

Доклинические исследования нейротоксических свойств новых лекарственных препаратов *in vivo*

Н. В. Еремина*, Л. Г. Колик, Р. У. Островская, А. Д. Дурнев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова»,
Балтийская ул., д. 8, Москва, 125315, Российская Федерация

Резюме. Нейротоксические эффекты являются одной из частых причин прекращения доклинических и/или клинических исследований лекарственных препаратов. Их доклиническая оценка сложна в связи с широким спектром проявлений и степеней выраженности эффектов. Существующие экспериментальные подходы к оценке нейротоксичности громоздки, трудоемки и недостаточно адаптированы к доклиническим исследованиям лекарственных средств на ранних этапах разработок. Цель работы — анализ существующих подходов к экспериментальной оценке нейротоксического потенциала новых лекарственных препаратов с обсуждением необходимости и возможности создания и применения интегративных экспресс-тестов на нейротоксичность для ранней оценки перспективности фармакологических разработок. На основании обзора данных литературы и методических документов проведен сравнительный анализ современных подходов к оценке нейротоксичности химических соединений на лабораторных животных. Рассмотрены основные проблемы оценки нейротоксичности применительно к новым лекарственным препаратам, сопоставлены батарея тестов Ирвина и набор функциональных тестов. Проанализированы вопросы исследования влияния лекарственных препаратов на развитие и становление функций центральной нервной системы в периоды внутриутробного и постнатального развития. Констатируется, что существующая практика недостаточна в отношении оценки возможных негативных влияний на когнитивные функции. Сделана оценка факторов, влияющих на когнитивные функции грызунов в ходе исследований. Тесты «Острое угашение исследовательско-ориентировочной реакции» и «Экстраполяционное избавление» предложены к валидации в качестве возможных экспресс-тестов для выявления совокупности органических и функциональных нейротоксических нарушений на ранних этапах доклинических исследований лекарственных препаратов.

Ключевые слова: нейротоксичность; доклинические исследования; тесты Ирвина; набор функциональных тестов; когнитивные исследования; мыши; крысы

Для цитирования: Еремина НВ, Колик ЛГ, Островская РУ, Дурнев АД. Доклинические исследования нейротоксических свойств новых лекарственных препаратов *in vivo*. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2020;10(3):164–176. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-3-164-176>

***Контактное лицо:** Еремина Наталья Вахитовна; neremina@panacelalabs.com

Preclinical *in vivo* Neurotoxicity Studies of Drug Candidates

N. V. Eremina*, L. G. Kolik, R. U. Ostrovskaya, A. D. Durnev

Zakusov Research Institute of Pharmacology,
8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russian Federation

Abstract. Neurotoxic effects are one of the common reasons for discontinuation of preclinical and/or clinical studies. Preclinical evaluation of neurotoxic effects is complicated due to a wide range of manifestations and degrees of severity. Current experimental approaches to neurotoxicity assessment are cumbersome, laborious and not adapted enough for preclinical studies in the early stages of drug development. The aim of the study was to review existing approaches to experimental assessment of neurotoxic potential of new drugs and to discuss the need for and feasibility of developing and using integrated rapid neurotoxicity tests for early assessment of a pharmacological project's potential. The authors reviewed scientific literature and guidance documents and analysed current approaches to chemical compound neurotoxicity assessment in laboratory animals. The paper analyses the main issues of neurotoxicity assessment for new drugs and compares Irwin tests with the functional observation battery. It analyses issues related to assessment of drugs' effects on the development and maturation of central nervous system functions at pre- and postnatal stages. It was determined that the current practice is not sufficient for assessment of potential adverse effects on cognitive functions. The authors assessed factors affecting cognitive functions of rodents during studies. The "Acute suppression of the exploratory and orientation response" and "Extrapolation escape task" tests were proposed for validation as potential rapid tests for detection of an array of organic and functional neurotoxic disorders at early stages of preclinical studies.

Key words: neurotoxicity; preclinical studies; Irwin tests; functional observational battery; cognitive studies; mice; rats

For citation: Eremina NV, Kolik LG, Ostrovskaya RU, Durnev AD. Preclinical *in vivo* neurotoxicity studies of drug candidates. *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2020;10(3):164–176. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2020-10-3-164-176>

***Corresponding author:** Natalia V. Eremina; neremina@panacelalabs.com

Одно из лучших определений понятия «нейротоксичность» было дано в монографии С.А. Куценко: «Нейротоксичность — это свойство химических веществ, действуя на организм немеханическим путем, вызывать нарушение структуры и/или функций нервной системы»¹. Сходное определение дано Агентством по охране окружающей среды США: «Нейротоксичность — неблагоприятное изменение структуры или функции центральной и/или периферической нервной системы после воздействия химического, физического или биологического агента»².

Оценка нейротоксичности является обязательной частью доклинических токсикологических исследований безопасности лекарственных средств (ЛС)³. Не установленная или неадекватно оцененная нейротоксичность препаратов приводит к человеческим жертвам. Так, например, можно указать летальные исходы, связанные с поражениями центральной нервной системы (ЦНС) у здоровых добровольцев при клиническом исследовании ингибитора гидролазы амидов жирных кислот BIA 10-2474 [1].

Прекращение разработки нового лекарственного препарата⁴ («новый ЛП») вследствие нежелательных реакций, связанных с центральной нервной системой, является серьезной проблемой для фармацевтических компаний на всех этапах изучения эффективности и безопасности лекарственных средств [2]. По некоторым оценкам, такие нежелательные реакции являются причиной около 34% случаев прекращения разработок на стадии клинических исследований [3]. Примечательно, что доля препаратов, по которым разработчиками было принято решение об остановке дальнейшей программы на этапе доклинических исследований вследствие нейротоксичности, составляет совсем небольшой процент (~7%), что иллюстрирует проблематичность раннего выявления нейротоксикантов.

Отмечаемая диспропорция между экспериментальной оценкой и клиническими манифестациями нейротоксичности указывает на то, что часть нежелательных нейротоксических реакций невозможно спрогнозировать на основе рутинных исследований. Это ментальные нарушения, головная боль, нарушения сна, нарушения мелкой моторики, нейропатии, пристрастие и др. [4–6].

Наиболее общими проблемами экспертной оценки нейротоксичности и тесно сопряженного клинического мониторинга лекарственных средств являются:

- отсутствие единообразной шкалы оценки нейрогенных патологий и систематизированных све-

дений о нейротоксических эффектах большинства классов фармакологических производных;

- трудности в сегрегации нейротоксичности и сходных эффектов, обусловленных собственно фармакологическим действием (анестетики, антиконвульсанты, антидепрессанты и другие психотропные соединения) или нежелательных реакций, вызванных системным действием высокотоксичных соединений (цитостатики, фторхинолоновые производные и другие);

- неясность в вопросе оценки степени и обратимости повреждений, поскольку тяжесть возникающих нарушений варьируется от слабо выраженных (степень 1 по шкале Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE)) до летального исхода (степень 5 по шкале CTCAE)⁵.

Широкий спектр возможных нейротоксических эффектов от нарушения звуко- и цветовосприятия до замедления физического и умственного развития, параличей и летальных исходов делает невозможным составление общей описательной статистики. Это обуславливает сложность осуществления доклинической оценки лекарственных средств, создает проблему полного и адекватного описания потенциального нейротоксического действия и экспертизы отношения ожидаемой пользы к возможному риску применения лекарственного препарата [5]. В целом оценка нейротоксических эффектов новых ЛП является нетривиальной задачей из-за возможного многообразия проявлений, неустойчивости методологии оценки, различий и особенностей дизайна эксперимента, трудностей экстраполяции данных, полученных на животных, и множества других причин.

Цель работы — анализ существующих подходов к экспериментальной оценке нейротоксического потенциала новых лекарственных препаратов с обсуждением необходимости и возможности создания и применения интегративных экспресс-тестов на нейротоксичность для ранней оценки перспективности фармакологических разработок.

СОВРЕМЕННАЯ МЕТОДОЛОГИЯ ОЦЕНКИ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ *IN VIVO*

Доклинические исследования принято условно делить на три составляющих (см., например, [7]):

- *in vitro* и *in vivo* исследования эффективности (Pharmacology);

- исследования острой, хронической и специфических видов токсичности (Toxicology);

- *in vitro* и *in vivo* исследования влияния лекарственных соединений на дыхательную, сердечно-сосудистую и нервную системы (Safety Pharmacology).

¹ Куценко С.А. Основы токсикологии. Учебное пособие. СПб.: Медицина; 2004.

² Guidelines for neurotoxicity risk assessment (EPA/630/R-95/001F). EPA; 1998.

³ ICH S7A. Note for safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. CPMP/ICH/539/00. EMEA; 2001.

⁴ Здесь и далее по тексту статьи под термином «новый лекарственный препарат» подразумеваются как собственно лекарственные препараты, так и лекарственные средства и фармацевтические субстанции.

⁵ Common terminology criteria for adverse events (CTCAE). Version 5.0. U.S. Department of Health and Human Services; 2017.

Таблица 1. Параметры, определяемые в наборе функциональных тестов и тестах Ирвина

Table 1. Parameters assessed in the Functional Observation Battery and Irwin tests

Автономные Autonomic	Нейромышечные Neuromuscular	Сенсомоторные Sensorimotor	Поведенческие Behavioural
Дефекация ^a Defecation ^a	Аномальная осанка ^b Abnormal posture ^b	Реакция на прикосновение ^b Touch response ^c	Реакция на взятие на руки ^{b,a} Hand-held observations ^{b,c}
Мочепускание ^a Urination ^a	Аномальная походка ^b Abnormal gait ^b	Пальпебральный рефлекс ^b Palpebral reflex ^c	Агрессивность ^{b,a} Aggressiveness ^{b,c}
Поза ^b Posture ^b	Тонус тела ^a Body tone ^c	Выпрямительный рефлекс ^b Righting reflex ^c	Спонтанная активность ^a Spontaneous activity ^c
Слюноотделение ^a Salivation ^c	Сила захвата ^a Grip strength ^c	Рефлекс отдергивания хвоста ^b Tail pinch response ^c	Стойка ^a Body position ^a
Слезотечение ^a Lacrimation ^c	Тремор ^a Tremor ^c	Стартовый рефлекс ^a Startle response ^c	Стереотипия ^b Stereotype ^b
Нарушение дыхания ^a Respiratory distress ^c	Судороги ^a Convulsions ^c	Рефлекс ушной раковины ^a Pinna reflex ^c	Вокализация ^a Vocalization ^a
Ректальная температура ^a Rectal temperature ^a	Каталепсия ^a Catalepsy ^c	Хватательный рефлекс ^a Grasping reflex ^c	Активация ^{b,a} Arousal ^{b,c}
Масса тела ^a Body weight ^a	Рефлекс Штрауба ^a Straub tail ^c	Тяговый рефлекс ^a Traction response ^c	Седация ^{b,a} Sedation ^{b,c}
Диаметр зрачка и рефлекс зрачка ^a Pupil size and pupil response ^c	Экзофтальм ^a Exophthalmos ^c		Грумминг ^{b,a} Grooming ^{b,c}
Пилоэрекция ^a Piloerection ^c	Птоз ^a Ptosis ^c		

Примечание. ^a — количественные параметры, ^b — описательные данные, ^c — балльная или альтернативная («да/нет») оценка.
Note. ^a—quantitative parameters, ^b—descriptive data, ^c—scoring or alternative (“yes/no”) assessment.

Комплекс исследований, упомянутый последним, регулируется документами Международной конференции по гармонизации технических требований к регистрации лекарственных средств для человека⁶.

Спустя почти 20 лет после введения в практику руководства ICH S7A все еще сосуществуют два подхода к наблюдению и измерению нейротоксичности. Это батарея тестов Ирвина (Irwin tests) [8] и набор функциональных тестов (НФТ; functional observation battery), разработанный позднее Агентством по охране окружающей среды США (United States Environmental Protection Agency, US EPA) и описанный в работах В. Мозер и соавт. в конце 1980-х годов [9–11].

В целом обе батареи тестов сходны и предусматривают оценку четырех групп параметров, оцениваемых «в клетке», «в руках», в экспериментальных установках различного назначения (табл. 1) [8, 9, 12]. Оба способа тестирования рекомендуют выполнять с использованием препаратов сравнения, чтобы продемонстрировать пригодность условий теста и квалификацию исследователя.

Тесты Ирвина предусматривают последовательные наблюдения за животными, позволяющие систематически оценить около 50 параметров. Эти исследования требуют специальной подготовки исследователей, системы контроля качества, применения общей рейтинговой шкалы для каждого из выбранных параметров (номинальная, порядко-

вая, интервальная или коэффициентная шкалы), проверки путем сбора фактических данных с использованием препаратов сравнения для демонстрации внутренней достоверности (конструктивной и прогнозирующей) и надежности (включая надежность между оценками и воспроизводимостью), наблюдений за каждым животным до и после введения вещества в каждой дозе с тем, чтобы каждое животное могло служить собственным контролем, системного анализа [8]. Модификации исходной методики С. Ирвина в последующих работах касаются прежде всего вида животных (крысы vs мыши), выбранного времени проведения тестов и набора тестируемых параметров в зависимости от задач исследования [12–14].

Набор функциональных тестов и тесты Ирвина применительно к задачам доклинических исследований безопасности

Принципиальных различий, касающихся набора определяемых параметров, между батареями тестов Ирвина и НФТ нет, хотя НФТ несколько превосходит тесты Ирвина более детальной оценкой сенсомоторных рефлексов и количественного измерения спонтанной активности [15]. В свою очередь, тест Ирвина в авторской интерпретации предусматривает использование большего количества точек регистрации эффектов с учетом времени максимального накопления соединения в плазме крови (T_{max}) [16]. Другие различия касаются деталей

⁶ ICH S7A. Note for safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. CPMP/ICH/539/00. EMEA; 2001.

ICH S7B. The nonclinical evaluation of the potential for delayed ventricular repolarization (QT interval prolongation) by human pharmaceuticals. CPMP/ICH/423/02. EMEA; 2005.

лабораторных протоколов, выполнения последовательности тестов, выбора доз, интервалов между временными точками регистрации эффектов, количества животных в группах, документирования и статистической обработки, трактовки результатов и некоторых других особенностей [8, 14–16]. Разбор этих деталей излишен, поскольку оценка специфической и общей фармакологической активности, включая исследования токсичности новых ЛП, является самостоятельной научной задачей. Ее решение осложняется тем, что существуют серьезные разногласия относительно достаточности рассматриваемых наборов тестов для полноценной оценки нейротоксического потенциала с точки зрения экстраполяции на человека, и дебатировано, какой подход предпочтительнее [15–18].

Подавляющее большинство зарубежных методических источников по токсикологии содержат упоминания о функциональной батарее тестов, тогда как тесты Ирвина упоминаются лишь вскользь. В то же время тесты Ирвина [8] и их модификации [12–14] и набор функциональных тестов [9, 10, 19] остаются двумя наиболее часто используемыми методиками наблюдательного неинвазивного тестирования нейротоксичности лекарственных средств в соответствии с рекомендациями ICH S7A, которые также оставляют возможность применения иных пригодных методик.

В целом чувствительность тестов Ирвина или НФТ невелика, на основе их результатов верно прогнозируется лишь 19–57% эффектов [20].

В рамках парадигм лекарственной токсикологии принципиально важно отметить, что описанные методические подходы были разработаны не для целей доклинического исследования безопасности лекарственных средств. Тесты Ирвина изначально предназначались для обнаружения психоактивных соединений при исследовании на мышах, тесты НФТ были разработаны для тестирования нейротоксичности веществ, производимых химической промышленностью (в частности, пестицидов) [8, 21].

Обе батареи тестов ориентированы на регистрацию внешне проявляемых реакций, также оба подхода не предусматривают оценки возможного нейротоксического действия на потомство.

Часть нейротоксических эффектов, отмечаемых у животных в рассматриваемых методах, невозможно транслировать на человека. В частности, у крыс такими эффектами являются рефлекс Штрауба, вертикализация, а также, по данным некоторых авторов, пилоэрекция [22]. Таким образом, проблема экстраполяции нейротоксических эффектов далека от решения, что не позволяет однозначно прогнозировать возможные нежелательные реакции у человека [23]. Недостатком тестов Ирвина и НФТ является невозможность оценки вкусовых, зрительных,

обонятельных и слуховых дисфункций, изменений в структуре сна, а также когнитивных нарушений.

Необходимость критического переосмысления практики оценки нейротоксичности лекарственных средств неоднократно отмечалась в литературе (см., например, [22]).

Общий дизайн эксперимента

Общий протокол нейротоксических исследований фармакологической безопасности лекарственных средств проиллюстрирован примером, приведенным в таблице 2.

Исследование проводят на самцах и/или самках крыс или мышей. До начала исследования животных акклиматизируют и рандомизируют в экспериментальные группы. Статистические расчеты помогают определить подходящий размер группы, но по умолчанию рекомендуется использовать 6–10 животных в группе.

Диапазон доз, в которых испытуемое вещество применяют в эксперименте, определяют в ходе предварительных исследований, с тем чтобы обязательно включить дозу, при которой наблюдается наиболее ярко выраженный нейротоксический эффект, а также несколько других доз для оценки дозовой зависимости. Как правило, используют placebo и три уровня доз при однократном введении или введении с небольшими интервалами в течение суток. Часто практикуют включение дополнительной группы для забора крови или группы дополнительного контроля. Уровни доз выбирают на основе предварительных исследований, таких как оценка максимальной переносимой дозы или дозы без наблюдаемых поведенческих эффектов. Оптимальной считается ситуация, когда низкая доза соответствует предполагаемой терапевтической дозе для человека, а высокая вызывает умеренные поведенческие и/или физиологические эффекты. Промежуточная доза дополнительно характеризует дозовую зависимость. Путь введения должен соответствовать предполагаемому клиническому, когда это возможно, или обеспечивать проявления, сходные с ожидаемыми у человека или превышающие таковые.

Перед введением испытуемого препарата регистрируют клинические признаки и массу тела животных, далее животным вводят ЛС и помещают в домашнюю клетку, после чего каждое животное наблюдают в выбранные заранее моменты времени в соответствии с фармакокинетическими свойствами испытуемого ЛС. Последующие точки обычно выбирают в течение 24 ч или более в зависимости от периода полувыведения ЛС.

После окончания исследования вновь регистрируют общее состояние и массу тела. Наблюдения и тесты осуществляют в очередности по мере нарастания сложности манипуляций, начиная с наблюдений «в домашней клетке» и «на руках». Затем

Таблица 2. Общий дизайн исследования нейротоксичности *in vivo* с использованием тестов Ирвина или набора функциональных тестов [9, 22]**Table 2.** General design of an *in vivo* neurotoxicity study using Irwin tests or functional observation battery [9, 22]

Элемент дизайна Design element	Описание Description
Экспериментальные группы Study groups	Количество животных в группе: 6–10; 1–5 уровней доз препарата; группа плацебо и негативный контроль. Введение однократное или многократное с небольшими интервалами между введениями The number of animals per group: 6–10; 1–5 dose levels; placebo group and negative control. Single or multiple administration with small intervals between administrations
Временные точки проведения тестов Timepoints for testing	Тестирование осуществляется каждые 30 мин после введения препарата до достижения T_{max} (рекомендации С. Ирвина) или время для проведения оценки выбирается в индивидуальном порядке на основании фармакокинетических данных (современные рекомендации) Testing is carried out every 30 min after drug administration until T_{max} (S. Irwin's recommendations) or another timepoint selected individually based on pharmacokinetic data (current recommendations)
Исследуемые параметры* Parameters*	Наблюдение в домашней клетке: поза и признаки необычного поведения, такие как конвульсии, вокализация, тремор, возбуждение или стереотипия и др. Home cage observations: posture and signs of bizarre behaviour, such as convulsions, vocalizations, tremors, agitation or stereotype, etc.
	Реакция на взятие в руки: легкость высвобождения, реакция, тонус тела, слюноотделение, слезотечение или пилоэрекция и др. Hand-held observations: ease of removal, response, body tone, salivation, lacrimation, or piloerection, etc.
	Оценка спонтанной активности в открытом поле: спонтанная активность, вертикальная стойка, походка, стереотипное поведение; раздражимость, катаlepsия, мочеиспускание и дефекация Spontaneous activity in open field: spontaneous activity, upright position, gait, stereotyped behaviour; irritability, catalepsy, urination, and defecation
	Оценка автономной активности: реакция на прикосновение, реакция вздрагивания, установочный выпрямительный, пальпебральный и хватательный рефлексы, рефлекс отдергивания хвоста, тепловая ноцицепция, атаксия, температура тела, реакция зрачка и др. Autonomic activity: touch response, startle response, righting reflex, palpebral reflex, grasping reflex, tail pinch response, thermal nociception, ataxia, body temperature, pupil response, etc.

* Оценка приведенных параметров, ранжированных с использованием подробной категориальной или балльной шкалы оценок, проводится в условиях слепого метода и занимает 5–8 мин на одно животное

* Evaluation of the parameters ranked using a comprehensive categorical or scoring scale, is carried out under blinding conditions and takes 5–8 min per animal

животное помещают в чистую смотровую камеру («открытое поле»), где в течение трехминутного исследовательского периода фиксируют необходимые параметры. Наконец, проводят наиболее сложные процедуры, в том числе изучают ответы на различные стимулы, измеряют температуру тела и возвращают животное в «домашнюю клетку».

Тесты Ирвина и НФТ могут быть применены к дизайнам долгосрочных исследований для оценки диапазона доз, продолжительности, величины и обратимости поведения и физиологических функций как для первичного скрининга, так и для углубленной вторичной оценки нейротоксичности, поэтому дизайн исследования (количество доз и введений) может варьироваться и зависит от цели исследования [16].

ПРАКТИКА И ПЕРСПЕКТИВЫ СОВЕРШЕНСТВОВАНИЯ ОЦЕНКИ НЕЙРОТОКСИЧЕСКИХ ЭФФЕКТОВ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ НА ДОКЛИНИЧЕСКОМ ЭТАПЕ

Масштабность, регулярность и длительность применения разрабатываемого ЛС предъявляют особенно строгие требования к его безопасности. На определенных этапах разработки и жизненного цикла препарата оценка токсичности может быть как недостаточной, так и избыточной. При массо-

вом скрининговом исследовании целесообразно применять интегративные тесты, позволяющие максимально быстро оценить наличие и выраженность нейротоксичности, отсеивая явно неперспективные препараты. В свою очередь, новые ЛП, прошедшие сито первичного скрининга нейротоксичности, к этапу планирования клинических исследований должны быть охарактеризованы максимально полно. Однако и в этом случае важно придерживаться принципа необходимости и достаточности, прежде всего опираясь на достоверность и надежность экстраполяции экспериментальных данных на человека. Обоснование и создание алгоритма оценки — самостоятельная научная задача при изучении каждого конкретного препарата, которая может решаться любыми методами от *in silico* и *in vitro* через поведенческие тесты и другие нейрофизиологические и морфогистологические приемы.

Согласно сложившейся в России практике доклинических исследований, первоначальные данные о влиянии на нервную систему получают при оценке острой токсичности веществ. На возможные нейротоксические эффекты указывают выявляемые особенности поведения, характер двигательной активности, наличие и характер судорог, нарушения координации движений, неадекватные реакции на раздражители, размер зрачка и ряд

других показателей⁷. Наиболее значимыми интегральными нейрогенными симптомами в этих исследованиях являются рефлекс Штрауба, парезы и паралич. Их выявление указывает на сомнительные перспективы дальнейшей разработки.

Следующим этапом является оценка хронической токсичности. Более длительная продолжительность наблюдения за животными по сравнению с острым экспериментом позволяет оценить степень выраженности возможных нейротоксических эффектов, их динамику и обратимость. Кроме того, при использовании нескольких уровней доз возможно описать дозовую зависимость наблюдаемых нарушений.

Результаты гистологических и морфологических исследований, выполняемых в хроническом эксперименте, позволяют с высокой надежностью выявлять грубые органические нарушения ЦНС, но не изменения, приводящие к нарушениям когнитивных функций у взрослых, развития и становления ЦНС и сопряженных когнитивных функций у потомства.

На этапе хронических исследований в практике из поведенческих тестов используют только тест «Открытое поле» [24]. В рутинном варианте тест позволяет надежно регистрировать синдромы неврологического дефицита, исследовательскую активность, тревожность и эмоциональность испытуемых животных в «фармакогенетических» вариантах с заданной освещенностью, оценить стресс-устойчивость, а в специальных модификациях позволяет также регистрировать угашение исследовательско-ориентировочной деятельности. Предполагается, что этот тест достаточен для выявления возможных функциональных нейротоксических нарушений по показателям эмоциональности, двигательной и исследовательской активности животных⁸ [25, 26]. В то же время применение теста в классическом токсикологическом варианте [27] не отвечает на вопрос о влиянии исследуемого вещества на когнитивные функции [28, 29].

Таким образом, проблему должной оценки когнитивных функций сегодня не решает ни развернутая оценка нейротоксичности в тестах Ирвина или НФТ, ни современная рутинная практика доклинических исследований на взрослых животных.

Регистрация нейротоксических эффектов у потомства

В доклинических исследованиях влияния ЛС на пре- и постнатальное развитие потомства внимание фокусируют на невынашивании беременности, тератогенных эффектах, недоношенности и дефици-

те массы тела новорожденных, задержках развития. Методы их определения подробно изложены в методических документах⁹. Для оценки влияния на обучение и память потомства (когнитивные функции) рекомендуются тесты «Пассивное избегание с отрицательным (болевым) подкреплением» и «Активное избегание с отрицательным (болевым) подкреплением». Тест «Открытое поле» в этой части токсикологических исследований используют для исследования эмоционально-двигательного поведения и становления параметров физического развития потомства, хотя подразумевается, что его результаты могут также характеризовать нейротоксичность¹⁰.

На фоне такой практики рутинных исследований все более накапливаются сведения о том, что нейрокогнитивные нарушения часто возникают у детей, матери которых получали ту или иную лекарственную терапию¹¹ [30, 31]. В обзоре, посвященном оценке безопасности моно- и политерапии более 5000 беременных противоэpileптическими препаратами первого (карбамазепин, клобазам, клоназепам, этосуксимид, фенобарбитал, фенитоин, примидон, вальпроат) и нового поколений (габапентин, ламотриджин, леветирацетам, окскарбазепин, вататрин, топирамат), показано, что их применение приводит к задержке когнитивного развития, аутизму, диспраксии, а также к синдрому дефицита внимания с гиперактивностью, задержке речи и психомоторного развития, судорогам у новорожденных и социальным нарушениям [32].

Продемонстрирована связь между пренатальным приемом парацетамола и повышенным риском развития у потомства расстройств аутистического спектра и синдрома дефицита внимания и гиперактивности у детей, а также снижения уровня интеллекта [33]. Использование селективных антидепрессантов ингибитора обратного захвата серотонина для терапии тревожных расстройств во время беременности приводит к различным нейрокогнитивным и социально-поведенческим отклонениям в развитии детей [34, 35]. Пренатальное воздействие половых стероидных гормонов приводит к повышенному риску развития расстройств аутистического спектра и аффективных расстройств у детей, а также влияет на их сексуальную ориентацию и когнитивные способности [36]. В работе P. Grandjean и P.J. Landrigan указано, что от 10 до 20% детей имеют отклонения в развитии, связанные с влиянием экзогенных факторов, в том числе ЛП [37]. Наиболее часто это нарушения обучаемости, сенсорные нарушения, задержки развития, аутизм, гиперактивность с дефицитом внимания [38, 39].

⁷ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. М.: Гриф и К; 2012. Derelanko MJ, Hollinger MA, eds. Handbook of toxicology. CRC Press; 2002.

⁸ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. М.: Гриф и К; 2012.

⁹ Там же.

¹⁰ Там же.

¹¹ Куценко СА. Основы токсикологии. Учебное пособие. СПб.: Медицина; 2004.

Подобное положение актуализирует поиск новых подходов, на что направлены многочисленные фундаментальные исследования, рассматривающие подходы к тестированию нейронных сетей, оценке рабочей и долговременной памяти, внимания, исполнительных функций, включая когнитивную гибкость *in vivo*. Однако к настоящему моменту в доступной литературе отсутствуют удовлетворительные предложения по методическому обеспечению оценки нейротоксических и особенно нарушений когнитивных функций у потомства.

Важно подчеркнуть, что отечественные протоколы исследований нейротоксичности у потомства нуждаются в гармонизации с международными требованиями. Введение новых ЛП самкам крыс не должно ограничиваться только сроком беременности, но и распространяться на период молочного вскармливания потомства. Этот период у крыс соответствует позднему пренатальному и раннему постнатальному становлению ЦНС у человека¹².

ОБОБЩЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ НЕЙРОТОКСИЧНОСТИ В ПРАКТИКЕ ДОКЛИНИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Очевидно, что ни одна батарея тестов *as is* не может быть использована для составления полноценного заключения о влиянии фармакологически активного соединения на нервную систему и исчерпывающего прогноза возникновения нежелательных реакций у человека. Отсюда возникает необходимость комплексной оценки с учетом результатов гистологических, морфологических и иных инструментальных методов исследования.

Традиционно используемые в исследованиях индикаторы нейротоксических эффектов можно сгруппировать в несколько групп¹³ [40]:

- структурные или нейропатологические: изменения массы мозга, морфологические и гистологические нарушения;
- нейрохимические: нарушения процессов синтеза, высвобождения, поглощения, распада нейротрансмиттеров; нарушения в механизме передачи сигналов, повреждения мембраносвязанных ферментов, регулирующих нейрональную активность;
- нейрофизиологические: изменение скорости, амплитуды или рефрактерного периода нервной проводимости; изменение латентности или амплитуды сенсорного вызванного потенциала; изменение электроэнцефалографической картины;
- поведенческие и неврологические: увеличение или снижение двигательной активности, изменение тактильных, зрительных, слуховых, вкусовых или обонятельных ощущений; нарушение координации движений, слабость, паралич, аномальные

движения или осанка, тремор; отсутствие или снижение частоты возникновения, степени или латентности сенсомоторных безусловных рефлексов; изменение величин силы захвата, разгибания задних конечностей; изменения поведения, нарушения процессов обучения, памяти и внимания.

Главным условием качественного анализа данных является интеграция определенных нейротоксических показателей в общую фармако-токсикологическую картину данных о препарате. Полученные данные следует интерпретировать в свете всей полученной фармакологической и токсикологической информации, опираясь на сегрегацию токсических и фармакологических эффектов.

Обоснованное заключение о нейротоксическом потенциале в большинстве случаев не требует совокупного учета всех перечисленных показателей. В случае если нейротоксических эффектов не наблюдали ни в одном из исследований, входящих в комплекс общепринятых доклинических исследований лекарственного препарата, то дополнительного специфического исследования нейротоксичности не требуется. Напротив, если хотя бы в каком-то эксперименте наблюдались нейрогенные нарушения, дальнейшее обсуждение стоит вести более внимательно. В случае если наблюдаемые эффекты хорошо соотносятся с какой-либо изученной неврологической патологией, при этом они краткосрочны, обратимы и имеют четкую дозовую зависимость, то можно не проводить дополнительные исследования нейротоксичности.

В том случае если обнаружены нарушения при использовании исследуемого вещества в дозах, соотносимых с терапевтическими, необратимы, следует признать, что дальнейшая разработка нецелесообразна, поскольку купировать повреждения нейронной сети практически невозможно, и по этой причине невозможно обеспечить безопасность применения даже высокотаргетного ЛС [41].

В промежуточном случае, когда нейротоксические эффекты являются обратимыми, но они длительны по времени и наблюдаются для уровней доз, сопоставимых с терапевтическими, или отсутствует дозовая зависимость эффекта, целесообразно провести дополнительное углубленное исследование нейротоксичности. Обязательным показанием к углубленному исследованию нейротоксичности считают механизм действия, реализуемый посредством влияния на элементы нервной системы¹⁴ [42].

При интерпретации результатов поведенческих тестов следует учитывать, что их показатели могут быть существенно искажены вследствие многих причин [43], например особенностей конструкции используемой установки, вида и генотипа животных,

¹² OECD Guideline for the testing of chemicals. Developmental neurotoxicity study. OECD; 2007.

¹³ Guidelines for neurotoxicity risk assessment. EPA/630/R-95/001F. US EPA; 1998.

¹⁴ Williams PL, James RC, Roberts SM, eds. Principles of toxicology: environmental and industrial applications. 2nd ed. John Wiley & Sons; 2000.

остаточных явлений после фиксации и/или предыдущей наркотизации животных, их недостаточной адаптации, стадии эстрального цикла, а также из-за посторонних запахов, шумов, в том числе в диапазонах, недоступных для восприятия человеком [24].

Вследствие чрезвычайного разнообразия и сложности функций нервной системы, от контроля вегетативных до когнитивных функций, крайне сложно предложить интегрирующий доклинический тест, охватывающий весь спектр неврологических и поведенческих эффектов. Можно лишь полагать, что этот тест будет основан на исследовании *in vivo*, поскольку рассмотрение любого токсического эффекта в отсутствие нейроэндокринной регуляции *a priori* является неполным и неадекватным. Эта позиция нашла отражение в рекомендациях ICH, подчеркивающих необходимость регистрации эффектов на «функциональном» уровне, а не на уровне функции рецептора¹⁵.

Тесты для выявления когнитивных нарушений у взрослых животных и потомства

Зарегистрированными лекарственными средствами становятся не более 1–2% из нескольких тысяч соединений, составляющих основу фармакологического поиска. Ранний отсев потенциально непригодных соединений, позволяющий уменьшить временные и финансовые затраты на доклинические исследования, приведет к значительному прогрессу в создании новых ЛС [44].

Первичный нейротоксический скрининг эффективен в отношении веществ, вызывающих грубые нарушения. Они манифестируют через показатели, перечисленные в таблице 1, и могут быть зарегистрированы еще на стадии оценки острой токсичности. В практике рутинных исследований существует проблема оценки когнитивных нарушений. Отсюда возникает задача поиска и разработки дополнительных экспресс-тестов, позволяющих с минимальными затратами сделать заключение о нейротоксическом потенциале нового ЛП во всех возможных проявлениях, включая влияние на когнитивные функции, память и обучение.

Для выявления нейротоксических эффектов лекарственных средств при достаточном обосновании может быть использован любой из известных тестов. В рамках текущей задачи учета когнитивных нарушений и на основании опыта работы ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Зукосова» в качестве приоритетных для верификации пригодности в качестве тестов экспресс-оценки нейротоксических эффектов с акцентом на когнитивные функции можно использовать все тесты, широко используемые в экспериментальной нейрофармакологии.

Прежде всего это тест «Открытое поле», один из наиболее известных и широко распространенных поведенческих тестов [27]. Другие возможные тесты (табл. 3) базируются на реакции животных на некий ключевой болевой или пищевой раздражитель, обязательно ассоциирующийся с определенным условно-рефлекторным или обстановочным (контекстуальным) фактором. Для выполнения большинства этих тестов требуются дорогостоящее оборудование и квалифицированный персонал.

В ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Зукосова» разработаны и внедрены в экспериментальную практику два метода, потенциально пригодные для верификации в качестве тестов экспресс-оценки нейротоксических эффектов новых ЛП, а именно тест острого угашения исследовательско-ориентировочной реакции и тест «Экстраполяционное извлечение».

Тест «Острое угашение исследовательско-ориентировочной реакции». Угашение исследовательско-ориентировочной реакции относится к категории неассоциативного обучения. Его обозначают также как «негативное обучение», поскольку оно сводится не к приобретению нового навыка, а к ослаблению существовавшей реакции. Одной из наиболее простых и воспроизводимых форм «негативного обучения» является угашение двигательной активности как следствие ослабления исследовательско-ориентировочной реакции в результате оценки животным окружающей обстановки как не имеющей биологического значения. Важным отличием этой формы поведения от ассоциативного обучения с отрицательным подкреплением является полное отсутствие фактора инвазивности.

Влияние веществ на угашение исследовательско-ориентировочной реакции ранее изучали в экспериментах на одиночном животном (мышь или крыса), помещаемом на короткий срок (3–5 мин) в открытое поле; повторное помещение животного в эти же условия осуществляли на период от 5 до 7 сут¹⁶.

В отличие от экспериментов, в которых для оценки угашения используют повторные эксперименты, в методике острого угашения применяют однократную, но более длительную — в течение 30 мин — регистрацию двигательной активности. Этот срок достаточен для оценки развития угашения в одном сеансе [52].

Регистрацию двигательной активности осуществляют с помощью автоматизированного оборудования. Исследования проводят на группе (обычно из 10 мышей), что позволяет уменьшить влияние индивидуальных различий в исходной двигательной активности и реакции на исследуемый препарат.

¹⁵ ICH S7A. Note for safety pharmacology studies for human pharmaceuticals. CPMP/ICH/539/00. EMEA; 2001

¹⁶ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. М.: Гриф и К; 2012.

Таблица 3. Тесты, наиболее часто используемые для оценки когнитивных функций у грызунов
Table 3. Tests most often used for cognitive function assessment in rodents

Название теста [источник] Test [reference]	Тип памяти Memory type	Методология Methodology	Преимущества Advantages	Ограничения Limitations
Водный лабиринт Морриса [45] Morris water maze [45]	Приобретение пространственной памяти, рабочая память The acquisition of spatial memory, working memory	Четырехдневное формирование пространственной памяти с последующим испытанием через 24 ч Four-day formation of spatial memory with subsequent testing after 24 h	Хорошо зарекомендовавший себя тест и используемый в лабораториях по всему миру, легко воспроизводимый, простая процедура A well-established test widely used all over the world, easy-to-replicate, simple procedure	Может быть стрессогенным для грызунов, дорогим, трудоемким, позволяет тестировать только одного грызуна за один раз, необходимо иметь дренажную и залившую систему для воды, необходимое для видеотслеживания программное обеспечение It may be stressful for rodents, expensive, time-consuming, it allows researchers to test only one rodent at a time, there is a need for a water drainage and filling system, video surveillance software
Лабиринт Барриса [46] Barnes maze [46]	Приобретение пространственной памяти, рабочая память The acquisition of spatial memory, working memory	Четырехдневное формирование пространственной памяти с последующим испытанием через 24 ч Four-day formation of spatial memory with subsequent testing after 24 h	Менее стрессогенный для грызунов, использующих более естественные процессы памяти, хорошо зарекомендовавший себя в лабораториях по всему миру It is less stressful for rodents who use more natural memory processes, it is well-established in laboratories worldwide	Занимает много времени, можно тестировать одного грызуна за один раз, необходимо иметь большое помещение для лабиринта шириной 1 м и оборудование для видеомониторинга It takes a lot of time, it allows researchers to test only one rodent at a time, there is a need for a large maze room 1 m in width and video monitoring equipment
Распознавание нового объекта [47, 48] Object recognition test [47, 48]	Ассоциативная память, декларативная рабочая память Associative memory, declarative memory, working memory	Двухдневный протокол, замена старого объекта новым объектом, вычисление «индекса распознавания» Two-day protocol, replacing the old object with a new object, calculating the "recognition index"	Хорошо зарекомендовавший себя тест, основанный на естественном исследовательском поведении грызунов, недорогой, эффективный, экономичный по времени A well-established test based on natural exploratory behavior of rodents, inexpensive, effective, time-efficient	Не оценивает пространственную память No evaluation of spatial memory
Обусловленная реакция страха [49] Fear conditioning [49]	Ассоциативная память Associative memory	Двухдневный протокол направлен на обучение грызунов ассоциировать определенный стимул (световой или звуковой) с электрошоком, обучение измеряется реакцией замораживания The 2-day protocol is aimed at teaching rodents to associate a specific stimulus (light or sound) with electric shock, learning is measured by the "freezing" response	Краткосрочная процедура обучения, хорошо зарекомендовавший себя тест, надежные результаты Short-term training procedure, a well-established test extensively described in literature, reliable results	Стрессовое состояние для грызунов, задействован болевой фактор, дорогостоящее оборудование, помимо гиппокампа затрагивает другие структуры мозга, в частности миндалевидное тело Stressful situations for rodents, pain factor, expensive equipment, the test affects other brain structures in addition to the hippocampus, amygdala, in particular
Радиальный водный лабиринт [50] Radial water maze [50]	Пространственная и рабочая память Spatial and working memory	Обучение местонахождению одного из восьми спасательных рукавов лабиринта, многократные испытания в течение нескольких дней Training in finding the location of one of the maze's eight arms, multiple tests over several days	Естественное исследовательское поведение, короткий протокол обучения, отсутствие обонятельных стимулов Natural exploratory behavior, short training protocol, no olfactory stimuli	Может быть стрессогенным, плавание может вызвать стресс у животных It may be expensive; swimming can cause stress in animals
У-лабиринт [51] Y-maze [51]	Активная рабочая кратковременная память Active working short-term memory	Два испытания, «спонтанное чередование» вычисляется по количеству заходов в новый рукав, вычисляется процент чередования Two tests, calculation of "spontaneous alternation" by the number of entries into a new arm, calculation of the percentage of alternation	Недорогое оборудование, минимальное обучение, не требующее много времени, естественное исследовательское поведение животного Low-cost equipment, minimal and time-efficient training, natural exploratory behavior of an animal	Не позволяет оценивать формирование памяти в течение длительного периода времени It does not assess memory formation over a long period of time

Другим важным достоинством групповой регистрации является то, что в этом случае оценивают не только окружающую обстановку, но и «партнеров» по группе. Любое вещество, улучшающее внимание и кратковременную память, независимо от его химической структуры, будучи введено до регистрации двигательной активности, достоверно ускоряет развитие «острого угашения», тогда как вещества, ухудшающие эти виды когнитивных функций, замедляют его развитие. Замедление развития угашения может служить признаком нейротоксического действия изучаемого соединения. Простота исполнения теста и информативность делают его пригодным для широкого применения в токсикологической практике.

Тест «Экстраполяционное избавление». Поведение в тесте «Экстраполяционное избавление» рассматривается как действие, направленное на поиск способов выбраться из аверсивной среды [53]. Тестирование в установке «Экстраполяционное избавление» позволяет определить способность животного искать пути преодоления острой стресс-ситуации. В методических документах этот тест рассматривается в качестве одного из методов исследования новых ЛП¹⁷.

Экспериментальная установка состоит из внутреннего цилиндра из прозрачного пластика, вмонтированного во внешнюю емкость (бак) с закрепленной на стенке лестницей. Бак заполняют водой ($t = 21-23^\circ\text{C}$) так, чтобы цилиндр погружался в воду на 2 см. Крыс помещают в цилиндр и наблюдают за их поведением в течение 2 мин, регистрируя латентное время до подныривания под край цилиндра и время до нахождения лестницы на краю бака (время плавания). Методика является чувствительной к фармакологическим [54, 55] и генетическим [56] факторам, а также к токсическим воздействиям, в частности она была успешно использована для оценки нейротоксического воздействия этанола и табачного дыма на животных в зависимости от пола испытуемых [57].

Представляется, что тестирование нейротоксичности новых ЛП в тестах «Острое угашение исследовательско-ориентировочной реакции» и «Экстраполяционное избавление» может создать необходимую информационно-методическую базу для экспрессной оценки влияния ЛС на когнитивные функции.

ОСОБЕННОСТИ ТЕСТИРОВАНИЯ КОГНИТИВНЫХ ФУНКЦИЙ У ВЗРОСЛЫХ ЖИВОТНЫХ

Достоверность биологического эксперимента определяется воспроизводимостью, дозовой и/или временной зависимостью наблюдаемых эффектов. В экспериментах по изучению когнитивных функ-

ций для получения достоверных данных и их адекватной интерпретации важно учитывать целый ряд факторов, способных повлиять на регистрируемые эффекты и их показатели.

Влияние межвидовых и внутривидовых различий на когнитивные способности грызунов

При оценке влияния ЛС на гиппокамп-зависимое пространственное обучение необходимо принимать во внимание межвидовые различия, поскольку мыши и крысы решают пространственные задачи неодинаково. Так, крысы Long-Evans и мыши C57BL/6 выполняют сходным образом задания «на суше», но по-разному решают задачи в плавательном бассейне [58]. Это наблюдение подтверждают сравнительные исследования самцов крыс Wistar и мышей C57BL/6 в водном лабиринте Морриса: крысы более успешны в запоминании местоположения скрытой платформы, поскольку используют пространственную память, тогда как у мышей задействованы непространственные ориентиры, указывающие на различные подходы к выполнению задач пространственного обучения [59]. Кроме того, выявлены различия между линиями одного и того же вида, в частности мыши BALB/cA и C57BL/6 демонстрировали разные способности к обучению в водном лабиринте при сходных когнитивных показателях «на суше» [60].

Таким образом, эти различия подчеркивают необходимость учета различий в пространственном обучении между видами и линиями животных при оценке нейротоксического влияния ЛС на когнитивные способности.

Влияние пола грызунов на когнитивные способности

Существуют выраженные половые различия на уровне нейрогенеза и активации новых нейронов в ответ на гиппокамп-зависимые когнитивные задачи у грызунов. Половые различия могут варьировать, поскольку существуют задачи и выбор стратегии поведения, зависящие от пола животных, а также различия в отделах гиппокампа, находящихся под влиянием процесса пространственного обучения. Исследования на грызунах [61, 62] продемонстрировали, что самцы и самки по-разному реагируют на различные стратегии обучения при выполнении задач пространственной навигации. Стратегия места определяется гиппокампом, в то время как ответная реакция или стратегия реагирования управляется стриатумом [63]. Самки крыс предпочитают использовать стратегии реагирования, в то время как самцы крыс для решения тех же задач предпочитают использовать стратегию места [62]. Это подчеркивает важность использования разнополых животных для изучения поведенческих характеристик при изучении новых ЛП.

¹⁷ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть I. М.: Гриф и К; 2012.

Влияние нутриентов на обучение и память у грызунов

Ограничение белка в корме уменьшало дефицит рабочей памяти в Y-лабиринте у мышей [64] и, наоборот, высокобелковая диета ухудшала формирование памяти у самцов крыс линии Wistar в водном лабиринте Морриса [65]. Большинство исследований, связанных с изучением влияния пищевых аминокислот на когнитивные процессы, сосредоточены на изучении триптофана, предшественника серотонина, который является нейротрансмиттером, регулирующим обучение, память и настроение [66]. При содержании крыс на диете с дефицитом триптофана в течение первых двух постнатальных месяцев у них наблюдалось нарушение функций памяти при исследовании в водном лабиринте Морриса [67, 68].

Чрезмерная и продолжительная диета с высоким содержанием жиров сдерживает развитие памяти у грызунов и повреждает гиппокампальные нейроны у многих линий мышей и крыс [69, 70].

Таким образом, при оценке нейротоксического действия новых потенциальных ЛС на когнитивные функции у грызунов необходимо учитывать характеристики кормов, предлагаемых лабораторным животным.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В силу сложившейся практики доклинических исследований и логистики проведения разнонаправленных экспериментов в ходе их выполнения оценка нейротоксичности новых ЛП выполняется на разных этапах исследования: при определении острой и хронической токсичности, репродуктивной токсичности, фармакологической безопасности, зачастую не только разными исследователями, но также в разных учреждениях. Подобная разрозненность затрудняет интерпретацию и экстраполяцию пула экспериментальных данных, крайне важных с точки зрения перспектив разрабатываемых новых лекарственных препаратов. Более того, подобное положение зачастую приводит к слишком позднему заключению об отсутствии перспективности дальнейшей разработки, что влечет за собой неоправданные экономические потери и приводит к неудачам на клинических этапах исследований.

При всей значимости сложившейся системы оценки нейротоксичности приведенные выше материалы свидетельствуют о необходимости более глубокого понимания нюансов исследовательской

и экспертной деятельности в области оценки нейротоксичности, а также разработки интегративного теста, позволяющего с высокой вероятностью отказываться от лекарственных средств, вызывающих как структурные, так и функциональные, в том числе когнитивные, нарушения. Возможно, при соответствующей верификации на эту роль в экспресс-исследованиях смогут претендовать тесты «Острое угашение исследовательско-ориентировочной реакции» и «Экстраполяционное избавление».

Вклад авторов. Авторы совместно готовили все разделы настоящего обзора на всех этапах его написания и несут солидарную ответственность за достоверность сведений и положений, изложенных в представленной работе; **Н. В. Еремина** — поиск первоисточников, анализ составляющих тестов Ирвина и батареи функциональных тестов, подготовка рукописи к представлению в редакцию; **Л. Г. Колик** — описание и анализ подходов к оценке когнитивных функций у экспериментальных животных, факторов, способных повлиять на их проявление; **Р. У. Островская** — вклад в обоснование выбора тестов, рекомендованных для верификации в качестве экспресс-тестов, согласование положений статьи с основными парадигмами психофармакологии и научное редактирование; **А. Д. Дурнев** — постановка задачи и обоснование актуальности работы, обсуждение и обоснование основных положений, научное редактирование статьи.

Authors' contributions. The authors jointly prepared all parts of this review at all stages of its preparation and are jointly liable for the accuracy of the information and statements set forth in the present paper; **Natalia V. Eremina**—search for primary sources, analysis of Irwin tests and the functional observational battery, preparation of the paper for submission to the editorial office; **Larisa G. Kolik**—description and analysis of approaches to cognitive functions assessment in experimental animals and factors that can affect their manifestation; **Rita U. Ostrovskaya**—contribution to the justification of the choice of tests recommended for verification as rapid tests, alignment of the judgments presented in the paper with the main psychopharmacology paradigms, scientific editing of the paper; **Andrey D. Durnev**—formulation of the aim and relevance of the study, discussion and justification of the main issues, scientific editing of the paper.

Благодарности. Работа проведена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

Конфликт интересов. А. Д. Дурнев является членом редколлегии журнала «Вестник НЦЭСМП», остальные авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Conflict of interest. Andrey D. Durnev is a member of the Editorial Board of "The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products", the other authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Kerbrat A, Ferré JC, Fillatre P, Ronziere T, Vannier S, Carsin-Nicol B, et al. Acute neurologic disorder from an inhibitor of fatty acid amide hydrolase. *N Engl J Med*. 2016;375(18):1717–25. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1604221>
- Valentin JP, Hammond T. Safety and secondary pharmacology: successes, threats, challenges and opportunities. *J Pharmacol Toxicol Methods*. 2008;58(2):77–87. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2008.05.007>
- Cook D, Brown D, Alexander R, March R, Morgan P, Satterthwaite M, Pangalos MN. Lessons learned from the fate of AstraZeneca's drug pipeline: a five-dimensional framework. *Nat Rev Drug Discov*. 2014;13(6):419–31. <https://doi.org/10.1038/nrd4309>
- Walker AL, Imam SZ, Roberts RA. Drug discovery and development: Biomarkers of neurotoxicity and neurodegeneration. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2018;243(13):1037–45. <https://doi.org/10.1177/1535370218801309>

5. Costa LG. Overview of neurotoxicology. *Curr Protoc Toxicol.* 2017;74(1):11.1.1–11.1.11. <https://doi.org/10.1002/cptx.36>
6. Fang H, Harris SC, Liu Z, Zhou G, Zhang G, Xu J, et al. FDA drug labeling: rich resources to facilitate precision medicine, drug safety, and regulatory science. *Drug Discov Today.* 2016;21(10):1566–70. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2016.06.006>
7. Pugsley MK, Authier S, Curtis MJ. Principles of safety pharmacology. *Br J Pharmacol.* 2008;154(7):1382–99. <https://doi.org/10.1038/bjp.2008.280>
8. 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. <https://doi.org/10.1007/bf00401402>
9. Moser VC. Screening approaches to neurotoxicity: A functional observational battery. *J Am Coll Toxicol.* 1989;8(1):85–93. <https://doi.org/10.3109%2F10915818909009095>
10. Moser VC, McCormick JP, Creason JP, MacPhail RC. Comparison of chlormedifform and carbaryl using a functional observational battery. *Fundam Appl Toxicol.* 1988;11(2):189–206. [https://doi.org/10.1016/0272-0590\(88\)90144-3](https://doi.org/10.1016/0272-0590(88)90144-3)
11. Moser VC, MacPhail RC. Neurobehavioral effect of triadimefon, a triazole fungicide, in male and female rats. *Neurotoxicol Teratol.* 1989;11(3):285–93. [https://doi.org/10.1016/0892-0362\(89\)90071-8](https://doi.org/10.1016/0892-0362(89)90071-8)
12. Ewart L, Milne A, Adkins D, Benjamin A, Bialecki R, Chen Y, et al. A multi-site comparison of *in vivo* safety pharmacology studies conducted to support ICH S7A & B regulatory submissions. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2013;68(1):30–43. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2013.04.008>
13. Gauvin DV, Yoder JD, Holdsworth DL, Harter ML, May JR, Cotey N, et al. The standardized functional observational battery: Its intrinsic value remains in the instrument of measure: the rat. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2016;82:90–108. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2016.08.001>
14. Mathiasen JR, Moser VC. The Irwin test and functional observational battery (FOB) for assessing the effects of compounds on behavior, physiology, and safety pharmacology in rodents. *Curr Protoc Pharmacol.* 2018;83(1):e43. <https://doi.org/10.1002/cpph.43>
15. Redfern WS, Dymond A, Strang I, Storey S, Grant C, Marks L, et al. The functional observational battery and modified Irwin test as global neurobehavioral assessments in the rat: Pharmacological validation data and a comparison of methods. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2019;98:106591. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.106591>
16. Roux S, Sablé E, Porsolt RD. Primary observation (Irwin) test in rodents for assessing acute toxicity of a test agent and its effects on behavior and physiological function. *Curr Protoc Pharmacol.* 2005;Chapter 10:Unit 10.10. <https://doi.org/10.1002/0471141755.ph1010s27>
17. Moser VC. Functional assays for neurotoxicity testing. *Toxicol Pathol.* 2011;39(1):36–45. <https://doi.org/10.1177/0192623310385255>
18. Gauvin DV, Zimmermann ZJ. FOB vs modified Irwin: What are we doing? *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2019;97:24–8. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.02.008>
19. Moser VC. Applications of a neurobehavioral screening battery. *Int J Toxicol.* 1991;10(6):661–9. <https://doi.org/10.3109/10915819109078658>
20. Mead AN, Amouzadeh HR, Chapman K, Ewart L, Girola A, Jackson SJ, et al. Assessing the predictive value of the rodent neurofunctional assessment for commonly reported adverse events in phase I clinical trials. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2016;80:348–57. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2016.05.002>
21. Fonck C, Easter A, Pietras MR, Bialecki RA. CNS adverse effects: From functional observation battery/irwin tests to electrophysiology. *Handb Exp Pharmacol.* 2015;229:83–113. https://doi.org/10.1007/978-3-662-46943-9_4
22. Lynch JJ 3rd, Castagné V, Moser PC, Mittelstadt SW. Comparison of methods for the assessment of locomotor activity in rodent safety pharmacology studies. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2011;64(1):74–80. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2011.03.003>
23. Himmel HM, Delaunoy A, Deurincq M, Dinko T, Eriksson Faelker TM, Habermann C, et al. Variability of non-clinical behavioral CNS safety assessment: An intercompany comparison. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2019;99:106571. <https://doi.org/10.1016/j.vascn.2019.03.002>
24. Бессалова ЕЮ. Методика исследования поведения крыс в условиях «Открытого поля». *Нейронауки.* 2011;7(2):106–9. [Bessalova EYu. Methods of researching the behavior of rats in an open field. *Neurons* = *Neuroscience.* 2011;7(2):106–9 (In Russ.)]
25. Górská AM, Kamińska K, Wawrzczak-Bargieła A, Costa G, Morelli M, Przewlocki R, et al. Neurochemical and neurotoxic effects of MDMA (Ecstasy) and Caffeine after chronic combined administration in mice. *Neurotox Res.* 2018;33(3):532–48. <https://doi.org/10.1007/s12640-017-9831-9>
26. Umezawa M, Onoda A, Korshunova I, Jensen A, Koponen IK, Jensen KA, et al. Maternal inhalation of carbon black nanoparticles induces neurodevelopmental changes in mouse offspring. *Part Fibre Toxicol.* 2018;15(1):36. <https://doi.org/10.1186/s12989-018-0272-2>
27. Walsh RN, Cummins RA. The open-field test: a critical review. *Psychol Bull.* 1976;83(3):482–504. PMID: 17582919
28. Stanford SC. The open field test: reinventing the wheel. *J Psychopharmacol.* 2007;21(2):134–5. <https://doi.org/10.1177/0269881107073199>
29. Blizzard DA, Takahashi A, Galsworthy MJ, Martin B, Koide T. Test standardization in behavioural neuroscience: a response to Stanford. *J Psychopharmacol.* 2007;21(2):136–9. <https://doi.org/10.1177/0269881107074513>
30. Bondy SC, Campbell A. Developmental neurotoxicology. *J Neurosci Res.* 2005;81(5):605–12. <https://doi.org/10.1002/jnr.20589>
31. Ornoy A. Valproic acid in pregnancy: How much are we endangering the embryo and fetus? *Reprod Toxicol.* 2009;28(1):1–10. <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2009.02.014>
32. Veroniki AA, Rios P, Cogo E, Straus SE, Finkelstein Y, Kealey R, et al. Comparative safety of antiepileptic drugs for neurological development in children exposed during pregnancy and breast feeding: a systematic review and network meta-analysis. *BMJ Open.* 2017;7(7):e017248. <https://doi.org/10.1136/bmjopen-2017-017248>
33. Bauer AZ, Kriebel D, Herbert MR, Bornehag CG, Swan SH. Prenatal paracetamol exposure and child neurodevelopment: A review. *Horm Behav.* 2018;101:125–47. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2018.01.003>
34. Healy D, Le Noury J, Mangin D. Links between serotonin reuptake inhibition during pregnancy and neurodevelopmental delay/spectrum disorders: A systematic review of epidemiological and physiological evidence. *Int J Risk Saf Med.* 2016;28(3):125–41. <https://doi.org/10.3233/JRS-160726>
35. Sie SD, Wennink JM, van Driel JJ, Winkel AGW, Boer K, Casteelen G, van Weissenbruch MM. Maternal use of SSRIs, SNRIs and NaSSAs: Practical recommendations during pregnancy and lactation. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2012;97(6):F472–6 [Erratum. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed.* 2013;98(2):F180]. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2011-214239>
36. Manson JE. Prenatal exposure to sex steroid hormones and behavioral/cognitive outcomes. *Metabolism.* 2008;57(Suppl 2):S16–21. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2008.07.010>
37. Grandjean P, Landrigan PJ. Developmental neurotoxicity of industrial chemicals. *Lancet.* 2006;368(9553):2167–78. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)69665-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)69665-7)
38. Grandjean P, Landrigan PJ. Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol.* 2014;13(3):330–8. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70278-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70278-3)
39. Liu L, Zhang D, Rodzinka-Pasko JK, Li YM. Environmental risk factors for autism spectrum disorders. *Nervenarzt.* 2016;87(Suppl 2):55–61. <https://doi.org/10.1007/s00115-016-0172-3>
40. London Z, Albers JW. Toxic neuropathies associated with pharmaceutical and industrial agents. *Neural Clin.* 2007;25(1):257–76. <https://doi.org/10.1016/j.ncl.2006.10.001>
41. Adityanjee, Munshi KR, Thampy A. The syndrome of irreversible lithium-effectuated neurotoxicity. *Clin Neuropsychopharmacol.* 2005;28(1):38–49. <https://doi.org/10.1097/01.wnf.0000150871.52253.b7>
42. Vlisides P, Xie Z. Neurotoxicity of general anesthetics: an update. *Curr Pharm Des.* 2012;18(38):6232–40. <https://doi.org/10.2174/138161212803832344>
43. Лебедев ИВ, Плещачева МГ, Анохин КВ. Анализ поведения мышей линии C57BL/6 в аренах «открытого поля» разного размера. *Журнал высшей нервной деятельности им. И.П. Павлова.* 2012;62(4):485–96. [Lebedev IV, Pleskacheva MG, Anokhin KV. C57BL/6 mice open field behavior qualitatively depends on arena size. *Zhurnal vysshey nervnoy deyatel'nosti im. I.P. Pavlova* = *I.P. Pavlov Journal of Higher Nervous Activity.* 2012;62(4):485–96 (In Russ.)]
44. Suter L, Babiss LE, Wheelton EB. Toxicogenomics in predictive toxicology in drug development. *Chem Biol.* 2004;11(2):161–71. <https://doi.org/10.1016/j.chembiol.2004.02.003>
45. Vorhees CV, Williams MT. Morris water maze: Procedures for assessing spatial and related forms of learning and memory. *Nat Protoc.* 2006;1(2):848–58. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.116>

46. Rosenfeld CS, Ferguson SA. Barnes maze testing strategies with small and large rodent models. *J Vis Exp*. 2014;(84):e51194. <https://doi.org/10.3791/51194>
47. Leger M, Quideville A, Bouet V, Haelewyn B, Boulouard M, Schumann-Bard P, Fleret T. Object recognition test in mice. *Nat Protoc*. 2013;8(12):2531–7. <https://doi.org/10.1038/nprot.2013.155>
48. Bevins RA, Besheer J. Object recognition in rats and mice: a one-trial non-matching-to-sample learning task to study "recognition memory". *Nat Protoc*. 2006;1(3):1306–11. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.205>
49. Daldrup T, Remmes J, Lesting J, Gaburro S, Fendt M, Meuth P, et al. Expression of freezing and fear-potentiated startle during sustained fear in mice. *Genes Brain Behav*. 2015;14(3):281–91. <https://doi.org/10.1111/gbb.12211>
50. Alamed J, Wilcock DM, Diamond DM, Gordon MN, Morgan D. Two-day radial-arm water maze learning and memory task; robust resolution of amyloid-related memory deficits in transgenic mice. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1671–9. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.275>
51. Hölter SM, Garrett L, Einicke J, Sperling B, Dirscherl P, Zimprich A, et al. Assessing cognition in mice. *Curr Protoc Mouse Biol*. 2015;5(4):331–58. <https://doi.org/10.1002/9780470942390.mo150068>
52. Островская РУ, Гудашева ТА. Выявление активности ноотропов по показателю острого угашения ориентировочной реакции. *Бюллетень экспериментальной биологии и медицины*. 1991;111(5):498–500. [Ostrovskaya RU, Gudasheva TA. Rapid inhibition of exploratory movements as a test of nootropic activity. *Bull Exp Biol Med*. 1991;111(5):644–7] <https://doi.org/10.1007/BF00841006>
53. Бондаренко НА. Изучение возможности формирования целенаправленного поведения у крыс с «одной пробы» в тесте «Экстраполяция извлечения». В кн.: Харитонов АН, ред. *Эволюционная и сравнительная психология в России: традиции и перспективы*. М.: Институт психологии РАН. 2013. С. 122–30. [Bondarenko NA. The study of the possibility of the formation of targeted behavior in rats from the one test in the test Extrapolation disposal. In: Kharitonov AN, ed. *Evolutionary and comparative psychology in Russia: traditions and prospects*. Moscow: Institut psikhologii RAN; 2013. P. 122–30 (In Russ.)]
54. Андреева АК, Дубина ДШ, Фельдман БВ, Горшков ДА, Галимзянова АХ. Влияние эритропозина на психомоторную активность. *Естественные науки*. 2009;(4):87–9. [Andreeva AK, Dubina DSh, Feldman BV, Gorshkov DA, Galimzyanova AKh. Influence of erythropoietin on psychomotor activity. *Estestvennye nauki = Natural Sciences*. 2009;(4):87–9 (In Russ.)]
55. Багметова ВВ, Бородинкина ЛЕ, Тюренков ИН, Берестовицкая ВМ, Васильева ОС. Сравнительное экспериментальное изучение ноотропных свойств аналога ГАМК фенибута и его метилового эфира. *Фундаментальные исследования*. 2011;10(3):467–71. [Bagmetova VV, Borodinkina LE, Tyurenkov IN, Berestovitskaya VM, Vasilieva OS. A comparative experimental study of the nootropic properties of the GABA analogue of phenibut and its methyl ester. *Fundamentalnye issledovaniya = Fundamental Research*. 2011;10(3):467–71 (In Russ.)]
56. Гайнетдинов АР, Фесенко ЗС, Хисматуллина ЗР. Поведенческие изменения у крыс-гетерозигот по нокдауту гена дофаминового транспортера DAT. *Биомедицина*. 2020;16(1):82–8. [Gaynetdinov AR, Fesenko ZS, Khismatullina ZR. Behavioral changes in heterozygous rats by gene knockout of the dopamine transporter (DAT). *Biomeditsina = Biomedicine*. 2020;16(1):82–8 (In Russ.)]. <https://doi.org/10.33647/2074-5982-16-1-82-88>
57. Соломина АС, Шредер ЕД, Колик ЛГ, Дурнев АД. Исследование влияния фабомотизола на поведенческие нарушения у потомства крыс, подвергнутых действию табачного дыма и алкоголя. *Фармакокинетика и фармакодинамика*. 2018;(2):3–11. [Solomina AS, Shreder ED, Kolik LG, Durnev AD. Study of fabomotizole effect on behavioral disorders in rat offsprings exposed to tobacco smoke and ethanol. *Farmakokinetika i farmakodinamika = Pharmacokinetics and Pharmacodynamics*. 2018;(2):3–11 (In Russ.)] <https://doi.org/10.24411/2587-7836-2018-10008>
58. Whishaw IQ, Tomie JA. Of mice and mazes: Similarities between mice and rats on dry land but not water mazes. *Physiol Behav*. 1996;60(5):1191–7. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(96\)00176-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(96)00176-x)
59. Frick KM, Stillner ET, Berger-Sweeney J. Mice are not little rats: Species differences in a one-day water maze task. *Neuroreport*. 2000;11(16):3461–5. <https://doi.org/10.1097/00001756-200011090-00013>
60. Yoshida M, Goto K, Watanabe S. Task-dependent strain difference of spatial learning in C57BL/6N and BALB/c mice. *Physiol Behav*. 2001;73(1–2):37–42. [https://doi.org/10.1016/s0031-9384\(01\)00419-x](https://doi.org/10.1016/s0031-9384(01)00419-x)
61. Grissom EM, Hawley WR, Hodges KS, Fawcett-Patel JM, Dohanich GP. Biological sex influences learning strategy preference and muscarinic receptor binding in specific brain regions of prepubertal rats. *Hippocampus*. 2013;23(4):313–22. <https://doi.org/10.1002/hipo.22085>
62. Hawley WR, Grissom EM, Barratt HE, Conrad TS, Dohanich GP. The effects of biological sex and gonadal hormones on learning strategy in adult rats. *Physiol Behav*. 2012;105(4):1014–20. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2011.11.021>
63. Maguire EA, Burgess N, Donnett JG, Frackowiak RS, Frith CD, O'Keefe J. Knowing where and getting there: a human navigation network. *Science*. 1998;280(5365):921–4. <https://doi.org/10.1126/science.280.5365.921>
64. Parrella E, Maxim T, Maialetti F, Zhang L, Wan J, Wei M, et al. Protein restriction cycles reduce IGF-1 and phosphorylated Tau, and improve behavioral performance in an Alzheimer's disease mouse model. *Aging Cell*. 2013;12(2):257–68. <https://doi.org/10.1111/ace.12049>
65. Méndez-López M, Méndez M, Arias J, Arias JL. Effects of a high protein diet on cognition and brain metabolism in cirrhotic rats. *Physiol Behav*. 2015;149:220–8. <https://doi.org/10.1016/j.physbeh.2015.05.038>
66. Roberts AJ, Hedlund PB. The 5-HT(7) receptor in learning and memory. *Hippocampus*. 2012;22(4):762–71. <https://doi.org/10.1002/hipo.20938>
67. Olvera-Cortés E, Pérez-Vega MI, Barajas-López G, Del Angel-Meza AR, González-Burgos I, Fera-Velasco A. Place learning impairment in chronically tryptophan-restricted rats. *Nutr Neurosci*. 1998;1(3):223–35. <https://doi.org/10.1080/1028415X.1998.11747232>
68. Yagi S, Galea LAM. Sex differences in hippocampal cognition and neurogenesis. *Neuropsychopharmacology*. 2019;44(1):200–13. <https://doi.org/10.1038/s41386-018-0208-4>
69. Barron AM, Tokunaga M, Zhang MR, Ji B, Suhara T, Higuchi M. Assessment of neuroinflammation in a mouse model of obesity and β -amyloidosis using PET. *J Neuroinflammation*. 2016;13(1):221. <https://doi.org/10.1186/s12974-016-0700-x>
70. Ledreux A, Wang X, Schultzberg M, Granholm AC, Freeman LR. Detrimental effects of a high fat/high cholesterol diet on memory and hippocampal markers in aged rats. *Behav Brain Res*. 2016;312:294–304. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2016.06.012>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Еремина Наталья Вахитовна, канд. биол. наук. *Natalia V. Eremina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7226-5505>
Колик Лариса Геннадьевна, д-р биол. наук, профессор РАН. *Larisa G. Kolik*, Dr. Sci. (Biol.), Professor of RAS. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9847-8058>
Островская Рита Ушеровна, д-р мед. наук, профессор. *Rita U. Ostrovskaya*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3654-6182>
Дурнев Андрей Дмитриевич, д-р мед. наук, профессор, член-корр. РАН. *Andrey D. Durnev*, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

Статья поступила 18.05.2020
 После доработки 29.06.2020
 Принята к печати 03.09.2020

Article was received 18 May 2020
 Revised 29 June 2020
 Accepted for publication 3 September 2020