

## ВАЛІДАЦІЯ НЕЙРОТОКСИКОЛОГІЧНИХ МЕТОДІВ СКРИНІНГУ ХІМІЧНИХ РЕЧОВИН ІЗ ЗАСТОСУВАННЯМ РЕФЕРЕНТНИХ СПОЛУК З РІЗНОСПРЯМОВАНИМ ВПЛИВОМ НА НЕРВОВУ СИСТЕМУ

М.Л. Зінов`єва<sup>1</sup>, П.Г. Жмілько<sup>1</sup>, В.В. Кірсенко<sup>2</sup>, О.М. Струменська<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ДП "Науковий центр превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І.Медведя МОЗ України", м. Київ, Україна

<sup>2</sup>ДУ «Інститут медицини праці імені Ю.І. Кундієва НАМН України», м. Київ, Україна

<sup>3</sup>Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

**РЕЗЮМЕ.** Валідація методів на етапі їхнього впровадження та при подальшому застосуванні є важливою складовою забезпечення якості даних токсикологічного дослідження. У Науковому центрі превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України впроваджено методи скринінгу нейротоксичного впливу хімічних речовин – батарею клініко-функціональних тестів (КФТ) та метод оцінки рухової активності у «відкритому полі» для щурів.

**Мета дослідження.** Визначення специфічності, чутливості та надійності впроваджених методів за впливу референтних нейротропних речовин з дією різної спрямованості – хлорпромазину та кофеїну на показники неврологічного стану щурів самок Wistar Han.

**Результати.** Було показано, що батарея КФТ та метод оцінки рухової активності у «відкритому полі» є релевантними для виявлення специфічного впливу та токсикодинаміки референтних речовин, що мають різноспрямовану дію на нервову систему щурів. Визначено чутливість даних методів за найменшою діючою дозою кофеїну та хлорпромазину. Отримано дані щодо відтворюваності результатів тестів.

**Ключові слова:** валідація, нейротоксичність, хлорпромазин, кофеїн.

Ризики для здоров'я населення внаслідок інтенсивного промислового використання хімічних речовин ставлять високі вимоги щодо якості даних токсикологічного дослідження. Саме на підвищення ефективності токсикологічної оцінки спрямоване впровадження концепції взаємного прийняття даних (Decision of the Council concerning the mutual acceptance of data in the assesment of chemicals, 1981) та принципів належної лабораторної практики (Directive 2004/10/EC of the European Parliament and of the Council, 2004). Ці документи відображають необхідність глобальної уніфікації та стандартизації дослідницької методології. Завдяки цьому отримується більший обсяг інформації щодо токсичних властивостей хімічних речовин та скорочуються матеріальні та часові витрати на їх дослідження. Валідація токсикологічних методів (тестів) є ключовим етапом їх практичного впровадження як на рівні міжнародних стандартів дослідження, так і в окремій дослідницькій установі. Ця процедура спрямована на забезпечення високої якості даних,

отриманих за допомогою того чи іншого методу, та їх ефективне використання у процесі оцінювання ризиків для здоров'я, пов'язаних з застосуванням досліджуваної хімічної речовини. Цінність токсикологічного тесту полягає в його здатності кількісно оцінювати певну кінцеву точку і таким чином отримувати максимально об'єктивну інформацію щодо впливу речовини на організм. Впровадження нового тесту в практику потребує попередньої демонстрації його надійності, специфічності та чутливості, тобто валідації [1, 2].

Нейротоксикологічне дослідження посідає одну з ключових позицій в оцінці реакції організму на токсичний вплив хімічних речовин та інших факторів, оскільки нервова (НС) система регулює і координує діяльність всіх органів і систем. Так, комплекс нейроповедінкових тестів на етапі скринінгу токсичних ефектів є невід'ємною складовою дослідження впливу на НС, а також обов'язковим компонентом сучасної методології дослідження підострого, субхронічного та ембріотоксичного впливів хімічних речовин. Сьогодні первинна

оцінка нейротоксикологічного потенціалу хімічних речовин включена до більше ніж 20 керівництв Європейського союзу (OECD Test Guidelines for the Chemicals) [3]. Кінцеві точки нейротоксичного впливу є індикаторами змін біологічних процесів у НС, її реакцій та морфологічних ушкоджень за дії токсикантів. Для валідаційних досліджень використовуються хімічні речовини, нейротропний вплив яких добре досліджений та є специфічним при оцінці впливу на ті чи інші кінцеві точки. Достатньо повний перелік таких референс-субстанцій, які застосовуються як позитивний контроль у нейротоксикологічному дослідженні, надано в документах OECD [1]. Як було зазначено вище, валідація методів проводиться на різних організаційних рівнях. Так, методичні рекомендації, запропоновані для національного, або міжнародного використання, проходять валідацію шляхом мультилабораторних досліджень і мають основною метою відтворюваність методології тестування в різних лабораторіях [4]. Основні питання, що виникають у ході планування та виконання валідаційних досліджень детально висвітлені в роботі J.P. Maurissen та V.R. Marable [5].

Внутрішньолабораторні валідаційні нейротоксикологічні дослідження мають своєю метою підтвердження адекватності та релевантності всієї складної системи лабораторної практики. Для тестів, що проводяться *in vivo*, валідація набуває особливого значення, оскільки реакції НС є інтегральними і залежать від впливу багатьох чинників – змін навколишнього середовища, професіоналізму персоналу при поводженні з тваринами та ін. Крім того, незважаючи на зусилля об'єктивізувати оцінку поведінки тварин шляхом застосування засобів автоматичної реєстрації [6, 7], візуальне, суб'єктивне оцінювання та його залежність від кваліфікації дослідника також може впливати на якість даних, що отримані. Тому обов'язковою умовою дотримання неупередженості персоналу при обстеженні тварин є проведення його «всліпу», без інформування про речовини, які застосовувалися.

Процес внутрішньолабораторної валідації нейротоксикологічних методів першого рівня [8] (комплекс клінічних спостере-

жень та функціональних тестів, дослідження рухової активності тварин) передбачає визначення чутливості цих методів шляхом дослідження залежності спостережуваних кінцевих точок від дози референтних речовин [9] та встановлення мінімальної дози, що чинить ефект. Отримані результати можуть бути використані для міжлабораторних порівняльних досліджень, моніторингу якості нейротоксикологічного дослідження у дослідницькій лабораторії, а також для створення внутрішньої бази історичного контролю. У Науковому центрі превентивної токсикології, харчової та хімічної безпеки імені академіка Л.І. Медведя МОЗ України (НЦ) впроваджено у практику батарею клініко-функціональних тестів (КФТ) для щурів та метод оцінки їхньої рухової активності у «відкритому полі». Зважаючи на регулюючу функцію НС, важливим є встановлення чутливості методу щодо виявлення впливу різної спрямованості – як стимулюючого, так і пригнічуючого.

У попередньо проведених дослідженнях [10] було показано, що впроваджена батарея КФТ релевантно відображає пригнічення НС щурів у відповідь на одноразове внутрішньошлункове введення хлорпромазину (ХП) у дозах 8 та 16 мг/кг. Показано, що статистично достовірні зміни ( $p \leq 0,5$ ) за дії даної референтної речовини у вищій дослідженій дозі виявлялися у період 1/2-4 години після введення і характеризувалися зниженням загальної активності тварин, їх сенсомоторних реакцій, м'язового тону, сонливостю, вокалізацією у відповідь на дотик, стереотипією, мідріазом. Дослідження поведінки у «відкритому полі» встановило появу латентного періоду початку руху тварин, зниження локомоторної активності, кількості стойок. У дозі 8 мг/кг ХП викликав менш виражене пригнічення НС: послаблення реакції тварин на наближення та дотик, зниження м'язового тону, локомоторної активності. Максимальний прояв змін, за критерієм їх статистичної значущості, спостерігався у коротший період – 1-4 години після введення ХП. Таким чином, було показано специфічність батареї КФТ для діагностики пригнічуючого впливу на НС щурів.

Поряд з клініко-функціональними теста-

ми, кількісна оцінка рухової активності тварин у «відкритому полі», є одним з ефективних предикторів нейротоксичної дії хімічних речовин на етапі скринінгу. Сьогодні використовуються різні модифікації цього методу, адаптовані як для візуальної, так і автоматизованої реєстрації рухової активності гризунів [11]. У НЦ накопичено значний досвід використання цього тесту за умов візуальної фіксації даних, стандартизовані умови його виконання.

**Мета роботи.** Визначення специфічності і чутливості батареї клініко-функціональних тестів за дії кофеїну, що чинить стимулюючий вплив на НС, а також визначення чутливості методу оцінки рухової активності шурів за впливу референтних нейротропних речовин з дією різної спрямованості шляхом дослідження залежності доза-ефект.

**Матеріали та методи дослідження.** Дослід проведено у відповідності до принципів належної лабораторної практики (GLP) та з дотриманням міжнародних рекомендацій щодо нейротоксикологічного дослідження [12] на щурах - самках лінії Wistar Han SPF віком 10 тижнів, масою тіла 170-220 г. Тварини були отримані з клініки лабораторних тварин НЦ і пройшли акліматизацію упродовж 5 днів. Тварини утримувалися в клітках Т-4 (40Ч30Ч15 см) по 1 або 2 особини в умовах віварію SPF при штучному освітленні з 12-годинним циклом та вільному доступі шурів до корму та води. Усі процедури з тваринами виконували згідно з міжнародними правилами та нормами (European Communities Council Directives of 24 November, 1986, 86/609/EEC).

**Референтні речовини.** У дослідженні використано хлорпромазину (ХП) гідрохлорид, 2,5% розчин в ампулах виробництва «Артеріум» (Україна), кофеїну (К) бензоат натрію, 10% розчин в ампулах виробництва ПАО «Фармацевтична фірма «Дарниця» (Україна). Речовини вводили внутрішньошлунково одноразово натще. В якості розчинника використовували воду питну, очищену шляхом подвійного осмосу. Концентрації розчинів, що вводилися, були приведені до об'єму введення 5 мл/кг. Для забезпечення оцінки досліджуваних показників «всліпу» розчини готувалися

персоналом, що не брав участі у спостереженні за тваринами, а готовим розчином надавалися цифрові коди.

**Дизайн дослідження.** Батарея КФТ виконувалася як описано в [10]. Показники оцінювали за шкалою, наведеною у табл. 1.

Таблиця 1

**Шкала оцінювання показників батареї клініко-функціональних тестів у балах**

<b>Реактивність тварини (у відповідь на наближення і дотик):</b>		
0 – відсутня		
1 – знижена		
2 – нормальна		
3 – помірно підвищена (супроводжується вокалізацією)		
4 – гіперреакція з проявом агресії		
<b>Тактильно-больова реакція (у відповідь на механічний вплив)</b>		
0 – відсутня		
1 – знижена		
2 – нормальна		
3 – підвищена		
4 – гіперреакція з вокалізацією		
<b>Аудіомоторна реакція (у відповідь на звуковий сигнал)</b>		
0 – відсутня		
1 – мінімальна		
2 – нормальна		
3 – підвищена		
4 – гіперреакція (stretch attend posture)		
<b>М'язовий тонус</b>		
0 – атонія		
1 – знижений		
2 – нормальний (пружний тонус черевної стінки і кінцівок)		
3 – підвищений		
4 – гіпертонус (ригідність м'язів)		
<b>Офтальмоскопічне дослідження</b>		
<i>Стан зіниці</i>	<i>Ступінь відкриття очної щілини</i>	<i>Зіничний рефлекс</i>
0 – мідріаз	0 – закрита	0 – відсутній
1 – нормальний	1 – частково прикрита	2 – присутній
2 – міоз	2 – повністю відкрита	
	3 – екзофтальм	

*Примітка:* Для визначення стану «2» застосовуються результати огляду групи інтактних тварин, що не беруть участі в дослідженні.

Дослідження впливу К проведено на 3 групах по 5 щурів які отримували розчинник (контроль) та К в дозах 12 та 24 мг/кг. У тварин реєстрували показники батареї КФТ у динаміці – через 1/4, 1/2, 1, 2, 4 та 24 години після введення К. Оцінка поведінкових реакцій у «відкритому полі» виконувалася через 2 години після введення речовин та включала визначення латентного періоду руху; горизонтальної (локомоторної) активності (загальної та у центральній зоні «відкритого поля»), оцінку вертикальної рухової активності за кількістю стойок, інтенсивності дефекації за кількістю болюсів, реєстрацію середньої тривалості грумінгу.

Окремо проведено дослідження показників рухової активності щурів у «відкритому полі» на 6 групах тварин по 5 особин. Три групи щурів отримували розчинник (контроль), ХП у дозах 4 мг/кг та 8 мг/кг відповідно. Інші три групи отримували розчинник (контроль), К у дозах 12 мг/кг та 24 мг/кг відповідно. Показники реєстрували через 1 годину після введення речовин. Визначали локомоторну (горизонтальну) та вертикальну активність.

Статистичну обробку результатів дослідження проводили за допомогою  $t$  теста для неперервних даних, та критерія Манна-Уїтні для описових, бінарних та рангових показників за граничним рівнем значущості змін  $p < 0,05$ .

**Результати дослідження.** Оцінка стану щурів за показниками батареї КФТ показала відсутність у них сенсомоторних порушень, м'язовий тонус у них був, як у інтактних щурів, тварини були вільні від симптомів, що свідчили б про патологічний стан. Офтальмологічний огляд порушень не виявив. Спостереження у «відкритому полі» показали, що тварини розпочинали рух без латентного періоду. Порушень ходи, координації рухів не спостерігалось, дефекація та грумінг місця не мали. Локомоторна активність тварин контрольної групи складала  $51,2 \pm 1,9$  кв., у тому числі в центральній зоні –  $4,8 \pm 0,6$  кв., кількість стойок –  $8,0 \pm 1,1$  од.

Під впливом К у максимальній дослідженій дозі – дозі 24 мг/кг у щурів спостері-

галися зміни кінцевих точок, що реєструються батареєю КФТ, у період 1/4-2 години (табл. 2). У цей період зростала інтенсивність аудіомоторної реакції тварин та реакції щодо наближення та дотик. У поодиноких випадках спостерігалася стереотипічне принохування та підсилювалася ноцицептивна реактивність. Офтальмоскопічний огляд відмінностей від контрольної групи не виявив. Після введення К у дозі 12 мг/кг у поодиноких тварин у період 1/2 1 година після введення спостерігалася слабка симптоматика ( $p > 0,05$ ), подібна до тієї, що виявлялася за дії більшої дози референтної речовини. За критерієм статистичної достовірності ( $p < 0,05$ ) змін у динаміці показників батареї КФТ визначено час максимального прояву симптомів впливу К – 1/2 2 години.

Дослідження поведінкових показників у «відкритому полі» (табл. 3) через 2 години впливу К у дозі 24 мг/кг виявило активацію дефекації у більшості тварин ( $p < 0,05$ ), спостерігалася тенденція до виконання грумінгу ( $p > 0,05$ ). Змін показників рухової активності (локомоторної активності та кількості стойок), латентного періоду руху тварин не спостерігалось. Аналогічні зміни у тварин викликав К у дозі 12 мг/кг, при цьому інтенсивність дефекації була менш вираженою, ніж за дії більшої дози. Одержані дані підтвердили, що період максимального прояву симптоматики К становить 1/2-2 години. За даними спостережень за поведінкових реакцій щурів самок у відкритому полі, чутливість батареї КФТ за дії К була на рівні мінімальної дослідженої дози – 12 мг/кг.

У цілому, застосовані тести адекватно відображали вплив К на функціональний стан НС щурів – самок. Батарея КФТ показала посилення сенсомоторних реакцій, характерне для дії даної речовини [12], при спостереженні у «відкритому полі» мала місце залежна від дози активація дефекації у щурів, що також є специфічним проявом впливу К [13]. Чутливість методу за критерієм статистичної достовірності змін встановлено на рівні 12 мг/кг.

Оцінка рухової активності у «відкритому полі» через 1 годину (табл. 4) дозволила

**Частота змін показників батареї КФТ після введення  
кофеїну в дозах 12 і 24 мг/кг у динаміці (n=5)**

Показник	Ступінь вираженості, бал	К, 12 мг/кг						К, 24 мг/кг					
		Строк дослідження, години											
		1/4	1/2	1	2	3	24	1/4	1/2	1	2	3	24
Аудиомоторна реакція	0												
	1												
	2												
	3			3					5*	5*	5*		
	4												
Тактильно-больова чутливість	0												
	1												
	2												
	3			1					2	1			
	4												
Реакція на наближення і дотик	0												
	1												
	2												
	3			1					5*				
	4												
Клінічний стан	СТ			1				1					

Примітки: 1. У таблиці зазначено кількість тварин у групі, у яких виявлено зміни відносно контролю. 2. СТ- стереотипічні рухи 3. \* -  $p < 0,05$  (критерій Манна-Уїтні)

Таблиця 3

**Показники поведінки щурів у «відкритому полі» через 2 години впливу кофеїну  
в дозах 12 та 24 мг/кг ( $M \pm m$ , n=5)**

Група тварин	Рухова активність			ЛП, сек.	Дефекація, бол.	Грумінг, сек.
	Локомоторна, кв.		Стойки, од.			
	загальна	у центральній зоні «поля»				
Контроль	51,2±1,9	4,8±0,6	8,0±1,1	0,0	0,0	0,0
К, 12 мг/кг	54,4±6,7	4,0±1,5	7,6±1,3	0,0	1,6±0,9* (4/5**)	0,4 (1/5)
К, 24 мг/кг	52,8±6,2	2,4±1,7	7,0±1,3	0,0	4,4±1,7* (4/5**)	2,0±1,5 (3/5)

Примітки:

- У лапках зазначена частота виявлення поведінкового акту в групі тварин.
- \* –  $p < 0,05$  (t-test)
- \*\* –  $p < 0,05$  (критерій Манна-Уїтні)

Таблиця 4  
**Показники рухової активності щурів у «відкритому полі» через 1 годину після введення кофеїну і хлорпромазину ( $M \pm m$ ,  $n=10$ )**

Група тварин	Локомоторна активність, кв.	Стойки, од
Контроль	58,7±7,4	14,3±1,7
К, 12 мг/кг	60,9±3,9	19,7±0,9*
К, 24 мг/кг	62,7±4,6	22,0±0,7*
Контроль	50,6±8,3	11,6±1,3
ХП, 4 мг/кг	31,5±5,6	7,5±1,8
ХП, 8 мг/кг	25,9±5,6*	6,1±1,6*

Примітка: \* –  $p < 0,05$

виявити ефект К, якого не спостерігалось при дослідженні даних показників через 2 години. Так, кількість стоек достовірно ( $p < 0,05$ ) зростала залежно від дози К – на 54 % і на 38 % за дії в дозах 24 мг/кг і 12 мг/кг відповідно. Це дозволило підтвердити чутливість методу оцінки рухової активності на рівні 12 мг/кг для стимулюючого впливу К. Також було уточнено час максимального прояву специфічної для даної референтної речовини симптоматики, що має бути враховано при плануванні подальших валідаційних досліджень.

При застосуванні референтної речовини з пригнічуючим впливом на НС для оцінки показників рухової активності у «відкритому полі» було отримано наступні результати. Через 1 годину після введення ХП у дозах 4 та 8 мг/кг, за впливу більшої дози спостерігалось зменшення ( $p < 0,05$ ) локомоторної активності та кількості стоек майже вдвічі (табл. 4). Такі дані співпадають з результатами, отриманими в ході оцінки показників поведінки щурів у «відкритому полі» через 2 години впливу ХП (табл. 3). Ці результати свідчать про відтворюваність ефекту, що у свою чергу відображає надійність методу. За дії ХП у дозі 4 мг/кг суттєвих змін цих кінцевих точок не виявлено, що дозволяє встановити чутли-

вість методу оцінки рухової активності на рівні 8 мг/кг ХП.

Обговорення результатів. Отримані дані у сукупності з раніше опублікованими результатами оцінки ефективності батареї КФТ свідчать, що методи нейротоксикологічного скринінгу щурів, впроваджені у НЦ, дозволяють ефективно виявляти вплив різної спрямованості на НС. Тести адекватно відображають специфічну дію застосованих референтних речовин: пригнічуючий вплив ХП та активуючий – К. Батарея КФТ, що виконувалася в динаміці, дозволила охарактеризувати кінетику впливу референтних речовин у досліджених дозах. Так, було визначено час максимального прояву нейротропного впливу – 1/2-4 години для ХП та 1/2-1 година для К, що відповідає даним літератури [12].

Дослідження показників рухової активності у «відкритому полі» через 1 годину після введення підтвердило, що дана часова точка відповідає максимальному впливу як К, так і ХП за умов проведеного експерименту. У цей час було встановлено характерне для впливу К збільшення кількості стоек щурів, що свідчить про його анксиолітичний вплив [14]. За дії ХП спостерігалось характерне пригнічення обох досліджених показників рухової активності [12].

Залежність спостережуваних ефектів К та ХП від їхньої дози при пероральному введенні щурам підтверджує їхню специфічність та дозволяє встановити чутливість застосованих тестів. Так, для батареї КФТ у дослідженні на щурах – самках, чутливість тесту встановлена на рівні мінімальних випробуваних доз: ХП – 8 мг/кг, К – 12 мг/кг.

Метод дослідження рухової активності в період максимального прояву дії референтних речовин (1 година) підтвердив вплив ХП у дозі 8 мг/кг, чутливість тесту за дії К була обмежена мінімальною дослідженою дозою – 12 мг/кг, за якої виявлено достовірне збільшення стоек. Оскільки недіюча доза К для даного методу не була досягнута, при подальшому плануванні треба враховувати можливість дослідження менших доз даної референтної субстанції.

Таким чином, за критеріями специфічності та чутливості було валідовано методи першого рівня визначення нейротоксичного впливу хімічних речовин – батарею КФТ та метод дослідження рухової активності шурів у «відкритому полі». Отримано дані, що свідчать про їх відтворюваність. Обґрунтовано подальше проведення регулярних валідаційних досліджень. Успішність проведення нейротоксикологічних спостережень «всліпу» стала підставою для оцінки кваліфікації персоналу.

#### Висновки

1. Валідаційні дослідження впроваджених у НЦ методів скринінгу нейротоксичного впливу — батареї КФТ та методу оцінки рухової активності у «відкритому полі» для шурів, показали ефективність цих тестів щодо виявлення впливу на НС хімічних речовин різної спрямованості – активуючого та стимулюючого. Показано, що у обох випадках вплив залежав від дози

референтних речовин.

2. У ході дослідження за результатами кожного з валідованих тестів було встановлено специфічний вплив К – посилення аудіомоторної реакції, анксиолітичний вплив, активація дефекації. Вплив ХП у даних тестах характеризувалася пригніченням загальної активності тварин та їх сенсомоторних реакцій, зниженням м'язового тону, стереотипією та мідріазом, у «відкритому полі» у тварин з'являвся латентний період початку руху, зменшувалася локомоторна активність та кількість стойок.

3. Обидва тести релевантно відображають токсикодинаміку гострого впливу референтних субстанцій і дозволяють встановити період максимального прояву дії К (30-60 хв.) та ХП (60-240 хв.).

4. Показано надійність методу дослідження показників рухової активності у «відкритому полі» за дії ХП у ході повторного дослідження.

#### ЛІТЕРАТУРА

- OECD Series on testing and assessment № 20, Guidance Document For Neurotoxicity Testing. ENV/JM/MONO (2004) 25, OECD, 26 – Nov – 2004. – 67 p.
- United States Environmental Protection Agency (USEPA) Guidelines for neurotoxicity risk assessment, Federal Register. – 1988. – 63(93). – P. 26926 – 26954.
- The value of alternative testing for neurotoxicity in the context of regulatory needs / S. Coecke, C. Eskes, J. Gartlon [et al.] // *Environmental Toxicology and Pharmacology*. – 2006. – V. 21, №2 – P. 153–167.
- U.S. Congress, Office of Technology Assessment, Neurotoxicity: Identifying and Controlling Poisons of the Nervous System, OTA-BA-436 (Washington, DC: U.S. Government Printing Office, April 1990). – 361 p.
- Maurissen, J.P. Neurotoxicity test validation, positive controls and proficiency: Are chemicals necessary? / J.P. Maurissen, B.R. Marable // *Neurotoxicology and Teratology*. – 2009. – V. 27. – P. 545–551.
- Noldus. L.P.J.J. EthoVision a versatile videotracking system for automation of behavioral experiments / L.P.J.J. Noldus, A.J. Spink, R.A.J. Tegelenbosch // *Behavior Research Methods, Research & Computers*. – 2001. – V.33. – № 3. – P. 398–414.
- Dubovicky, M. Effect of chronic emotional stress on habituation processes in open field in adult rats / M. Dubovicky and D.Jezova // *Annals of New York Academy of Science*. – 2004. – V.1018. – № 1. – P. 199–206.
- Moser. V.C. Functional Assays for Neurotoxicity Testing / V. C. Moser // *Toxicologic Pathology*. – 2011. – № 39. – P.36–45.
- Developmental neurotoxicity testing guidelines: a quantitative retrospective analysis of positive control data / K.C.Raffaele, S.L.Makris, W.F.Sette, K.M. Crofton // Presented at Society of Toxicology, Nashville, TN, March 17–21, 2002 [електронний ресурс] Режим доступу: <https://cfpub.epa.gov/si/a.cfm?Lab=NHEERL&dirEntryID=61602>
- Зиновьева М.Л. Батарея клинично-функциональных тестов для лабораторных животных в токсикологическом исследовании и экспериментальная оценка ее эффективности / М.Л.Зиновьева, П.Г.Жминько // *Сучасні проблеми токсикології, харчової та хімічної безпеки* – 2016. – № 2 (74). – С.23–31.
- Determination of motor activity and anxiety-related behaviour in rodents: methodological aspects and role of nitric oxide / N. Sestakova, A. Puzherova, M. Kluknavsky, I. Bernatova // *Interdisciplinary Toxicology*. – 2013. – V. 6(3). – P. 126–135.
- OECD TG №424: Neurotoxicity Study in Rodents.OECD, 21 – Jul – 1997. – 15 p.
- Comparison of methods for the assessment of locomotor activity in rodent safety pharmacology studies / J.J. Lynch, V. Castagné, P.C. Moser, S.W. Mittelstadt // *J. Pharmacol. Toxicol. Methods*. – 2011. – № 64(1). – P. 74–80.
- Hughes. R.N. Strain-dependent effects of acute caffeine on anxiety-related behavior in PVG/c, Long-Evans and Wistar rats / R.N. Hughes, N.J. Hancock // *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. – 2016. – V.140. – p.51–61.
- The stimulant effects of caffeine on locomotor behavior in mice are mediated through its blockade of adenosine A2A receptors / M.E. Yacoubi, C. Ledent, J. F. Ménard [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2000. – V. 129. – № 7. – P.1465–1473.

ВАЛИДАЦІЯ НЕЙРОТОКСИКОЛОГІЧЕСКИХ МЕТОДОВ СКРИНИНГА  
ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РЕФЕРЕНТНЫХ СОЕДИНЕНИЙ  
С РАЗНОСТОРОННИМ ВОЗДЕЙСТВИЕМ НА НЕРВНУЮ СИСТЕМУ

М.Л. Зинovieва<sup>1</sup>, П.Г. Жминько<sup>1</sup>, В.В. Кирсенко<sup>2</sup>, Е.Н. Струменская<sup>3</sup>

<sup>1</sup>ГП "Научный центр превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И.Медведа МЗ Украины", г. Киев, Украина

<sup>2</sup>ГУ «Институт медицины труда имени Ю.И. Кундиева НАМН Украины», м. Киев, Украина

<sup>3</sup>Национальный медицинский университет имени А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

**РЕЗЮМЕ.** Валидация методов на этапе их внедрения и при дальнейшем использовании – важная составляющая обеспечения качества данных токсикологического исследования. В Научном центре превентивной токсикологии, пищевой и химической безопасности имени академика Л.И. Медведа МЗ Украины внедрены методы, применяющихся на этапе скрининга нейротоксического воздействия химических веществ, – батарея клинико-функциональных тестов и метод оценки двигательной активности в «открытом поле» для крыс. Показана их специфичность, чувствительность и надежность в ходе исследования влияния референтных субстанций – кофеина и хлорпромазина.

**Ключевые слова:** валидация, нейротоксичность, хлорпромазин, кофеин.

VALIDATION OF NEUROTOXICOLOGICAL SCREENING METHODS FOR CHEMICAL  
SUBSTANCES USING REFERENCE COMPOUNDS  
WITH DIFFERENTLY DIRECTED EFFECTS ON THE NERVOUS SYSTEM

M. L. Zinovieva<sup>1</sup>, P. H. Zhminko<sup>1</sup>, V. V. Kirsenko<sup>2</sup>, O. M. Strumenska<sup>3</sup>

<sup>1</sup>State Enterprise "Scientific Center for Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety named after Academician L. I. Medved of the Ministry of Health of Ukraine", Kyiv, Ukraine

<sup>2</sup>State Institution "Institute of Occupational Health named after Yu. I. Kundiyev of the National Academy of Medical Sciences of Ukraine", Kyiv, Ukraine

<sup>3</sup>O. O. Bohomolets National Medical University Kyiv, Ukraine

**ABSTRACT.** Validation of the methods at the stage of their implementation and with subsequent application is an important part of ensuring the quality of toxicological study data. State Enterprise "Scientific Center for Preventive Toxicology, Food and Chemical Safety named after Academician L. I. Medved of the Ministry of Health of Ukraine" has implemented methods of screening of neurotoxic exposure of chemical substances – a set of clinical and functional tests (CFT) and a method for evaluation of motor activity in the "open field" for rats.

**Objective.** Determination of specificity, sensitivity and reliability of the implemented methods under exposure to reference neurotropic substances with differently directed effects – chlorpromazine and caffeine on the parameters of the neurological conditions of female Wistar Han rats.

**Results.** It has been shown that the set of CFT and the method for evaluation of motor activity in the "open field" are relevant for the determination of specific exposure and toxicodynamics of reference substances having differently directed effects on the nervous system of rats. The sensitivity of these methods under the lowest active dose of caffeine and chlorpromazine was determined. Data on the reproducibility of test results have been obtained.

**Keywords:** validation, neurotoxicity, chlorpromazine, caffeine.

Надійшла до редакції 15.03.2019 р.