология: повреждение и исправление ДНК, неописанный синтез ДНК в клетках млекопитающих <i>in vitro</i> . Принят 23.10.1986. Альтернативный тест является частью батареи тестов, он не полностью заменяет тест <i>in vivo</i> .
483 ТнЖ	Тест сперматогониальной абберрации хромосом млекопитающих. Принят 23.10.1986. Подтвержден 21.07.1997.
484 ТнЖ	Генотоксикология: тест мышинного пятна. Принят 23.10.1986.
485 ТнЖ	Генотоксикология: тест наследования транслокации у мышей. Принят 23.10.1986.
486 ТнЖ	Тест неописанного синтеза ДНК на клетках печени млекопитающих <i>in vivo</i> . Принят 21.07.1997.
487	Тест микронуклеусов <i>in vitro</i> . Планируется в новом руководстве. Альтернативный тест является частью батареи тестов; не полностью заменяет тест <i>in vivo</i> .

^{*)} Все тесты *in vivo* генетической токсикологии являются частью стратегии тестирования, которая проводится на животных только в случае необходимости (получения двусмысленных результатов)

^{**)} – ТнЖ = Тест на Животных

ные, полученные в TETRATOX демонстрируют высокую степень соответствия данным, полученным в исследованиях рыб. Последние годы интенсивно развиваются исследования на рыбах *Dario rerio* и телляпиях [40].

Другое обещающее исследование *in vitro* – исследование икры рыб [20, 33], которое показывает очень ранние стадии развития эмбриона при концентрациях изучаемой субстанции. Этот тест используется в настоящее время в Германии как замещающий рыб тест при оценке лекарств, БАВ и воды и может быть признан замещающим тестом во всех случаях использования рыб в тестах на острую токсичность.

Кроме того, тест ECOSAR (ecological structure-activity relationships), в моделях *in silico* при определении химической токсичности для организмов, живущих в воде, рекомендован к использованию в программе HPV руководством EPA [44]. Модель дает возможность предсказать эффекты ряда таксономических групп, включая рыб, беспозвоночных и водоросли, при изучении как острой, так и хронической токсичности [47].

Тест эмбриональных стволовых клеток (EST), валидированный ECVAM как тест для выявления эмбриотоксичности – определяет критические параметры и наличие развивающейся токсичности [11]. Тест использует стволовые клетки крыс, которые помещены в культуру и обладают способностью к дифференцированию. Эмбриотоксичность определяется по концентрации тестируемых химических веществ, необходимых для подавления 50% дифференциации, вместе с ростом ингибиции на 50% относительно контроля. Этот валидированный тест идеально подходит для немедленного использования как меры уменьшения на основном, скрининговом уровне программы типа EPA's HPV Challenge – где химические вещества, которые получили положительную оценку в тесте на эмбриотоксичность, должны быть классифицированы как вероятно развивающие токсичность без продолжения тестирования другими методами. Несмотря на то, что метод признан снижающим использование животных ввиду его высокого потенциала, который может спасти жизнь более чем 1300 животных, используемым в обычных пренатальных определениях развивающейся токсичности, в соответствии с OECD 414 [29], EPA и другие участвующие компании отказались использовать этот тест в программе HPV.

Клеточные линии человека и животных. Предлагаются методы оценки острой системной токсичности *in vitro*, включающие два основных метода определения цитотоксичности, с использованием обычных кератиноцитов человека NHK и клеточных линий фибробластов мышей Balb/c 3T3. Эти тесты являются наиболее подходящими

для немедленного использования как снижающая мера для вычисления стартовой дозы *in vivo* [17, 48]. Предполагается [39], что вследствие этого возможно снижение использования животных на 40%. EPA также рекомендует участникам программы [45] включать данный метод в программы определения острой токсичности. Тем не менее, исследователи часто игнорируют рекомендованные методы определения острой цитотоксичности методами *in vitro*, когда в тестах используют нетоксичные материалы [46].

Альтернативные батареи тестов

Впервые в нашей стране на *первом Съезде токсикологов* в 1987 году, председателем которого был избран автор этой статьи, была выделена самостоятельная секция по альтернативным методам моделирования. На секции были обсуждены возможности замены экспериментов на животных альтернативными методами при изучении механизмов токсического действия веществ и принята резолюция Съезда о разработке методических рекомендаций и их внедрении в научно-практическую деятельность учреждений и организаций страны.

Одной из основных проблем альтернативного моделирования является выбор правильной стратегии тестирования для новых химических веществ, по которым еще нет данных о потенциальной токсичности их молекул. Только некоторые исследования вносят новые данные в проблему поиска и валидации общепринятых методов. Исследования *in vitro* позволяют сформировать общую стратегию тестирования. Для этого необходима новая техника использования культур клеток, которая обеспечит уровень функционирования системы или органа в целом, что позволит вычленив в *in vitro*-моделях функциональные свойства *in vivo*-органа в целостном организме. Общепринятым подходом является использование нескольких параллельных исследований на клеточных культурах, которые условились обозначать как батарею тестов.

NB! Батарея тестов (test battery) представляет собой мультиметодическое использование серии тестов, проводимых обычно в одно и то же время или в тесной связи друг с другом. Каждый тест внутри последовательности строится для получения дополнительной информации от предыдущего и для измерения различий дополнительного многофакторного токсического эффекта.

Определение максимально толерантной дозы *in vitro* осуществляется на основе определения минимальной концентрации лекарств *in vitro*, которое приводит к изменениям в клеточной морфологии. Лактат дегидрогеназа (LDH) уменьшает или повышает до 50% смертность клеток (СТ₅₀), что

предполагает соответствие этой дозы лекарств дозе *in vivo*, которая дает повышение до первоначальных или слабых проявлений токсичности, до тех пор, пока минимальная концентрация лекарств *in vitro* не приведет к гибели более 90% клеток (СТ₁₀₀) и не будет соответствовать дозе *in vivo*, которая дает повышение маркированных клинических показателей. Значения СТ₅₀ и СТ₁₀₀ (мг/мл) трансформируются в мг/кг/день для порога *in vivo*.

Следует подчеркнуть, что первичные культуры гепатоцитов крысы более чувствительны, чем многие другие типы клеток, и используются для прогнозирования значений *in vivo* у собак. Клетки MDBK (почки крупного рогатого скота, телят) менее чувствительны и используются для получения прогнозируемых данных *in vivo* у крыс. Клетки McCoу эпителия человека служат в качестве контроля *in vitro*. Такие параметры роста и морфологии как площадь поверхности, занятая растущими линиями клеток, изменения в размерах и форме клеток, наличие цитоплазматических вакуолей, деление клеток, гибель и умирающие клетки, учитываются после экспозиции для гепатоцитов – 24 часа, для остальных клеточных линий – 24, 48 и 72 часа. Ниже мы приводим некоторые, наиболее распространенные, батареи тестов для альтернативного моделирования острой токсичности [12, 34, 35].

Тест A Hep G2 cell/protein content основан на использовании линии клеток гепатомы для тестирования субстанций. Цитотоксичность измеряется как изменение содержания белка по методу, описанному Lowry и др. [33]. Тест принят для использования в батарее тестов совместно с тестами B-D (см. ниже) или в комбинации только с тестом B, для уменьшения количества животных в опытах по изучению острой токсичности при применении препаратов *per os*. [44].

Этот статус валидации оценен в Multicentre Evaluation of *in vitro* Cytotoxicity (MEIC) – мульти-центр по оценке цитотоксичности *in vitro*, релевантности цитотоксичности тестов *in vitro* для оценки острой токсичности у человека. Результаты MEIC показали соответствие тестов, проведенных на клеточных культурах человека для определения базальной цитотоксичности. В батарею тестов для улучшения общих результатов моделирования, должны быть включены два вида тестов: тесты *in vitro*, имеющие соответствие по токсикотестике и тесты *in vitro*, целью которых является определение токсичности для органов. Тесты были разработаны для оценки летальных концентраций в крови человека и их, в противовес концентрации в крови, необходимо комбинировать с данными по поглощению в соответствии с предпо-

лагаемыми проверяемыми дозами. Тест осуществляется в течение 24 часов [44, 47].

Тест B HL-60/ATФ content основан на использовании указанных клеток острой миелолейкемии человека для тестирования субстанций. Содержание АТФ измеряют с помощью Lucifer-LU плюс оборудование для биолуминисценции из энзимной люцеферин-люцеферазной реакции [11]. Тест принят для использования в батарее тестов совместно с тестами A, C и D (см. ниже) или в комбинации только с тестом A. Тест разработан и оценен по программе MEIC для определения летальной концентрации в крови человека. Результаты, в противовес концентрациям в крови, должны быть рассмотрены в комбинации с данными по абсорбции в соответствии с прогнозированием управляемых доз. Тест осуществляется в течение 24 часов [47, 48].

Chang liver cell-mecm C основан на использовании клеток печени Chang'a, культивированных в запечатанных парафином чашках с 96 ячейками для микротитрования. Недостаток развития веретеновидных или веретенообразных клеток является критерием цитоингибирования. Культуры затем культивируются в течение 7 дней и используются в тесте D. Оценен по программе MEIC для использования в батареях тестов A, B и D. Тест разработан для оценки летальной концентрации в крови человека. Результаты должны быть рассмотрены, в противовес концентрациям в крови, в комбинации с данными по абсорбции в соответствии с прогнозированием управляемых доз [39, 47].

Тест D Chang cell/pH основан на использовании культуры из теста C. Через 168 часов цвет pH индикатора фенол красный, включенного в среду, записан. Фиолетовый цвет является показателем полного ингибирования, в то время как наличие небольшого количества основного красного, как и не являющегося нормальным оранжевого цвета говорят о частичном ингибировании. Используется в батареях тестов A, B и C.

Тест E BALB/c 3T3 (NRU) используется для определения цитотоксичности на изолированных клетках указанной линии мышей для испытания выживания и жизнеспособности, основанной на способности переживающих клеток окрашиваться нейтральным красным (NRU). NR аккумулируется в лизосомах. Изменения поверхности клетки является результатом снижения поглощения и связывания NR. Тест валидирован и широко распространен. Тест является альтернативой использования животных по определению острой токсичности средств, применяемых *per os*. [6, 18, 36, 37, 38].

Тест F NRU на линии человеческих кератиноцитов используется для определения цитотоксичности на изолированных клетках человека по пока-

зателям выживания и жизнеспособности, основанной на способности переживающих клеток окрашиваться нейтральным красным (NRU), с аккумуляцией в лизосомах. Тест валидирован, широко распространен и является альтернативой использования животных по определению острой токсичности средств, применяемых *per os*. Тест осуществляется в течение 48 часов [5, 13, 36].

Моделирование хронической токсичности

Следует сразу подчеркнуть, что на данном этапе развития научных исследований, оценка хронической токсичности и ее разновидностей возможна исключительно с использованием животных.

Токсикологический и канцерогенный потенциал химических веществ обычно определяют в последовательности экспериментов: *острую*, *подострую* (14 дней), *субхроническую* (90 дней) и *хроническую* (2 года) – на крысах и мышах обоих полов. В разных странах существуют требования проверки хронической токсичности на более крупных животных (кролики, кошки, собаки, мини-свиньи). Следует также отметить, что *подострая* и *отчасти субхроническая* токсичность являются в определенной степени лукавством в целях замены или замещения полноценных исследований хронической токсичности. Необходимы четкие рекомендации и регламентации, определяющие эти подтипы хронической токсичности. Пока их нет.

Общепринято, что уровни доз для 14-дневного эксперимента по токсичности обычно оцениваются по данным литературных источников, если такие существуют. Информация о токсичности из 14-дневного эксперимента используется для выбора доз для 90-дневного опыта. Протокол 14-дневного эксперимента включает 5 доз и контрольные группы, по 5 животных в группе каждого пола и вида. Всего используют 120 животных на опыт. В настоящее время, в дополнение к очистке текущих протоколов тестирования, оцениваются потенциальные методы тестирования *in vitro* для частичного или полного отказа от 14-дневных изучений токсичности, особенно для химических веществ, где используется процедура нанесения на кожу. В исследовании *in vitro* с использованием EpiDerm™ для оценки раздражения кожи, используют нейтральный красный NRU для оценки системной токсичности и используют цитотоксичность на первичных гепатоцитах крыс для оценки гепатотоксичности. Обычно тесты EpiDerm и NRU дают хорошую оценку, соответствующую тестам *in vivo*. Однако необходимо большое количество баз данных для принятия окончательного решения соответствия результатов *in vitro* результатам *in vivo*.

NB! Хроническая токсичность – это токсич-

ность, изучаемая на моделях функциональных и морфологических нарушений у экспериментальных животных при применении веществ от 6 до 12-18 мес.

Более полно хроническую токсичность можно определить как последовательность дисфункций или прогрессивно ухудшающихся функций клеток, органов или систем множественных органов, в результате длительного воздействия химических веществ. Предложены реперные точки эксперимента и разрабатывается интегрированный подход к тестированию, основанный на альтернативных методах при наличии моделей *in vitro*. Определены пять наиболее общих мишеней токсичности для оценки повторяющихся доз: *печень, почки, ЦНС, легкие и гематопозитическая система*.

NB! Модели подострой и субхронической токсичности не являются самостоятельными моделями или отдельными видами исследований, а отображают нечто типа «предхронической» токсичности, в оценке безопасности лекарств.

Разработанные методы используются сегодня на всех исследовательских уровнях, но ни один не может быть назван идеальным для оценки любой цели оценки токсичности органов. Необходимо предпринять попытки оптимизировать существующие модели и найти соответствующие модели *in vitro* в этих случаях, когда имеется несколько моделей, например, для легких, печени и так далее. В общем случае рекомендуется провести дополнительное исследование для обеспечения лучшего понимания патогенеза хронических болезней. Необходимы дополнительные попытки необходимы для оценки NOEL (no observable adverse effect level) отсутствия у рассмотренных уровней побочных эффектов *in vitro*. Требуется большое число исследований и подтверждений оценок применения подходов моделей QSAR для установления хронической токсичности и для включения их в батарею тестов и стратегию рядов. Для валидации существующих и вновь разработанных альтернативных моделей понадобится, по-видимому, не менее 10 лет, а достижение полной замены животных в регулярных тестах и стратегиях зависит от уровня исследований, адекватной расстановки приоритетов, попыток установления и координации действий ученых разных стран [52].

Токсикокинетика

Фармакокинетика и токсикокинетика описывает кинетические процессы накопления, распределения лекарств и ксенобиотиков, метаболизма и выведения составляющих из организма. В последние годы предложены [8] принципиально новые подходы, основанные на тестах в моделях *in vitro* и *in silico* и включающие три ряда. Это гибридизированный подход, включающий в себя

моделирование на животных и использование альтернативных методов. Ряд 1 должен оценить состав компонент, ряд 2 должен определить распределение составляющих и ряд 3 должен определить токсический потенциал составляющих. Только когда будет получен положительный ответ в ряду 1, можно переходить к ряду 2. Ряд 1 должен включать батарею тестов для оценки дермальной, оральной и пульмональной абсорбции [14].

Необходимо продолжение исследований и попыток развития альтернативных методов, охватывающих процедуру ингаляции, как хорошо проработанную модель интестинального барьера. Ряд 2 должен включать батарею тестов для оценки уровня плазмы, выделения, биоаккумуляции и биотрансформации (метаболизма). Необходимо продолжать исследования моделей выведения *in vitro* и *in silico* для использования внутри набора тестов, которые необходимо также идентифицировать. Было найдено недостаточное количество подходящих тестов для изучения или измерения биоаккумуляции составляющих, и было рекомендовано продолжение исследований в этой области. Прогресс в этой области может быть ограничен развитием стратегий тестов *in vitro* для регуляторного использования, будет зависеть от адекватной расстановки приоритетов, попыток установления основных и координационных моментов директивными или иными государственными органами.

Стратегии токсикопротеомики

Предпосылками для многозначных токсикопротеомических стратегий являются фракционные методы для функциональных субпротеом, плотных функционалов и дифференциальный физиологический контроль материала клеточной культуры или модели животных, использованных как субстрат протеинового анализа. Это трудоемкий, сложный, но перспективный путь, указывающий, как из многих тысяч протеиновых пятен, определенных из заданного биологического объекта, может быть отобрано, идентифицировано и валидировано небольшое число критических суррогатных биомаркеров, основанное на количественном дифференциальном протеиновом представлении.

Метод, которым можно получить достаточное разрешение, — это двухмерный полиакриламидный электрофорез (2D-PAGE). Альтернативные методы, такие как жидкостная хроматография в непосредственной связи с масс-спектрометрией (LC-MS) или основанное на чипах разделение на фракции в совокупности с масс-спектрометрией, или может только разложить несколько тысяч протеиновых или пептидных видов, или может разбавить критические примеры информации, сфокусировав внимание на ясных и нерепрезентатив-

ных пептидных видах во многих возможных посттрансляционных изоформах, появляющихся из заданной мРНК, т.е. определенные цистеин-содержащие пептиды.

Воспроизведение 2D-геля, программное обеспечение для анализа пятен и ряд стандартных методов определения протеинов в 2D-гелях позволят разработать количественное и дифференциальное протеиновое представление, полученное специальными методами с радиоактивными метками и последующим применением подходящих технологий. Идентификация точной молекулярной информации, относящейся к механизмам, лежащим в основе токсических и побочных эффектов лекарственных действий составляет суть стратегии токсико-протеомики.

В результате достижений геной инженерии, всестороннего анализа протеинов, развития протеомики понятно, что физиологическая деятельность означает динамику, многомерное взаимодействие миллионов различных белковых молекул внутри системы с высочайшей организацией и корреляцией. Изучение и сокращение этой неисчислимой сложности позволяет надеяться на скрининг новых лекарственных форм, изучение воздействия и молекулярной токсикологии [31]. Это всегда требует точных знаний специфических ключевых белковых изоформ со специфическими посттрансляционными модификациями, очень часто со специфической кинетикой и контекстными взаимодействиями молекул.

Прямой анализ природной молекулярной архитектуры и взаимодействия является критическим для развития инновационных лекарств, валидации и оптимизации, т.к. циклы выражения мРНК и протеинов весьма ограничены [15]. Причиной является динамическое изменение посттрансляционных модификаций, которые определяют функции, т.е. различные фосфорилирующие состояния рецепторов или энзимов, а также такие кинетические аспекты, как время жизни протеинов, закодированное в их относительных N-терминальных аминокислотах. Представления, основанные на скрининге пропускной способности генов или РНК в развитии лекарств и валидации, также как рекомбинантный протеомный подход, начинают использоваться лишь в последнее время.

Метаболические, физиологические и патофизиологические взаимодействия весьма гибкие, а значит действие лекарственных средств зависит от столь тонких и сложных условий на уровне белка, что очевидно только прямой и всесторонний анализ переноса природных протеинов обеспечит перспективы достоверного и соответствующего скрининга.

Огромные и динамически сложные протеино-

вые изоформы могут быть реально уменьшены до нескольких ключевых суррогатных биомаркеров с адекватным количественным и дифференциальным анализом протеиновых объектов [32]. 2D-PAGE обеспечивает качественную технику анализа объектов, а точную информацию о молекулах получают с помощью автоматической масс-спектрометрии. Это открывает перспективы для всестороннего понимания молекулярного уровня лекарств [16] или их составляющих в действии, также как улучшение качества и скорости данных, полученных из моделей *in vitro*, т.е. модели эмбриональных стволовых клеточных культур человека. Эти модели могут быть использованы для создания весьма соответствующих и быстрых «рецептов протеиновых изоформ» для условий цитотоксичности, относительной клеточной пролиферации и скрининга лекарств.

Компьютерное моделирование токсичности

Современные методы математического моделирования позволили разработать компьютерные программы для прогноза ожидаемой токсичности, а также эффектов воздействия на здоровье человека. Эти компьютерные программы получили обобщенное название *модели количественных соотношений между структурой и активностью* (Quantitative Structure-Activity Relationship – *QSAR models*).

Модель TOPKAT для изучения на крысах пероральных препаратов содержит 19 моделей QSAR, данные из этих моделей были получены для обработки экспериментальных данных по летальным дозам (LD_{50}) на основе оценки 4000 химических веществ. Каждая *количественная модель определения структуры токсичности QSTR* оценивает LD_{50} для крыс по пероральным препаратам для определенного набора химических средств. Модель TOPKAT для изучения на крысах препаратов, применяемых в виде ингаляций, содержит 5 моделей QSAR, и данные по всем этим моделям были получены в эксперименте по *средним летальным концентрациям* LC_{50} для почти 650 химических веществ. Были учтены время проведения эксперимента 0,5-14 часов, время окончания эксперимента представляется в логарифмической шкале, а концентрация C в mol/m^3 . Хими-

ческие вещества были сгруппированы в 5 классических моделей: простые бензолы; гетероароматические и сложные бензолы; алициклы; ациклы с галогенами; и ациклы без галогенов. Каждая QSTR-модель оценивает острую LC_{50} для крыс по специфическому классу химических веществ в единицах $mol/m^3/час$. [52].

Несмотря ни на что...

В Отчете международного семинара по методам *in vitro* для оценки системы острой токсичности (Report of the International Workshop on *in vitro* Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity [14]) указывается, что для оценки острой токсичности нет необходимости проводить тесты для выявления всех специфических эффектов по влиянию на органы в моделях *in vitro*. Вместо этого, может быть достаточно провести тестирование энергетического метаболизма и способности химических веществ нарушать функции эпителиального барьера. Кроме того, не существует методов *in vitro* для прогноза острой токсичности в опытах с ингаляциями, хотя некоторые модели в настоящее время находятся на стадии развития.

В настоящее время не существует подходящих альтернативных методов для оценки биокинетических факторов, а также токсико- и фармакокинетики. Эти методы необходимо использовать в комбинации с альтернативными методами определения точек окончания эксперимента, в соответствии со стратегией развития схем альтернативных методов для систематизации определения точек окончания эксперимента, включая острую токсичность. Таким образом, на современном этапе развития науки вообще и токсикологии в частности использование любых альтернативных методов исследования, исключающих использование животных-моделей, не может приводить к искомому результату достоверности и корректности проводимых исследований в области лекарственной токсикологии, безопасности ксенобиотиков и любых иных биологически активных веществ. Стандартизованные модели могут дополняться альтернативными, но даже комплексная оценка токсикологических рисков, выявленных на животных, не обязательно может наблюдаться у человека. Прогресс в данном направлении видится в дальнейшем развитии токсикогеномики и токсикопротеомики.

Литература

1. Каркищенко Н.Н. (2004) Основы биомоделирования. – М.: Изд-во ВПК. – 608 с.
2. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ / Под общей редакцией чл.-корр. РАМН, проф. Р.У.Хабриева. – 2-изд., перераб. и доп (2005). – М.: ОАО Издательство «Медицина». – 832 с.
3. Balls M. & Fentem J.H. (1993). The on-going process to replace the LD50 test. // *Human Innovations and alternatives* 7, 544-547.
4. Balls M. (1991). Why modification of the LD50 test will not be enough. // *Laboratory Animals* 25, 198-206.
5. Borenfreud E., Puerner J. (1984). A simple quantitative procedure using monolayer cultures for cytotoxicity assays (HTD/NR-90). // *Journal of Tissue Culture Methods* 9, 7-9.
6. Borenfreud E., Puerner J. (1985). Toxicity determination in vitro by morphological alternations and neutral red absorption. // *Toxicology Letters* 24, 119-124.
7. Clemedson C., McFarlane-Abdulla E., Andersson M., Barile F.A., Calleja M.C., Chesné C., Clothier R., Cottin M., Curren R., Daniel-Szolgay E., Dierickx P., Ferro M., Fiskesjö G., Garza-Ocasas L., Gómez-Lechón M.J., Gulden M., Isomaa B., Janus J. et al. (1996) MEIC evaluation of acute systemic toxicity: Part I. Methodology of 68 in vitro assays used to test the first 30 reference chemicals. // *ATLA* 24, 251-272.
8. Dierickx P. (1989). Cytotoxicity testing of 114 compounds by the determination of the protein content in Hep G2 cell cultures. // *Toxicology in Vitro* 3, 189-193.
9. Executive Summary. // *ATLA* 33, Suppl. 1, 7-18, 2005.
10. EEC (1967) Council Directive 67/548/EEC of 27 June 1967 on the approximation of laws, regulations and administrative provisions relating to the classification, packaging and labeling of dangerous substances. // *Official Journal of the European Economic Community* 196, 1-98.
11. Genshow E., Spielmann H., Scholz G., Seiler A., Brown N., Piersma A., Brady M., Clemann N., Huuskonen H., Paillard F., Brmer S., Becker K. (2002) The ECVAM international validation study on in vitro embryotoxicity tests: results of the definitive phase and evaluation of prediction models. // *ATLA* 30, 151-176.
12. Gribaldo L., Gennari A., Blackburn K., Clemedson C., Deguercy A., Meneguz A., Pfaller W., Ruhdel I. Acute Toxicity. // *ATLA* 33 Suppl. 1, p.27-34, 2005.
13. Heimann R., Rice R.H. (1983). Polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity and induction of metabolism in cultivated esophageal and epidermal keratinocytes. // *Cancer Research* 43, 4856.
14. ICCVAM (2001). Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity, NIH Publication No. 01-4499, 370pp. Research Triangle Park, NC, USA: NIEHS. Website <http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/finalall.pdf> (Accessed 10.2.05).
15. Jansen R.C., Nap J.P., Mlynarova L. (2002). Errors in genomics and proteomics. // *Nature Biotechnology* 20, 19.
16. Kangas L., Gronroos M., Nieminen A.L. (1984). Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluation cytotoxicity agents in vitro. // *Medical Biology* 62, 338-343.
17. Liebsch M., Curren R., Fentem J. (2001). Guidance Document on Using In Vitro Data to Estimate In Vivo Starting Doses for Acute Toxicity. NIH Publication 01-4500. Web site http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/guidance/iv_guide.pdf. Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences (Accessed 8.10.02).
18. Liebsch M., Spielman H. (1995). Balb/c 3T3 cytotoxicity test. In *Methods and Molecular Biology*, Vol. 43, In Vitro Toxicity testing Protocols (ed. S.O'Hare, C.K. Atterwill), pp. 177-187. Totowa, NJ, USA: Humana Press.
19. Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent title. // *J of Biological Chemistry* 193, 265-275.
20. Nicholson A., Sandler J., Seidle An evaluation of the US High Production Volume (HPV) Chemical-testing Programme: A Study in (Ir)Relevance, Redundancy and Retro Thinking. // *ATLA* 32, Suppl. 1A, 335-341, 2004.
21. OECD (1987). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 401: Acute Oral Toxicity (Deleted in 2002), 7pp. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
22. OECD (1995). Guidance Document for the Development of OECD GuideLines for Testing of Chemicals. Environmental Monographs No. 76, OECD, Paris, 1993, reprinted 1995. 28pp. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development. Website http://www.oecd.org/document/30/0,2340,en_2649_34377_1916638_1_1_1_1,00.html (Accessed 30/09/04).
23. OECD (2000). Environmental Health and Safety Monograph Series on Testing and Assessment No. 19: Guidance Document on the Recognition Assessment and Use of Clinical Signs as Human Endpoints for

- Experimental Animals Used in Safety Evaluation, 39pp. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
24. OECD (2001). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 420: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure, 14pp. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
25. OECD (2001). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 423: Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method, 14pp. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
26. OECD (2001). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals No. 425: Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure, 26pp. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
27. OECD (2004). Draft Test Guideline on Acute Toxicity – Fixed Dose Procedure, 24pp. Paris, France: Organization for Economic Cooperation and Development.
28. OECD Guidelines for the testing of Chemicals. // *ATLA* 33, Suppl. 1, 223-227, 2005.
29. Organization for Economic Cooperation and Development (2002). OECD Guidelines for the testing of Chemicals. Paris, France: OECD.
30. Prieto P., Clemenson C., Meneguz A., Pfaller W., Sauer U.G., Westmoreland C. Subacute and Subchronic Toxicity. // *ATLA* 33, Suppl. 1, 109-116, 2005.
31. Schrattenholz A. (2004). Proteomics: how to control highly dynamic patterns of millions of molecules and interpret changes correctly? *Drug Discovery Today – Technologies* 1.
32. Schrattenholz A., Klemm M., Cahill M. Potential of Comprehensive Toxicoproteomics: Quantitative and Differential Mining of Functional Proteoms from Native Samples. // *ATLA* 32, Suppl. 1A, 123-131, 2004.
33. Schulte C., Nagel R. (1994). Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results. // *ATLA* 22, 12-19.
34. Shrivatsava R., Delomenie C., Chevalier A., et al. (1992). Comparison of in vivo acute lethal potency and in vitro cytotoxicity of 48 chemicals. // *Cell Biology and Toxicology* 8, 157-170.
35. Shrivatsava R., John G.W., Rispat G., et al. (1991). Can the in vivo maximum tolerated dose be predicted using in vitro techniques? A working hypothesis. // *ATLA* 19, 393-402.
36. Spielman H., Genshow E., Liebsch M., Halle W. (1999). Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the Up and Down Procedure (UDP) from cytotoxicity data. // *ATLA* 27, 957-966.
37. Spielman H., Liebsch M. (1992). INVITOX Protocol No. 46: Balb/c 3T3 NRU Cytotoxicity Test. European Commission DG-JRC, ECVAM, SIS Database. Web site <http://ecvam-sis.jrc.it> (Accessed 30.9.04).
38. Spielman H., Liebsch M., Kalweit S., et al. (1996). Results of a validation study in Germany in two in vitro alternatives to the Draize eye irritation test, the HET-CAM test and the 3T3 NRU cytotoxicity test. *ATLA* 24, 741-758.
39. Spielmann H., Genshow E., Liebsch M., Halle W. (1999) Determination of the starting dose for acute oral toxicity (LD50) testing in the Up and Down Procedure (UDP) from cytotoxicity data. // *ATLA* 27, 957-966.
40. Schulte C., Nagel R. (1994). Testing acute toxicity in the embryo of zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results. // *ATLA* 22, 12-19.
41. Sweden O. 3-rd European congress of toxicologic pathology, 2005, Copenhagen, Denmark.
42. Trevan J.W. (1927). The error of determination of toxicity. *Proceedings of the Royal Society (London)*. Series B 101, 483-514.
43. United Nations Economic Commission for Europe (UN/ECE) (2003). Globally Harmonised System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS), 6pp. New York, NY, USA, and Geneva, Switzerland: United Nations.
44. US Environmental Protection Agency (2000). The Use of Structure-Activity Relationships (SAR) in the High Production Volume Chemical Challenge Programme. Washington, DC, USA: US EPA (Accessed 8.12.02).
45. US Environmental Protection Agency (2001). Supplemental Acute Toxicity Protocol. Web site <http://www.epa.gov/chemrtk/toxprtel.htm>. Washington, DC, USA: EPA (Accessed 8.12.02).
46. US Environmental Protection Agency (2002). Chemical Right to Know. Web site <http://www.epa.gov/chemrtk/viewrsch.htm>. Washington, DC, USA: EPA (Accessed 8.12.02).
47. US Environmental Protection Agency (2002). Ecological Structure Activity Relationships. Web site <http://www.epa.gov/opptintr/newchems/21ecosar.htm>. Washington, DC, USA: EPA (Accessed 8.12.02).
48. US National Toxicology Program Interagency Committee for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (2001). Report of the International Workshop on In Vitro Methods for Assessing Acute Systemic Toxicity, 389pp. NIH Publication 01-4499. Web site http://iccvam.niehs.nih.gov/methods/invidocs/guidance/iv_guide.htm. Research Triangle Park, NC, USA: National Institute of Environmental Health Sciences

(Accessed 8.10.02).

49. Van der Heuvel, M.J., Clark, D.G., Fielder, R.J., Koundakjian, P.P., Olivier, G.J.A., Pelling, D., Tomlinson, N.J., & Walker, A.P. (1990). The international validation of a fixed-dose procedure as an alternative to the classical LD50 test. // *Food and Chemical Toxicology* 28, 469-482.

50. Wakuri S., Izumi J., Sasaki K., Tanaka N., Ono H. (1993). Cytotoxicity study of 32 MEIC chemicals by colony formation and ATP assays. *Toxicity in Vitro* 7,

517-521.

51. Zbinden G. & Flury-Roversi M. (1981). Significance of the LD50 test for the toxicological evaluation of chemical substances. // *Archives of Toxicology* 47, 77-99.

52. Zuang V., Alonso M.A., Botham P.A., Eskes C., Fentem J., Liebsch M., Johannes J.M. van de Sandt Skin Irritation and Corrosion. // *ATLA* 33, Suppl. 1, 35-46, 2005.

Classic and alternative models in drug toxicology

N.N.Karkischenko

Research Center for Biomedical Technologies of RAMS, Moscow

Key words: toxicology testing, acute and chronic toxicity, alternative toxicology models, toxicokinetics, toxicogenomics, toxicoproteomics, reproductive and juvenile toxicology.

Genetically proved and experimental models for evaluation of acute and chronic toxicity of pharmacology means, toxical influence of xenobiotics, special means of protection were done. There are standard and alternative models for evaluation of acute and chronic toxicity, alternative test batteries and the basis strategies of toxicokinetics, toxicoproteomics, toxicogenomics and some computer models of toxicity in this issue.