

## Методические подходы к оценке нейротоксичности фармакологических веществ

М. Н. Макарова, В. Г. Макаров, Е. В. Шекунова

Закрытое акционерное общество  
«Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ»,  
188663, Российская Федерация, Ленинградская обл., Всеволожский район,  
г.п. Кузьмолровский, ул. Заводская, д. 3, к. 245

Статья поступила 18.04.2017 г. Принята к печати 29.05.2017 г.

**Резюме:** В статье рассмотрены методические подходы к оценке нейротоксичности фармакологических веществ. Описана основная батарея тестов на животных, проводимая до начала клинических исследований для оценки влияния препарата на функцию жизненно-важных систем организма. Рассмотрены такие аспекты, как выбор вида животных, выбор дозы и длительность введения фармакологического вещества, проведение клинического обследования, функциональных тестов и гистологических исследований. Отмечено, что правильное обоснование программы исследования может позволить существенно сократить перечень исследований. Обоснована целесообразность использования не менее двух видов животных для оценки нейротоксичности, с обязательным использованием не грызунов, результаты которой позволяют в максимально возможном объеме в ходе доклинических исследований изучить профиль безопасности лекарственного препарата и обеспечить необходимый уровень безопасности для человека при переходе на I фазу клинических исследований.

**Ключевые слова:** нейротоксичность; нервная система; координация движений; сенсорные реакции; когнитивные функции; фармакологическая безопасность; лабораторные животные.

**Библиографическое описание:** Макарова МН, Макаров ВГ, Шекунова ЕВ. Методические подходы к оценке нейротоксичности фармакологических веществ. Вестник Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2017; 7(2): 111–116.

Согласно современным требованиям, неотъемлемой частью изучения безопасности оригинальных (референтных) лекарственных препаратов являются исследования фармакологической безопасности. До начала клинических исследований необходимо провести так называемую основную батарею тестов и оценить влияние препарата на функцию жизненно-важных систем организма: центральную нервную, сердечно-сосудистую, дыхательную. В случае получения какой-либостораживающей информации, проводят «последующие» исследования для углубленного изучения выявленных эффектов [1–4].

При оценке токсикологических характеристик фармакологических веществ одним из важнейших аспектов является оценка потенциальных нейротоксических эффектов. Многие современные высокоэффективные фармакологические вещества, такие как цитостатики, антибактериальные препараты, местные анестетики, диссоциативные анестетики, препараты лития, антипсихотические препараты, нестероидные противовоспалительные препараты и другие индуцируют клинически значимые, зачастую дозозависимые проявления нейротоксичности, которые требуют модифицирования доз, отсрочки очередных циклов или прекращения лечения.

Отчасти при изучении острой или хронической токсичности уже происходит первоначальная оценка наличия/отсутствия нейротоксичности у тестируемого вещества, и при наличии наблюдений, связанных с влиянием на центральную или периферическую нервную систему, необходимо провести углубленное изучение этих эффектов. Также исследование нейротоксичности необходимо проводить в тех случаях, когда механизм действия тестируемого вещества прямо или косвенно связан с влиянием на нервную ткань, или химическая структура тестируемого веще-

ства позволяет предположить у него наличие нейротоксических свойств.

Также необходимо учитывать, что тестируемые фармакологические вещества могут влиять на несколько органов/тканей мишеней, по разным механизмам действия, а поскольку ни один из тестов не способен дать полную информацию о нейротоксическом действии, целесообразно использовать также биохимические, гистологические и другие методы оценки.

Исследования основной батареи тестов предпочтительно проводить на животных, находящихся в свободном состоянии (ненаркотизированных и неиммобилизованных). Для оценки влияния препарата на функцию центральной нервной системы (ЦНС) используют тест Ирвина (модифицированный тест Ирвина) [5, 6] или функциональные наблюдательные тесты (Functional Observation Battery, FOB) у мелких грызунов. Это позволяет получить информацию о влиянии препарата на следующие параметры:

- автономные — слюноотечение, слезотечение, пилоэрекция, аномальное мочеиспускание и/или дефекация, аномальное дыхание, диаметр зрачка, ректальная температура;

- сенсорно-моторные — реакция на прикосновение (реакция ушной раковины), пальцебральный рефлекс, рефлекс на звуковой раздражитель, пинетальный рефлекс, установочный рефлекс;

- нейромышечные — постуральные реакции, реакция Штраубе, тонус тела, птоз, экзофтальм, сила сцепления, сгибательный рефлекс, тремор, судороги;

- поведенческие (этологические) — возбуждение, уровень спонтанной активности, вокализация, агрессивность, обнюхивание, груминг, расчесы, вставание на задние лапы, стереотипия, странное поведение.

На основании проведенных исследований составляют отчет, результаты также должны быть включены в Брошюру исследователя.

Последующие исследования влияния препарата на ЦНС не являются строго обязательными, их дизайн зависит от выявленных негативных эффектов препарата.

### ВЫБОР ВИДА ЖИВОТНЫХ

Различные виды животных имеют разный по выраженности ответ на введение нейротоксикантов. Для изучения нейротоксичности обычно используют крыс, хотя при определенном обосновании могут использоваться и другие виды животных.

Так, для оценки нейротоксичности ингибиторов ацетилхолинэстеразы (АХЭ), целесообразно использовать кур, поскольку у кур и человека под влиянием этих препаратов происходят схожие гистопатологические изменения и развиваются однотипные neuropathies. Также удобной моделью для этих целей являются морские свинки [7], особый интерес здесь представляет отсроченная нейротоксичность для плода во время беременности [8]. В целом же морские свинки (*Cavia porcellus*) в качестве модели для изучения нейротоксичности используются по двум основным причинам: имеются их сходство с людьми с точки зрения развития мозга до рождения [9] и выраженная чувствительность холинергической системы морских свинок к ингибиторам АХЭ [10, 11].

При изучении картины интоксикации под влиянием атипичных нейролептиков у крыс в дозе, в 2,5 раза превышающей высшую терапевтическую дозу (ВТД), мы наблюдали парадоксальную реакцию на введение препаратов (в виде агрессивного поведения) [12], что может быть связано с быстрым увеличением плотности дофаминовых рецепторов, особенно D2- и D4-рецепторов, под влиянием атипичного нейролептика, что показано для этого вида животных [13].

Кролики зарекомендовали себя как биологический объект, наиболее слабо реагирующий на введение антипсихотических препаратов. В основном их реакция заключалась в выраженном угнетении поведения и вегетативных реакциях, даже при введении дозы, в 3,2 раза превышающей ВТД. Выраженность вегетативных реакций снижает привлекательность кроликов как биологического объекта для изучения безопасности антипсихотических препаратов [12].

В отличие от крыс, у карликовых свиней типичная картина интоксикации наблюдается на протяжении всего периода введения антипсихотических препаратов (в дозе, в 3 раза превышающей ВТД) и напоминает симптомы побочных эффектов у человека [12].

В целом вопрос использования карликовых свиней для изучения эффектов антипсихотических препаратов широко обсуждается в научной литературе. Этот вид лабораторных животных на сегодняшний день признают весьма перспективным, так как карликовые свиньи отображают большее фармакологическое сходство с человеком, нежели грызуны [14, 15]. Рядом исследователей установлено, что эффективность и побочные эффекты психоактивных лекарственных препаратов, наблюдаемые у карликовых свиней, отсутствуют у грызунов [16, 17].

### ВЫБОР ДОЗЫ И ДЛИТЕЛЬНОСТЬ ВВЕДЕНИЯ

Выбор доз должен осуществляться с учетом любых полученных ранее данных о токсичности и фар-

макокинетики для тестируемого препарата или родственных соединений. Максимальный уровень дозы должен предположительно вызывать нейротоксическое действие или очевидные токсические эффекты. В идеальном случае дозы должны быть подобраны таким образом, чтобы можно было отличить общесоматическую токсичность от влияния на нервную систему. При тестировании с предельной дозой минимальная доза должна быть не менее 1000 мг/кг массы тела/сутки при парентеральных путях введения, и не менее 2000 мг/кг при пероральном введении, которые не должны вызывать очевидного нейротоксического действия. Приведенные дозы являются базовыми для любых токсикологических исследований [18–20]. В случае изучения острой токсичности тестируемое вещество вводят однократно или дробно через короткие интервалы в течение суток. При исследовании подострой или хронической токсичности тестируемое вещество экспериментальным животным вводят семь дней в неделю в течение не менее 21–28 дней. Использование пятидневного режима дозирования или более короткого периода введения должно быть обосновано. При проведении основной батареи тестов в рамках изучения фармакологической безопасности, как правило, используют однократное введение препарата, начиная с доз терапевтического диапазона.

### КЛИНИЧЕСКИЙ ОСМОТР

Подробное клиническое обследование должно проводиться вне клетки содержания на стандартной площадке или в «открытом поле».

Клиническое обследование обычно включает: изучение изменений кожи, шерсти, глаз, слизистых оболочек, появление выделений, экскрементов и вегетативной активности (например, слезотечение, piloerection, изменение размеров зрачка и др.).

Также необходимо регистрировать любые необычные результаты в отношении положения тела, уровня активности и координации движений. Изменения в походке (например, раскачивающаяся походка, атаксия), позы (например, прогиб в спине) и реакции на раздражители окружающей среды, а также наличие клонических или тонических судорог и дрожи, стереотипии, аномальное поведение или агрессия должны быть зарегистрированы. Также необходимо оценить потребление пищи и воды животными, при продолжительных исследованиях (более 14 дней) необходимо проводить офтальмологический осмотр.

### ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ТЕСТЫ

Функциональные тесты должны включать в себя проверку сенсорной реакции на раздражители различных модальностей, например, слуховые, зрительные и проприоцептивные раздражители [21–23], оценку силы сцепления конечностей [24] и оценку двигательной активности животных [25].

Также для оценки поражения могут быть использованы электрофизиологические методы исследования.

### ГИСТОЛОГИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

Гистологическое исследование должно быть проведено для всех отделов центральной и периферической нервной системы: передний мозг, центральный отдел головного мозга, в том числе гиппокамп, средний мозг, мозжечок, варолиев мост, продолговатый

мозг, глаза, зрительный нерв, сетчатка, спинной мозг на уровне шейного и поясничного отделов, дорсальные корешковые ганглии, волокна дорсального и вентрального корешков, проксимальный конец седалищного нерва, проксимальный конец большеберцового нерва и ветви большеберцового нерва в икроножных мышцах. Спинной мозг и отделы периферической нервной системы должны быть представлены в виде крестовых или поперечных и продольных срезов. Необходимо уделить внимание сосудам нервной системы. Также необходимо обследовать образец скелетных мышц, особенно икроножных мышц. Особое внимание уделяют тем участкам центральной и периферической нервной системы, на которые предположительно действует нейротоксикант.

Клинические признаки могут также свидетельствовать о необходимости оценки других тканей или использования специальных процедур окрашивания [26, 27]. Также при гистологическом исследовании могут быть использованы специальные красители для демонстрации конкретных видов патологических изменений [28].

**Исследования на курах.** Обычно используют молодых самцов кур в возрасте 6 месяцев, одной породы. Для оценки неврологического статуса птиц может быть использована широко применяемая классификация [29–31], описывающая четыре стадии неврологических расстройств у кур:

1 стадия — умеренная атаксия, проявляется медленной, неуклюжей и неустойчивой походкой;

2 стадия — грубая атаксия, походка также медленная, неуклюжая, вразвалочку, но птица еще активна. Часто наблюдаются шатание и падение;

3 стадия — легкий паралич, курица сохраняет типичную позу, сидя на ягодицах, расставив ноги и пригнув голову. Курица может передвигаться с помощью взмаха крыльев;

4 стадия — тяжелый паралич, птица не в состоянии сохранять позу.

**Исследования на морских свинках.** Введение исследуемых веществ осуществляется взрослым морским свинкам или пренатально [6]. Введение тестируемых объектов в случае использования взрослых животных может осуществляться 21 или 28 суток. Обычно этого периода введения хватает для развития нейропатологии, однако введение можно осуществлять также более длительно, например, 3, 6 или 12 месяцев, в зависимости от длительности планируемого применения в клинических условиях.

При изучении отсроченной нейротоксичности, проявляющейся у потомства, введение тестируемых объектов осуществляют на 50-й день беременности и продолжают ежедневно в течение десяти дней.

Введение с 50-го дня беременности используется, поскольку этот срок у морских свинок совпадает с периодом бурного роста головного мозга (~50 день внутриутробного развития) и периодом быстрой миелинизации (~60 день внутриутробного развития) [32]. Человек и морские свинки являются выводковыми видами, у которых развитие мозга большей частью происходит до рождения. Для сравнения, крысы и мыши демонстрируют послеродовой всплеск роста головного мозга [9]. Морские свинки и человек также имеют более низкие уровни циркулирующих в крови карбоксиэстераз, которые гидролизуют ацетилхолин, по сравнению с высокими уровнями, обнаруженными у крыс и мышей [10, 11].

Нейротоксичность у морских свинок оценивают по клиническому осмотру и функциональным тес-

там, чаще всего используют водный лабиринт Морриса [33, 34].

**Исследования на крысах или мышах.** Исследования на крысах лучше начинать как можно раньше после прекращения грудного вскармливания, обычно используют животных от шести- до девятинедельного возраста.

При изучении отсроченной нейротоксичности, проявляющейся у потомства, введение тестируемых объектов осуществляют беременным самкам как минимум ежедневно с момента имплантации (6 день беременности) и во время лактации (21 день молочного периода), что будет у крыс соответствовать пренатальному и раннему постнатальному росту головного мозга человека. Введение препарата также может начаться с начала беременности, но в этом случае должно учитываться, что некоторые вещества могут вызвать гибель зародыша до имплантации.

У животных, подвергнутых исследованию во взрослом возрасте, могут быть изучены следующие показатели: клинические наблюдения и масса тела, подробные клинические наблюдения, двигательная активность, сенсорная активность, обучение и память, вес мозга, гистологические исследования.

Оценку нейротоксичности проводят на основании клинического осмотра и батареи функциональных тестов [35, 36]. Обычно оценивают уровень спонтанной активности, реактивности и возбуждения, походку и позу (осанку), наличие непроизвольных движений, стереотипии, странного поведения (самокалечение, изогнутость хвоста, корчи).

Систематическое исследование неврологических рефлексов или реакций позволяет оценить целостность отдельных нервов или нервных путей. Поскольку рефлексы/реакции являются общими для многих видов, эти результаты могут способствовать экстраполяции данных, полученных у животных, на человека. Обычно оценивают реакцию на свет, рефлекс ушной раковины, рефлекс мышц разгибателей.

Оценка поструральной реакции и нейромышечные тесты позволяют оценить силу захвата, способность сохранения позы после падения с небольшой высоты, способность удерживать массу тела на одной конечности и способность поддерживать позу при перемещении. Тесты на силу захвата позволяют оценить количественно мышечную силу, данный параметр отражает степень скоординированности работы периферической нервной системы и мышц [24].

У крыс и мышей широко используют тесты для оценки когнитивных функций: тест пассивного избегания [37], условный рефлекс пассивного избегания (УРПИ), метод четырех пластин [38], тест темной светлой камеры (стандартная методика была разработана для мышей [39] и модифицирована для крыс [40]), тест рефлекса активного избегания в челночной камере.

Для изучения пространственной памяти и обучения у крыс и мышей разработаны такие тесты, как тест пространственной дискриминации и водный лабиринт Морриса [41, 42].

С целью тестирования рабочей памяти наиболее широко на крысах и мышах используют метод распознавания новых объектов.

**Исследования на карликовых свинках.** Исследования на взрослых карликовых свинках начинают с возраста самцов 6 месяцев и самок 8 месяцев (возраст, когда животные достигают половозрелости). Однако при изучении нейротоксичности отдельных групп препаратов могут быть использованы самые разные возрастные параметры в зависимости от возрастной



группы, для которой предназначен исследуемый препарат.

При изучении отсроченной нейротоксичности, проявляющейся у потомства, введение тестируемых объектов осуществляют беременным самкам как минимум ежедневно с момента имплантации (срок уточняется в зависимости от породы карликовых свиней) и во время лактации, что должно соответствовать пренатальному и раннему постнатальному росту головного мозга человека. Также препарат можно вводить с начала беременности, но в этом случае следует учитывать, что некоторые вещества могут вызывать гибель зародыша до имплантации.

У животных, подвергнутых исследованию во взрослом возрасте, могут быть изучены следующие показатели: клинические наблюдения и масса тела, подробные клинические наблюдения, двигательная активность, сенсорная активность, обучение и память, вес мозга, гистологические исследования.

Для карликовых свиней в последнее время разработаны и широко применяются функциональные тесты, например, реакция удаления от человека (метод определения мотивированной страхом реакции удаления от человека у разных видов животных) [43], оценка уровня спонтанной активности в тесте «открытое поле» [14, 44] или тест распознавания объектов [45]. Инверсия поведения до и после введения исследуемых объектов может свидетельствовать о нейротоксичности.

Для изучения у карликовых свиней когнитивных функций (рабочая (краткосрочная) память и долговременная память) разработан тест пространственной дискриминации [46].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При разработке программы исследования нового фармакологического вещества необходимо учитывать имеющиеся в наличии данные о его потенциальной нейротоксичности. Предпосылками для оценки нейротоксичности могут служить данные, полученные в экспериментах по острой или хронической токсичности, сведения о механизме действия тестируемого вещества или его химической структуре.

Различные группы фармакологических препаратов имеют разные проявления нейротоксичности, и при формировании программы исследования необходимо учесть эти данные, выбирая подходящий вид животных и перечень тестов. Также полезно учесть длительность применения фармакологического препарата, схему применения, возрастной контингент, для которого он предназначен (дети, взрослые или пожилые люди), в случае изучения психотропных препаратов — патологию, на которую нацелено лечение, возможность применения исследуемого препарата во время беременности. Нет необходимости выполнять все описанные тесты, правильное обоснование программы исследования может позволить существенно сократить перечень исследований. В ряде случаев целесообразно предусмотреть использование как минимум двух видов животных для оценки нейротоксичности, с обязательным использованием не грызунов, что позволит в максимально возможном объеме в ходе доклинических исследований изучить профиль безопасности препарата и создать необходимый уровень безопасности для человека при переходе на I фазу клинических исследований.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals (ICH Topic S7A), 2000. Available from: <https://goo.gl/H0MQFy>.
2. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. I. М.: Гриф и К; 2013.
3. ГОСТ Р 56700–2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Доклинические фармакологические исследования безопасности. М.: Стандартинформ; 2016.
4. Енгальцева ГН, Сюбаев РД, Васильев АН, Снегирева АА, Верстакова ОЛ. Оценка фармакологической безопасности лекарственных средств в доклинических исследованиях. Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения 2013; (1): 10–3.
5. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 1968; 13(3): 222–57.
6. Irwin S. Drug screening and evaluation of new compounds in animals. In: Nodin JH, Siegler PE, eds. *Animal and clinical techniques in drug evaluation*. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1964. P. 36–54.
7. Зильбер ЮД. Влияние трикрезилфосфата на миелиновые оболочки и его мембранотоксическое действие (Некоторые вопросы патогенеза отравлений): автореф. дис. ... д-ра мед. наук. М.; 1971.
8. Mullins RJ, Xu S, Pereira EF, Pescrille JD, Todd SW, Mamczarz J, et al. Prenatal exposure of guinea pigs to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos disrupts the structural and functional integrity of the brain. *Neurotoxicology* 2015; 48: 9–20.
9. Dobbing J, Sands J. Growth and development of the brain and spinal cord of the guinea pig. *Brain Res.* 1970; 17(1): 115–23.
10. Inns RH, Leadbeater L. The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphonate poisoning in the guinea-pig. *J Pharm Pharmacol.* 1983; 35(7): 427–33.
11. Fonnum F, Sterri SH, Aas P, Johnsen H. Carboxylesterases, importance for detoxification of organophosphorus anticholinesterases and trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol.* 1985; 5(6 Pt 2): S29–38.
12. Авдеева ОИ, Макарова МН, Макаров ВГ. Особенности изучения общетоксических свойств антипсихотических средств. *Фармация* 2017; (4). В печати.
13. Moran-Gates T, Massari C, Graulich A, Liegeois JF, Tarazi FI. Long-term effects of JL 13, a potential atypical antipsychotic, on rat dopamine and serotonin receptor subtypes. *Journal of Neuroscience Research* 2006; 84(3): 675–82.
14. Van der Staay FJ, Pouzet B, Mahieu M, Nordquist RE, Schuurman T. The d-amphetamine-treated Göttingen miniature pig: an animal model for assessing behavioral effects of antipsychotics. *Psychopharmacology* 2009; 206(4): 715–29.
15. Minuzzi L, Olsen AK, Bender D, Arnfred S, Grant R, Danielsen EH, Cumming P. Quantitative autoradiography of ligands for dopamine receptors and transporters in brain of Göttingen minipig: comparison with results in vivo. *Synapse* 2006; 59(4): 211–19.
16. Elman I, Borsook D, Lukas SE. Food intake and reward mechanisms in patients with schizophrenia: implications for metabolic disturbances and treatment with second-generation antipsychotic agents. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(10): 2091–120.
17. Haddad PM, Wieck A. Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia: mechanisms, clinical features and management. *Drugs* 2004; 64(20): 2291–314.
18. ГОСТ Р 56701–2015. Лекарственные средства для медицинского применения. Руководство по планированию доклинических исследований безопасности с целью последующего проведения клинических исследований и регистрации лекарственных средств. М.: Стандартинформ; 2016.
19. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test № 418: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure.
20. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test № 424: Neurotoxicity Study in Rodents.
21. Tupper DE, Wallace RB. Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol Exp.* 1980; 40(6): 999–1003.
22. Gad SC. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J Toxicol Environ Health* 1982; 9(5–6): 691–704.
23. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM. Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 108(2): 267–83.
24. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol.* 1979; 1(3): 233–6.

25. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol Teratol*. 1991; 13(6): 599–609.
26. Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. World Health Organization, 1986.
27. Spencer PS, Schaumburg HH. Experimental and Clinical Neurotoxicology. Baltimore/London: Williams and Wilkins; 1980.
28. Bancroft JD, Steven A. Chapter 17. Theory and Practice of Histological Techniques. In: *Neuropathological Techniques*. Churchill Livingstone: Lowe, James and Cox; 1990.
29. Abou-Donia MB, Graham DG. Delayed neurotoxicity of subchronic oral administration of leptophos to hens: recovery during four months after exposure. *J Toxicol Environ Health*. 1979; 5(6): 1133–47.
30. Konno N, Katoh K, Yamauchi T, Fukushima M. The effects of drug metabolism inducers on the delayed neurotoxicity and disposition of tri-o-cresyl phosphate in hens following a single intravenous administration. *J Toxicol Sci*. 1988; 13(1): 17–30.
31. Yamauchi T, Katoh K, Konno N, Fukushima M. Delayed neurotoxicity and toxicokinetics of leptophos in hens given repeatedly by low-dose intravenous injections. *J Toxicol Sci*. 1989; 14(1): 11–21.
32. Kapoor A, Matthews SG. Prenatal stress modifies behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal function in female guinea pig offspring: effects of timing of prenatal stress and stage of reproductive cycle. *Endocrinology* 2008; 149(12): 6406–15.
33. Dringenberg HC, Richardson DP, Brien JF, Reynolds JN. Spatial learning in the guinea pig: cued versus non-cued learning, sex differences, and comparison with rats. *Behav Brain Res*. 2001; 124(1): 97–101.
34. Lewejohann L, Pickel T, Sachser N, Kaiser S. Wild genius — domestic fool? Spatial learning abilities of wild and domestic guinea pigs. *Front Zool*. 2010; 7(7): 9.
35. Mattsson JL, Spencer PJ, Albee RR. A performance standard for clinical and functional observation battery examination of rats. *J Am Coll Toxicol*. 1996; 15(3): 239–54.
36. Current protocols in toxicology. Vol. 2. New York: Wiley and Sons; 2005.
37. Netto CA, Izquierdo I. On how passive is inhibitory avoidance. *Behav Neural Biol*. 1985; 43(3): 327–30.
38. Boissier JR, Simon P, Aron C. A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice. *Europ J Pharmacol*. 1968; 4(2): 45–51.
39. Jarvik ME, Kopp R. An improved one-trial learning situation in mice. *Psychol Rep*. 1967; 21(1): 221–4.
40. King RA, Glasser RL. Duration of electroconvulsive shock-induced retrograde amnesia in rats. *Physiol Behav*. 1970; 5(3): 335–9.
41. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci*. 1984; 11(1): 47–60.
42. Morris R, Anderson E, Lynch G, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Nature* 1986; 319(6056): 774–6.
43. Ланкин ВС, Никитин СВ, Трапезов ОВ. Факторы изменчивости мотивированной страхом реакции удаления от человека у мини-свиней селекции ИЦиГ СО РАН. *Вавиловский журнал генетики и селекции* 2015; 19(5): 613–23.
44. Lind NM, Arnfred SM, Hemmingsen RP, Hansen AK, Jensen KH. Open field behaviour and reaction to novelty in Göttingen miniature pigs: effects of d-amphetamine and Haloperidol. *Scan J Lab Animal Sci*. 2005; 32: 103–12.
45. Moustgaard A, Lind NM, Hemmingsen R, Hansen AK. Spontaneous Object Recognition in the Göttingen Minipig. *Neural Plast*. 2002; 9(4): 255–9.
46. Haagenen AM, Klein AB, Ettrup A, Matthews LR, Sorensen DB. Cognitive Performance of Göttingen Minipigs Is Affected by Diet in a Spatial Hole-Board Discrimination Test. *PLoS One* 2013; 8(11): e79429.

## ОБ АВТОРАХ

Закрытое акционерное общество «Научно-производственное объединение «ДОМ ФАРМАЦИИ». Российская Федерация, 188663, Ленинградская обл., Всеволожский район, г.п. Кузьмолловский, ул. Заводская, д. 3, к. 245.

Макарова Марина Николаевна. Директор, д-р мед. наук.

Макаров Валерий Геннадьевич. Заместитель директора по науке, д-р мед. наук.

Шекунова Елена Васильевна. Руководитель группы экспериментальной фармакологии, канд. биол. наук.

## АДРЕС ДЛЯ ПЕРЕПИСКИ

Макарова Марина Николаевна; makarova.mn@doclinika.ru

# METHODOLOGICAL APPROACHES TO THE ASSESSMENT OF PHARMACEUTICAL SUBSTANCES NEUROTOXICITY

M. N. Makarova, V. G. Makarov, E. V. Shekunova

CJSC Scientific-Production Association «HOME OF PHARMACY»,  
Zavodskaya street 3/245, Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district,  
Leningrad region 188663, Russian Federation

**Abstract:** The article reviews methodological approaches to the assessment of pharmaceutical substances neurotoxicity. It describes the main battery of animal tests that are conducted prior to clinical trials in order to assess drug effects on the functioning of vital body systems. The article addresses the choice of animal species, dosage and duration of pharmaceutical substance administration, as well as the conduct of clinical trials, functional tests and histological studies. It points out that an adequate justification of the study programme may help substantially reduce the number of tests. The authors assert the need to use at least two animal species in neurotoxicity studies, one of which must be a non-rodent species, in order to be able to investigate the drug safety profile during preclinical studies in as much detail as possible and to assure the required safety level for people when moving on to Phase I of clinical trials.

**Key words:** neurotoxicity; nervous system; motor coordination; sensory reactions; cognitive functions; safety pharmacology; laboratory animals.

**For citation:** Makarova MN, Makarov VG, Shekunova EV. Methodological approaches to the assessment of pharmaceutical substances neurotoxicity. *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products* 2017; 7(2): 111–116.

## REFERENCES

1. Safety Pharmacology Studies for Human Pharmaceuticals (ICH Topic S7A), 2000. Available from: <https://goo.gl/H0MQFy>.
2. Guidance on evaluation of medicines. Vol. I. Moscow: Grif i K; 2013 (in Russian).
3. State Standard R 56700–2015. Medicinal products for human use. Preclinical safety pharmacology studies. Moscow: Standartinform; 2016 (in Russian).
4. Engalycheva GN, Syubaev RD, Vasiliev AN, Snegireva AA, Verstakova OL. Drug pharmacological safety evaluation in preclinical stu-

- dies. The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products 2013; (1): 10–3 (in Russian).
5. Irwin S. Comprehensive observational assessment: Ia. A systematic, quantitative procedure for assessing the behavioral and physiologic state of the mouse. *Psychopharmacologia* 1968; 13(3): 222–57.
  6. Irwin S. Drug screening and evaluation of new compounds in animals. In: Nodin JH, Siegler PE, eds. *Animal and clinical techniques in drug evaluation*. Chicago: Year Book Medical Publishers; 1964. P. 36–54.
  7. Zilber YuD. The effect of tricresyl phosphate on myelin sheaths and its membrane toxicity (Some aspects of poisoning pathogenesis). *Dr. Med. Sci [thesis]*. Moscow; 1971 (in Russian).
  8. Mullins RJ, Xu S, Pereira EF, Pescrille JD, Todd SW, Mamczarz J, et al. Prenatal exposure of guinea pigs to the organophosphorus pesticide chlorpyrifos disrupts the structural and functional integrity of the brain. *Neurotoxicology* 2015; 48: 9–20.
  9. Dobbing J, Sands J. Growth and development of the brain and spinal cord of the guinea pig. *Brain Res.* 1970; 17(1): 115–23.
  10. Inns RH, Leadbeater L. The efficacy of bispyridinium derivatives in the treatment of organophosphonate poisoning in the guinea-pig. *J Pharm Pharmacol.* 1983; 35(7): 427–33.
  11. Fonnum F, Sterri SH, Aas P, Johnsen H. Carboxylesterases, importance for detoxification of organophosphorus anticholinesterases and trichothecenes. *Fundam Appl Toxicol.* 1985; 5(6 Pt 2): S29–38.
  12. Avdeeva OI, Makarova MN, Makarov VG. Aspects of studying general toxic properties of antipsychotic agents. *Pharmacy* 2017; (4) (in Russian). In press.
  13. Moran-Gates T, Massari C, Graulich A, Liegeois JF, Tarazi FI. Long-term effects of JL 13, a potential atypical antipsychotic, on rat dopamine and serotonin receptor subtypes. *Journal of Neuroscience Research* 2006; 84(3): 675–82.
  14. Van der Staay FJ, Pouzet B, Mahieu M, Nordquist RE, Schuurman T. The d-amphetamine-treated Göttingen miniature pig: an animal model for assessing behavioral effects of antipsychotics. *Psychopharmacology* 2009; 206(4): 715–29.
  15. Minuzzi L, Olsen AK, Bender D, Arnfred S, Grant R, Danielsen EH, Cumming P. Quantitative autoradiography of ligands for dopamine receptors and transporters in brain of Göttingen minipig: comparison with results in vivo. *Synapse* 2006; 59(4): 211–19.
  16. Elman I, Borsook D, Lukas SE. Food intake and reward mechanisms in patients with schizophrenia: implications for metabolic disturbances and treatment with second-generation antipsychotic agents. *Neuropsychopharmacology* 2006; 31(10): 2091–120.
  17. Haddad PM, Wieck A. Antipsychotic-induced hyperprolactinaemia: mechanisms, clinical features and management. *Drugs* 2004; 64(20): 2291–314.
  18. State Standard R 56701–2015. Medicinal products for human use. Guideline on planning preclinical safety studies for the purpose of subsequently conducting clinical trials and carrying out authorisation of medicines. Moscow: Standartinform; 2016 (in Russian).
  19. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test № 418: Delayed Neurotoxicity of Organophosphorus Substances Following Acute Exposure.
  20. OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4. Test № 424: Neurotoxicity Study in Rodents.
  21. Tupper DE, Wallace RB. Utility of the Neurologic Examination in Rats. *Acta Neurobiol Exp.* 1980; 40(6): 999–1003.
  22. Gad SC. A Neuromuscular Screen for Use in Industrial Toxicology. *J Toxicol Environ Health* 1982; 9(5–6): 691–704.
  23. Moser VC, McDaniel KM, Phillips PM. Rat Strain and Stock Comparisons Using a Functional Observational Battery: Baseline Values and Effects of Amitraz. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1991; 108(2): 267–83.
  24. Meyer OA, Tilson HA, Byrd WC, Riley MT. A method for the routine assessment of fore- and hindlimb grip strength of rats and mice. *Neurobehav Toxicol.* 1979; 1(3): 233–6.
  25. Crofton KM, Howard JL, Moser VC, Gill MW, Reiter LW, Tilson HA, MacPhail RC. Interlaboratory Comparison of Motor Activity Experiments: Implication for Neurotoxicological Assessments. *Neurotoxicol Teratol.* 1991; 13(6): 599–609.
  26. Environmental Health Criteria Document 60: Principles and Methods for the Assessment of Neurotoxicity Associated with Exposure to Chemicals. World Health Organization, 1986.
  27. Spencer PS, Schaumburg HH. *Experimental and Clinical Neurotoxicology*. Baltimore/London: Williams and Wilkins; 1980.
  28. Bancroft JD, Steven A. Chapter 17. Theory and Practice of Histological Techniques. In: *Neuropathological Techniques*. Churchill Livingstone: Lowe, James and Cox; 1990.
  29. Abou-Donia MB, Graham DG. Delayed neurotoxicity of subchronic oral administration of leptophos to hens: recovery during four months after exposure. *J Toxicol Environ Health.* 1979; 5(6): 1133–47.
  30. Konno N, Katoh K, Yamauchi T, Fukushima M. The effects of drug metabolism inducers on the delayed neurotoxicity and disposition of tri-o-cresyl phosphate in hens following a single intravenous administration. *J Toxicol Sci.* 1988; 13(1): 17–30.
  31. Yamauchi T, Katoh K, Konno N, Fukushima M. Delayed neurotoxicity and toxicokinetics of leptophos in hens given repeatedly by low-dose intravenous injections. *J Toxicol Sci.* 1989; 14(1): 11–21.
  32. Kapoor A, Matthews SG. Prenatal stress modifies behavior and hypothalamic-pituitary-adrenal function in female guinea pig offspring: effects of timing of prenatal stress and stage of reproductive cycle. *Endocrinology* 2008; 149(12): 6406–15.
  33. Dringenberg HC, Richardson DP, Brien JF, Reynolds JN. Spatial learning in the guinea pig: cued versus non-cued learning, sex differences, and comparison with rats. *Behav Brain Res.* 2001; 124(1): 97–101.
  34. Lewejohann L, Pickel T, Sachser N, Kaiser S. Wild genius — domestic fool? Spatial learning abilities of wild and domestic guinea pigs. *Front Zool.* 2010; (7): 9.
  35. Mattsson JL, Spencer PJ, Albee RR. A performance standard for clinical and functional observation battery examination of rats. *J Am Coll Toxicol.* 1996; 15(3): 239–54.
  36. Current protocols in toxicology. Vol. 2. New York: Wiley and Sons; 2005.
  37. Netto CA, Izquierdo I. On how passive is inhibitory avoidance. *Behav Neural Biol.* 1985; 43(3): 327–30.
  38. Boissier JR, Simon P, Aron C. A new method for rapid screening of minor tranquilizers in mice. *Europ J Pharmacol.* 1968; 4(2): 45–51.
  39. Jarvik ME, Kopp R. An improved one-trial learning situation in mice. *Psychol Rep.* 1967; 21(1): 221–4.
  40. King RA, Glasser RL. Duration of electroconvulsive shock-induced retrograde amnesia in rats. *Physiol Behav.* 1970; 5(3): 335–9.
  41. Morris R. Developments of a water-maze procedure for studying spatial learning in the rat. *J Neurosci.* 1984; 11(1): 47–60.
  42. Morris R, Anderson E, Lynch G, Baudry M. Selective impairment of learning and blockade of long-term potentiation by an N-methyl-D-aspartate receptor antagonist. *Nature* 1986; 319(6056): 774–6.
  43. Lankin VS, Nikitin SV, Trapezev OV. Factors contributing to the variation of the fearful withdrawal response to humans in minipigs bred at ICG SB RAS. *Vavilov Journal of Genetics and Breeding* 2015; 19(5): 613–23 (in Russian).
  44. Lind NM, Arnfred SM, Hemmingsen RP, Hansen AK, Jensen KH. Open field behaviour and reaction to novelty in Göttingen miniature pigs: effects of d-amphetamine and Haloperidol. *Scan J Lab Animal Sci.* 2005; 32: 103–12.
  45. Moustgaard A, Lind NM, Hemmingsen R, Hansen AK. Spontaneous Object Recognition in the Göttingen Minipig. *Neural Plast.* 2002; 9(4): 255–9.
  46. Haagensen AM, Klein AB, Ettrup A, Matthews LR, Sorensen DB. Cognitive Performance of Göttingen Minipigs Is Affected by Diet in a Spatial Hole-Board Discrimination Test. *PLoS One* 2013; 8(11): e79429.

## AUTHORS

Closed Joint Stock Company Scientific-Production Association «HOME OF PHARMACY», Zavodskaya street 3/245, Kuzmolovsky settlement, Vsevolozhsky district, Leningrad region 188663, Russian Federation.

Makarova MN. Director. Doctor of Medical Sciences.

Makarov VG. Deputy Director for Science. Doctor of Medical Sciences.

Shekunova EV. Head of the Experimental Pharmacology Group. Candidate of Biological Sciences.

## CONTACT E-MAIL

Makarova Marina Nikolaevna; makarova.mn@doclinika.ru