

# ТОКСИКОГЕНОМИКА И ТОКСИКОПРОТЕОМИКА: МЕТОДЫ, ПРОБЛЕМЫ, ПЕРСПЕКТИВЫ

Л.Б. Бондаренко д.биол.н., С.С. Танина к.мед.н

Институт фармакологии и токсикологии НАМН Украины, г. Киев

**РЕЗЮМЕ.** Проаналізовані методи, проблеми і перспективи токсикогеноміки та токсикопротеоміки. Експериментальні моделі в токсикології еволюціонують паралельно з розвитком нових технологій у молекулярній та клітинній біології та біоінформатиці. Не існує єдиної моделі, яка б була здатна надати відповідь на всі питання, що виникають у дослідників, проте використання методів токсикогеноміки, токсикопротеоміки, метаболоміки у токсикології, а також біоінформатики за умов їх чіткої регламентації та валідації здатне принципово поліпшити процес передбачення небажаних ефектів від лікарських засобів.

Ключові слова: токсикогеноміка, токсикопротеоміка, метаболоміка.

**РЕЗЮМЕ.** Проанализированы методы, проблемы и перспективы токсикогеномики и токсикопротеомики. Экспериментальные модели в токсикологии эволюционируют параллельно с развитием новых технологий в молекулярной и клеточной биологии и биоинформатике. Не существует единой модели, которая способна была бы дать ответ на все вопросы, возникающие у исследователей, однако применение методов токсикогеномики, токсикопротеомики, метаболомики в токсикологии, а также биоинформатики, при условии их четкой регламентации и валидации, способно принципиально улучшить процесс предвидения нежелательных эффектов от лекарственных средств.

Ключевые слова: токсикогеномика, токсикопротеомика, метаболомика.

**SUMMARY.** This article analyses the methods, problems and perspectives of toxico-genomics and toxico-proteomics. Toxicological experimental models have parallel evolution with new technologies in molecular and cell biology and bioinformatics. There is no common model, which could be able to give an answer to all queries of researchers, but using the toxico-genomics, toxico-proteomics, metabolomics methods in toxicology as well as bioinformatics, could refine on prediction process, of course, on the assumption of strict regulation, and probably prevent an early appearing of undesirable effects of pharmaceuticals and shorter the quantity of laboratory animals ought to be used in time of research and development of new medicines

Key words: toxico-genomics, toxico-proteomics, metabolomics.

Последние десятилетия биология и медицина переживают революционные преобразования. С расшифровкой генома человека у них открылось "второе дыхание". Важную роль в этом процессе сыграл Международный консорциум по секвенированию генома человека (International Human Genome Sequencing Consortium (IHGSC)), который координирует усилия 20 научных лабораторий и академических центров мира. Существует также и альтернативный коммерческий проект по расшифровке генома человека, выполненный частной компанией "Селера геномикс". Результаты Международного консорциума по секвенированию генома человека, представленные в Internet, содержат сведения о структуре и локализации в хромосомах первых расшифрованных 2300 генов. Полученные же компанией "Селера геномикс" данные реализуются на коммерческой основе.

Помимо непосредственных данных о геноме человека эти проекты в ходе их реализации существенно усовершенствовали методическую базу генно-инженерных, молекулярно-биологических и биотехнологических исследований, что, в свою очередь, заложило материальную базу продолжения широких исследований генома человека и возникновения таких новых научных направлений, как геномика и протеомика.

В наиболее общем значении геномика — наука, отвечающая за комплексное изучение

структуры и функции генома. Анализ любого генома включает определение нуклеотидной последовательности, белковых продуктов генов, изучение взаимодействия разных генов и белков и механизма регуляции всей системы.

После расшифровки генома усилия исследователей фокусируются на изучении белковых продуктов генов. Этим занимается протеомика. Ее задача — определить все белки, синтезируемые в клетке, выяснить их строение, количество, локализацию, модификацию и механизмы взаимодействия (Рис.1).

Достижения функциональной геномики уже сейчас находят применение в медицинской практике в виде генодиагностики и генотерапии. Индивидуальная вариабельность ответа на прием лекарственных препаратов послужила основой для развития новых направлений исследований — фармакогеномики и фармакопротеомики.

И, наконец, стремительное развитие науки и технологий в последнее время привело к необходимости решения вопросов безопасности на новом методическом уровне и возникновению новых научных направлений токсикогеномики и токсикопротеомики.

В научной литературе встречается большое количество различных определений термина "токсикогеномика". Наиболее общим определением этого понятия, вероятно, является представление о токсикогеномике, как об одном из подразделов общей геномики, посвя-

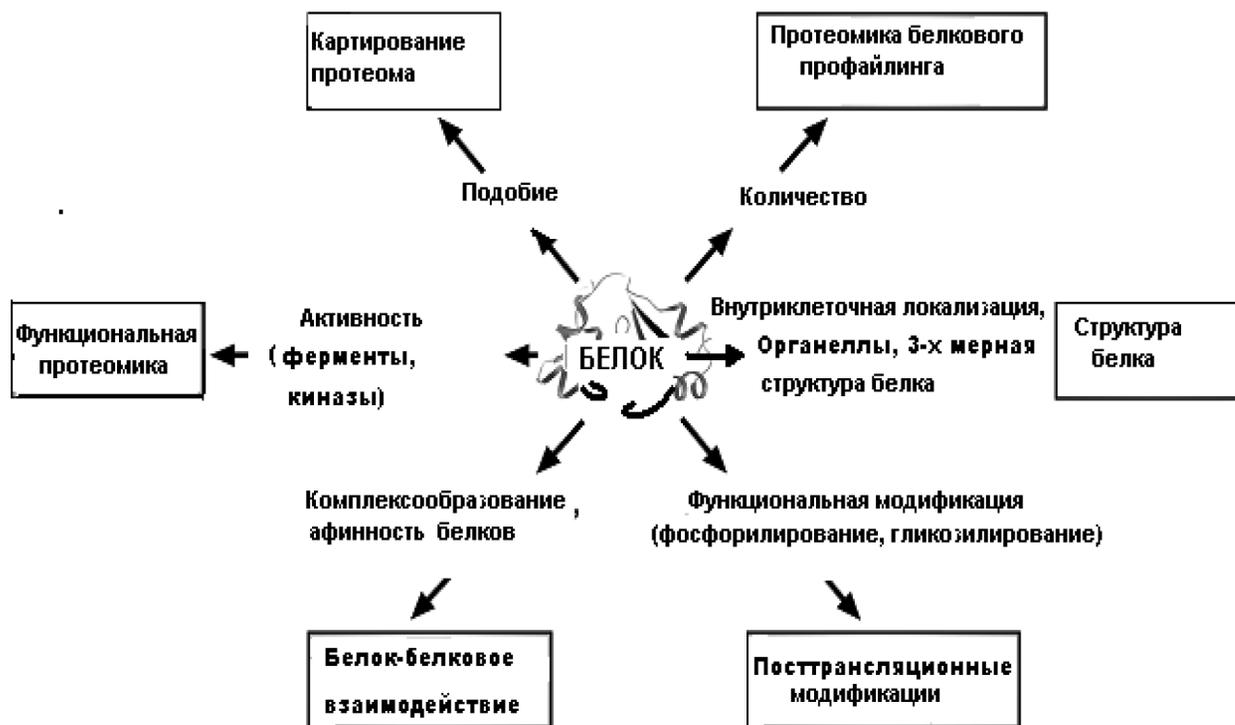


Рис. 1. Основные направления исследований протеомики

шенном исследованию взаимосвязей между, с одной стороны, структурой и активностью генома и, с другой стороны, нежелательными биологическими эффектами экзогенных агентов [3].

Генетические подходы позволяют токсикологам выяснять точные механизмы действия токсикантов. Трансфекционные системы по внедрению плазмид с мутантными кДНК исследуемых белков, анти-смысловые олигонуклеотиды для ингибирования эндогенных протеинов, репортерные гены для измерения индукции промоторов генов, — все эти методы оказались весьма полезными для исследования механизмов токсичности [1]. Трансгенные и нокаутированные мыши все чаще используются для адресного изучения роли определенных продуктов генов в ответе на токсикант *in vivo*. Например, трансгенные мыши с врожденной предрасположенностью к раку могут быть очень полезны для выявления канцерогенных агентов. На ранних этапах становления токсикогеномики широко использовался метод Northern-блоттинга для исследования изменений экспрессии генов под влиянием различных соединений. Однако этот метод позволяет исследовать изменения экспрессии ограниченного числа генов.

Последние достижения в области ДНК-чипов и биоинформатики позволяют токсикологам оценивать эффекты ксенобиотиков буквально на тысячи генов одновременно [2]. ДНК-микрочипы могут использоваться сов-

местно с анализом аллелей и полиморфизмов единичных нуклеотидов в ходе характеристики ответов на отдельные соединения и их смеси, также, как и для оценки эффективности лекарств в ходе лечения болезней. ДНК-микрочипы являются революционной технологией для сравнения полногеномных паттернов экспрессии в зависимости от дозы и времени воздействия токсикантов.

Существуют два основных типа ДНК-микрочипов. Олигонуклеотидсодержащие ДНК-чипы несут на своей поверхности короткие синтезированные олигонуклеотиды (~ 20-80 оснований). кДНК-чипы отличаются тем, что ДНК-последовательности (0,5-2 тыс. оснований в длину) соответствуют уникальным экспрессируемым последовательностям генов. Такие кДНК могут соответствовать генам с известной функцией или же быть набором частично секвенированных кДНК, полученных при экспрессии определенных последовательностей (ESTs), соответствующих мРНК генов с известными и неизвестными функциями [3].

С использованием таких методов можно, например, сравнить экспрессию геномов организмов, получавших токсиканты, с экспрессией геномов организмов, которым вводится только чистый растворитель. Проведенная валидация токсикогеномных стратегий исследования гепатотоксинов [4] показала, что профили экспрессии генов хорошо согласуются с уже накопленным массивом данных других токсикологических исследований. Показано,

что вещества со сходными механизмами токсичности имеют и сходные отклонения в процессах транскрипции генома. Это предположение было проверено на 15 известных гепатотоксинах в экспериментах как *in vitro* (на культуре гепатоцитов крысы), так и *in vivo* (на самцах крыс линии Sprague-Dawley) [4]. Анализ полученных результатов выявил четкую корреляцию между данными патоморфологических, биохимических исследований, с одной стороны, и профилями экспрессии генома с другой. Это доказывает, что ДНК-чипы могут быть высокочувствительным методом для идентификации и классификации эффектов химических соединений на организм.

Однако, при этом не следует забывать и о наличии некоторых ограничений относительно применения технологии ДНК-чипов в токсикогеномных исследованиях, так как этот метод является полуквантитативным. Для преодоления этого ограничения необходимо использование ДНК-чипов совместно с количественной полимеразной цепной реакцией или другими только что разработанными методами [3].

Помимо технологии ДНК-чипов в токсикогеномике успешно применяются и другие методы, в частности, ПЦР-реакции и исследование целостности структуры нуклеиновых кислот (ДНК-фрагментация). Например, нами проводилось исследование влияния различных туберкулостатиков на процессы ДНК-фрагментации и экспрессию нескольких изоформ цитохрома P-450 в различных тканях крыс [5]. В частности была продемонстрирована способность этамбутола, не метаболизирующего по цитохром P-450-зависимым механизмам, тем не менее оказывать эффект на экспрессию гена цитохрома P-450 2E1. Установлено также, что применение комбинации туберкулостатиков в терапевтических дозах серьезно изменяет экспрессию изоформ цитохрома P-450 2E1, 3A и 2C одновременно с нарушением процессов фрагментации ДНК в клетках печени и семенников [5].

В настоящий момент успешно развиваются два основных направления токсикогеномики: сравнительно-предикативная и функциональная токсикогеномика. Задачей первого направления является изучение количества и типов генов, присутствующих соответственно в нормальных и подвергнутых воздействию токсиканта клетках, тканях и биожидкостях. При этом в ходе накопления результатов появляется возможность сравнения образцов, полученных от животных, подвергнутых воздействию неисследованного вещества, или же демонстрирующих наличие определенных патологических признаков, с уже существующей базой данных соответствующих показателей для хо-

рошо изученных веществ с целью предсказания проявления некоторых свойств и эффектов у изучаемого соединения. Такое предсказание условно может быть разделено на две категории:

- классификация образцов, исходя из класса веществ, воздействующих на животных
- классификация образцов, исходя из вызываемых ими гистопатологических и биохимических изменений в организме.

Получаемые данные позволяют выяснить детали геномных перестроек, обусловленных реализацией фармакологического и токсического действия агента. В случае если эти результаты могут быть "фенотипически увязаны" с общепринятыми признаками токсичности (гистопатологическими, биохимическими и т. п.), возникает возможность выявления свидетельств наличия повреждающего воздействия до возникновения его клинических или патологических проявлений. Такой подход приводит к открытию потенциальных ранних биомаркеров токсического воздействия.

Предикативное моделирование способно революционизировать токсикологию путем внедрения распознаваемых моделей или трендов в базах данных высокой плотности для предсказания геномных взаимодействий, исходя из накопленных данных для хорошо исследованных веществ и соответственно их профилей. Такая работа уже проводится ведущими токсикологическими центрами мира. Например, Национальный Центр Токсикогеномики при Национальном Институте гигиены окружающей среды (National Institute of Environmental Health Science) США на протяжении последних десятилетий создает базу данных для хранения множества показателей (дозы, временные зависимости, биологические системы, данные гистопатологических исследований, показатели масс тела, данные по клеточным циклам и т.п.), которые сопровождают процессы исследования веществ *in vitro* и *in vivo* параллельно с изучением геномных нарушений [8]. Помимо этого ведется и взаимобмен и взаимодополнение баз данных между центрами разных стран. Более широкая выборка значительно повышает точность отбора и дает возможность выбрать наиболее чувствительные параметры для дальнейшего прогностического моделирования или интерпретации механизма действия. Такой подход хорошо зарекомендовал себя при поиске эффективных средств против СПИДа [6].

Использование таких ресурсов токсикогеномики, как ДНК-чипы, для оценки безопасности веществ позволяет значительно облегчить внедрение в эту область так называемого тестирования *in silico*, позволяющего большой

объем исследований заменить компьютерными расчетными работами, исходя из баз данных экспрессии генов. Применение компьютерного моделирования и экспертных систем прогнозирования биологической активности и токсичности в контексте токсикогеномики позволит значительно ускорить и удешевить первичный скрининг потенциальных лекарственных средств с одновременным сокращением числа животных, вовлеченных в исследование.

Функциональная токсикогеномика предполагает исследование биологических последствий изменений генома в контексте целостного эффекта изучаемого вещества на организм. Всестороннее понимание потенциальных механизмов действия вещества требует установления экспрессионных моделей для геномов при различных комбинациях доз и времени экспозиции [8]. Это минимизирует возможность неправильной интерпретации транзиторных реакций и позволит распознавать последующие изменения, которые могут быть связаны с процессами адаптации или являться потенциальными биомаркерами патофизиологических нарушений. Изучение целевой временной экспрессии специфических генов в ответ на введение токсиканта приведет к лучшему пониманию всей исследуемой последовательности событий [7].

Исследование экспрессии генома само по себе не может дать адекватного понимания действия токсического вещества в организме, так же, как и последствий патологических изменений, им вызываемых. Чтобы получить полную картину механизма действия такого соединения необходимо идентифицировать изменения в белках, связанные с его реализацией, и понять, каким образом эти изменения будут воздействовать на функционирование как самих белков, так и клетки в целом. В отличие от классической токсикогеномики, которая исследует гены, связанные с реализацией эффекта токсина, токсикопротеомика может помочь в выявлении роли белков в этом процессе.

На начальном этапе развития токсикопротеомные исследования ограничено проводились в рамках или токсикогеномных экспериментов, или же протеомных [8]. Однако, на данном этапе, это уже совершенно оформившееся направление в токсикологии, призванное применить весь существующий методический аппарат протеомики к решению токсикологических задач. В задачи токсикопротеомики входит выяснение механизмов, с помощью которых вводимое в организм вещество вызывает нарушение экспрессии белков, их функционирования и специфического ответа

на токсикант, которые обуславливают возникновение патологии. Понимание функциональных характеристик белков и их активности требует выяснения их внутриклеточной локализации, распределения в тканях, состояния после прохождения пост-трансляционных модификаций, наличия доменных структур, белок-белковых взаимодействий, формирования белковых комплексов, сайтов связывания лигандов и целостного представления об их пространственной структуре.

Кроме того, к первейшим задачам токсикопротеомики относится преобразование накопленных знаний об изменениях в протеоме под влиянием белков в разработку совершенно конкретных биомаркеров для ранней диагностики отдаленных последствий воздействия химических соединений и составление базы данных, так называемых "подписей" химической токсичности [9]. Под термином "биомаркер" при этом решено было понимать "отдельные биологические измерения, которые могут служить воспроизводимым свидетельством наличия четкой взаимосвязи со здоровьем, болезнью, нежелательным эффектом или токсичностью". Необходимость такого четко ограниченного определения была вызвана требованиями количественных биохимических или молекулярно-биологических измерений.

При проведении токсикопротеомного анализа необходимо:

- достигнуть максимальной идентификации протеома в каждом образце;
- провести полный анализ с высоким разрешением;
- обеспечить точное количественное измерение;
- вовремя получить данные и подлежащие интерпретации результаты;
- использовать ориентированные на поиск открытые методические платформы.

В настоящий момент одной из наиболее широко применяемых в токсикопротеомике технологических платформ является двумерный гель-электрофорез для разделения белков в комплексе с масс-спектрометрическим анализом белков, представляющих интерес для исследователя [10].

Однако серьезным ограничением протеомного анализа с использованием двумерного гель-электрофореза является чувствительность детекции. Анализ мало распространенных белков этим методом весьма затруднен из-за присутствия таких широко распространенных белков как альбумин, тяжелые и легкие цепи иммуноглобулина, трансферрин, гаптоглобин, актин, тубулин и т. п. Селективное удаление этих белков из образцов путем проведения колоночной иммуноаффинной хромато-

рафии позволяет нанести большие объемы проб на гели, чтобы облегчить визуализацию белков с низкой концентрацией [8]. Но даже с использованием наиболее чувствительных флуоресцентных красителей количество белков, которые могут быть исследованы с использованием платформы двумерный электрофорез- масс-спектрометрия, ограничено.

Помимо этой, наиболее распространенной методической платформы, в токсикопротеомике достаточно часто используют сочетание одномерного гель-электрофореза, жидкостной хроматографии и масс-спектрометрии [11]. Лучшие результаты, особенно при работе с уникальными белками, могут быть достигнуты при использовании платформы ВЭЖХ-масс-спектрометрия, изотопного анализа, других видов хроматографии и спектрометрии (MALDI-MS, SELDI) [12]. И, наконец, подобно ДНК-чипам, разрабатываются методики протеиновых чипов, среди которых наибольшее распространение приобретают адсорбирующие поверхности с антителами в качестве якорных молекул [13]. Такие чипы имеют различную чувствительность (от пико- до микрограмм белка) и подразделяются на 3 типа: чипы цитокинов/хемокинов, чипы функциональных белков клетки и чипы сигнальных протеинов клетки. Однако такие чипы существуют далеко не для любых клеточных типов, биожидкостей и видов организмов. Эта методическая платформа позволяет проводить быстрый скрининг ограниченного набора белков, что может быть полезным в первичных токсикологических исследованиях.

Учитывая существующие ограничения для большинства используемых в современной токсикопротеомике методов, только применение целого набора различных методических подходов может обеспечить успешный поиск биомаркеров токсического воздействия соединений на организм. Например, таким образом с применением методов двумерного гель-электрофореза, обратнофазной высокоэффективной жидкостной хроматографии, масс-спектрометрии, аминокислотного анализа,  $^1\text{H}$ - ЯМР спектроскопии, рутинных методов клинической биохимии и гистопатологии был проведен поиск биомаркеров, ассоциированных с возникновением острой почечной недостаточности после однократного введения крысам аминоклеозид пуромидина [14]. Полученные массивы данных были подвергнуты компьютерному анализу, что позволило определить относительно более ранние биомаркеры развития патологии, чем те клинические изменения, которые традиционно определялись исследователями ранее.

В первую очередь усилия ученых сосредоточены на выявлении ранних биомаркеров реализации токсических эффектов в основных органах, отвечающих за биотрансформацию и элиминирование ксенобиотиков — печени и почках. В настоящий момент накоплен огромный массив данных по биомаркерам у основных лабораторных животных — крыс и мышей. Так, выяснилось, что ранними маркерами реализации токсического эффекта тетрахлорметана в печени крыс является повышение уровней белков кальциклина, кальгизарина и галектина -1 [15]. В случае афлатоксина В1 в гепатоцитах крыс такими маркерами оказались снижение уровней 2-макроглобулина и 1-антитрипсина [11]. Данные исследования проводились с использованием методов двумерного гель-электрофореза, масс-спектрометрии и аминокислотного анализа.

Аминокислотный анализ белков был использован и в нашем отделе при исследовании токсических эффектов различных высоких доз пиразинамида на белки. В качестве модели нами были избраны фибриллярные белки коллагены, так как они являются наиболее распространенными белками организма (составляя более 30% всех белков организма)[16]. Они участвуют в процессах ответа организма на токсическое поражение [17] и их первичная структура достаточно жестко непосредственно детерминирует их вторичное и третичное строение [16], чего не наблюдается в случае глобулярных и мембрано связанных протеинов. Сравнение этих результатов с данными литературы и ранее полученными результатами о влиянии на аминокислотный состав коллагенов I типа секостероидов, гормонов, ряда аминокислот, актиномицина D дает основание предполагать, что определенные изменения содержания остатков пролина, гидроксипролина, лизина, гистидина, гидроксизина могут рассматриваться в качестве ранних биомаркеров развития отдаленных неблагоприятных эффектов лекарственных средств на организм[16-18].

Подобные же исследования отдельных локусов молекулы коллагена XVIII типа при воздействии ксенобиотиков и различных патологиях позволили компании EnteMed обнаружить фрагмент, ответственный за регуляцию процессов ангиогенеза в опухолях и в 1996 году разработать на его основе препарат Ендостатин, в 90% случаев эффективно подавлявший метастазирование на различных моделях опухолей. В 1997 году совместно с Национальным институтом рака США они создали рекомбинантную технологию его получения, а уже в 1999 году этот препарат получили паци-

енты в рамках I фазы клинических исследований [3].

Токсикогеномика и токсикопротеомика сами по себе не дают понимания окончательного ответа организма на введение ксенобиотика без привлечения подходов метаболомики к решению токсикологических задач. Метаболомика (метабономика, метаболический профайлинг) в самом общем приближении определяется как количественное измерение во времени мультипараметрического метаболического ответа живых систем на патофизиологическое воздействие или генетическую модификацию [19]. Она предполагает измерение окончательного ответа организма на ксенобиотик путем широкомасштабного анализа низкомолекулярных соединений (аминокислот, органических кислот, сахаров, липидов и т. п.) в образцах биологических жидкостей или тканей. При этом ведущими методами метаболомного анализа в токсикологии в настоящий момент являются различные сочетания методов хроматографии и аминокислотного анализа с масс-спектрометрией и ЯМР-спектроскопией [20].

К важнейшим задачам метаболомики в токсикологических исследованиях относится установление взаимосвязей изменений показателей в биожидкостях с реализацией механизмов действия токсических агентов в тканях-мишенях. При этом появляется возможность осуществления неинвазивного мониторинга эффективности лекарственных средств и токсичности вводимых в организм препаратов.

В этом направлении нами проводилось сравнительное изучение пулов свободных аминокислот (являющихся конечными метаболитами биосинтеза белков) в гомогенатах тканей при введении различных доз пиразинамида. Изучение изменений содержания свободных аминокислот в пулах органов крыс при введении различных доз пиразинамида позволило провести комплексную оценку влияния данного соединения на метаболизм аминокислот, протеинов, нуклеотидов, нуклеиновых кислот и энергетический обмен в печени, почках, сердце, легких и селезенке- органах-мишенях пиразинамида [21, 22].

За последние годы стало понятно, что метаболомика в токсикологических исследованиях способна оказать неопределимый вклад в обнаружение новых биомаркеров токсичности не только по отношению к новым веществам, но и к давно известным гепато- и нефротоксинам [23]. Полученные исследователями разных стран результаты привели к пересмотру представлений о токсических эффектах на организм многих соединений, которые ранее воспринимались только в качестве гепато- и нефроток-

синов, а их системное воздействие игнорировалось в течение многих лет. Более того, комплексное применение методов токсикогеномики, токсикопротеомики и метаболомики в оценке системных эффектов соединений на биологические объекты привело к пересмотру научных взглядов на их механизмы действия. Широкое использование средств биоинформатики для обработки огромных массивов данных, получаемых с помощью новых подходов, позволяет перевести эту отрасль из области эмпирических знаний в область точных наук, подведя серьезную базу математических расчетов под обоснование реальных механизмов реализации системных биологических и токсических эффектов.

При этом, токсикогеномика, токсикопротеомика и метаболомика в токсикологических исследованиях уже не сосредотачиваются, как это было ранее, на каких-то отдельных показателях, а оценивают всю систему ответа организма целиком, предоставляя ученым методические средства для перехода к исследованию и пониманию биологии целостных систем.

Такой системный ответ очень сложно, а в большинстве случаев и невозможно оценить, исходя из результатов любого отдельного аналитического исследования. Будущее современных токсикологии и фармакологии за обобщением огромных массивов данных, переходом от исследования отдельных параметров к накоплению целых массивов данных с последующей их оценкой средствами биоинформационных систем. Этот путь позволит перейти к составлению международных баз данных ранних биологических маркеров веществ, разработке их так называемых "подписей", построению математически обоснованных моделей реализации эффекта соединения в целостной биологической системе, прогнозированию действия вещества на максимально ранних этапах биологического воздействия, а в идеале *in silico*.

Использование чиповых технологий исследования экспрессии генов и протеома ожидает большое будущее в области токсикологических исследований. Однако, принимая во внимание насколько сложны и высокотехнологичны эти отрасли знания, необходимо отдавать себе отчет в том, что у научного сообщества и регуляторных организаций могут быть различные подходы к определению целей и путей применения этих технологий.

Если для научных исследований представляет интерес изучение максимально возможного количества генов и белков, вовлеченных в реализацию биологического действия химических соединений, лекарств и их смесей, то регуляторные организации должны в первую

очередь быть заинтересованы в исследовании только тех генов и белков, которые являются критичными для здоровья.

Однако, на данном этапе первичного накопления международных баз данных проведение конкретного разграничения этих направлений чрезвычайно затруднено (рис. 2).

(VXDS)) и "Добровольное представление данных исследований генома"(Voluntary Genomic Data Submission(VGDS)). Дальнейшее уточнение процедуры было дано в "Порядке рассмотрения и анализа добровольно представленных данных исследований генома" (Processing and Reviewing Voluntary Genomic Data Submission(VGDSs)

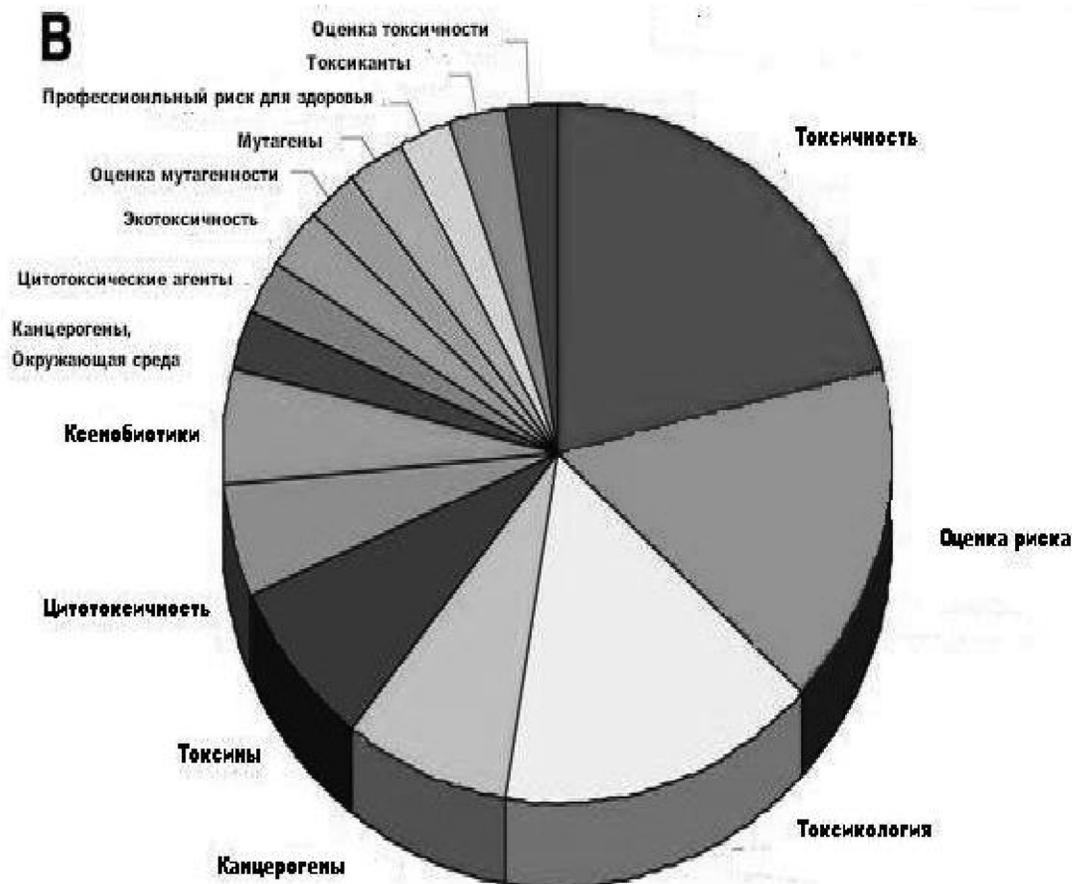


Рис. 2. Удельный объем цитирования публикаций, посвященных omics-исследованиям

Совместные усилия регуляторных организаций Европы и США (FDA и EMEA) направлены на подготовку международных актов, регламентирующих подходы к результатам исследований, проведенных с использованием геномных и протеомных технологий, специально созданными группами, включающими представителей научных сообществ и промышленности. Так, FDA была создана междисциплинарная аналитическая группа по фармакогеномике (Interdisciplinary Pharmacogenomic Review Group) для анализа поступающих в данную организацию результатов исследований, предоставляемых на добровольной основе согласно утвержденному новому порядку поступления информации в этот регуляторный орган. Он был описан в двух основных документах

"Добровольное представление данных исследований" (Voluntary Exploratory Data Submission

MaPP 4180.3), а также в руководстве для производителей "Примеры добровольного предоставления данных или предоставления данных согласно 21CFR 312, 314 или 601(Examples of Voluntary Submissions or Submissions Required Under 21CFR 312, 314 or 601).

Такие инициативы привели к разработке и валидации на новой технологической базе 7 новых высоко предикативных и значительно более ранних маркеров нефротоксичности [24]. Совместно регуляторные организации Европы и США — EMEA и FDA осуществили пилотный проект по валидации новых маркеров нефротоксичности в формате VXDS, результаты которого были опубликованы летом 2008 года.

Наряду с этим регуляторные органы разных стран участвуют в разработке стандартов реализации чиповых технологий в ходе анализа воспроизводимости результатов на различных мето-

дических платформах и в различных исследовательских центрах в рамках проекта по контролю качества исследований с использованием чипов (Microarray Quality Control -МАQC). Данный проект реализуется в три этапа.

Целью МАQC-I (2006) было:

- обеспечить контроль качества оборудования, используемого в чиповых технологиях;
- разработать методические рекомендации по анализу данных, полученных с использованием чипов, как с применением доступа к большим базам данных для сравнения, так и с готовыми референтными образцами РНК;
- установить контроль качества метрических измерений величин для объективной оценки данных, получаемых на разных чиповых платформах;
- выявить преимущества и недостатки каждого используемого метода анализа данных.

В этом проекте были задействованы 6 исследовательских центров FDA, а также академические лаборатории и другие ученые.

Целью МАQC-II (2010) было:

- оценить возможности и ограничения различных аналитических методов в разработке и валидации прогностических моделей на основе чиповых технологий;
- определить лучший подход к разработке и валидации прогностических моделей на основе чиповых технологий исследования экспрессии генов и генотипирования для нужд персонализированной медицины.

В этом проекте уже участвовали 36 исследовательских групп, проанализировавшие данные более чем 18 000 моделей.

Целью МАQC-III (также именуемом проектом контроля качества сиквенирования SEQC) является оценка технического воспроизведения нового поколения сиквенсных платформ для создания новых баз данных референтных образцов и оценка преимуществ и ограничений различных биоинформационных стратегий в анализе ДНК и РНК.

Таким образом, экспериментальные модели в токсикологии эволюционируют параллельно с развитием новых технологий в молекулярной и клеточной биологии и биоинформатике. Не существует единой модели, которая способна была бы дать ответ на все вопросы, возникающие у исследователей, однако применение методов токсикогеномики, токсикопротеомики, метаболомики в токсикологии, а также биоинформатики, при условии их четкой регламентации и валидации, способно принципиально улучшить процесс предвидения (и возможного предотвращения) на ранних этапах возникновения нежелательных эффектов лекарственных средств и сократить число используемых животных при разработке новых препаратов. Значительно сокращаются при этом и сроки доклинических исследований и их стоимость, особенно на этапе первичного скрининга.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Analysis of genetic and epigenetic mechanisms of toxicity: potential roles of Toxicogenomics and proteomics in toxicology / S.W. Burchiel, C.M. Knall, J.W. Davis [et al.]/2001. — 59. — P.193 — 195.
2. Afchari C.A. Application of complementary DNA microarray technology to cancer identification, toxicology and drug safety evaluation/C.A. Afchari, E.F. Nuwaysir, J.C. Barrett// Cancer Res. — 1999. — 59. — P.4759 — 4760.
3. An overview of toxicogenomics/H.K. Hamadeh, R.P. Amin., R.S.Paules, C.A. Afshari // Curr.Issues Mol.Biol. — 2002. — 4. — P.45 — 56.
4. Clustering of hepatotoxins based on mechanism of toxicity using gene expression profiles/ J.F. Waring, R.A. Jolly, R. Ciurlionis, P.y Lum [et al.]/ Toxicol.Appl.Pharmacol. — 2001. — 175. — P. 28 — 42.
5. Вплив сумісного введення протитуберкульозних засобів на фрагментацію ДНК в сім'яниках і епідидимісах та фертильність шурів — самців/Г.М. Шаяхметова, Л.Б. Бондаренко, І.С. Блажчук, В.М. Коваленко // Сучасні проблеми токсикології. — 2011. — №5. — С.134 — 135.
6. Use of neural networks to model complex immunogenetic associations of disease: human leukocyte antigen impact on the progression of human immunodeficiency virus infection/ J.P. Ioannidis, P.G. McQueen, J.J. Goedert, R.A. Kaslow // Am.J.Epidemiol. — 1998. — 147. — P.464 — 471.
7. Kohonen T. Comparison of SOM point densities based on differential criteria/ T. Kohonen//Neural.Comput. — 1999. — 11. — P.2081 — 2095
8. Waters M.D.Toxicogenomics and systems toxicology: aims and Prospects/ M.D.Waters, J.M. Fostel //Nat.Rev.Genet. — 2004. — 5. — P.936 — 948.
9. Wetmore B.A. Toxicoproteomics: Proteomics applied to toxicology and pathology/B.A. Wetmore, B.A. Merrick// Toxicol.Pathol. — 2004. — 32. — P.619 — 642.
10. Proteomic approach to the identification of cell membrane proteins / H.Watarai,Y. Inagaki, N. Kubota [et al.] // Electrophoresis. — 2000. — 21. — P.460 — 464.
11. Characterisation of the secreted proteome of rat hepatocytes cultured in collagen sandwiches/ D.Farkas, V.B. Bhat, S. Mandapati [et al.]/ Chem.Res.Toxicol. — 2005. — 18. — P.1132 — 1139.
12. SELDI — ToF MS for diagnostic proteomics/ H.J. Issaq, T.P. Conrads, D.A. Prieto [et al.]/ Anal.Chem. — 2003. — 75. — P.148A — 155A.
13. Cutler P. Protein arrays: The current state — of — the — art./ P. Cutler// Proteomics. — 2003. — 3. — P.3 — 18.
14. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity/ P. Cutler, D.J. Bell, H.C. Birrell [et al.] // Electrophoresis. — 1999. — 20, N18. — P.3647 — 3658.

15. Proteome analysis of rat hepatic stellate cells/ D.B. Kriestensen, N. Kawagw, K. Imamura [et al.]// *Hepatology*. — 2000. — 32. — P.268 — 277.
16. Ramachandran G.N.: in *Biochemistry of collagen*. 536 p., Plenum Press, New York, London 1976.
17. Бондаренко Л.Б. Преобразование коллагена в организме: современное состояние — ние проблемы /Л.Б. Бондаренко // *Укр.биохим.журн.* — 2004. — т.76,№5. — С.5 — 15.
18. Pyrazinamide — mediated changes in rat type I collagen and spermatogenesis indices / L.B. Bondarenko, G.M. Shayakhmetova, F.B. Taisiya // *Acta Poloniae Pharmaceutica — Drug Research*. — 2011. — vol.68, N 4. — P.285 — 290.
19. Nicholson J.K. "Metabonomics": Understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data / J.K. Nicholson, J.C. Lindon, E. Holmes // 1999. — *Xenobiotica*. — 29. — P.1181 — 1189.
20. Robertson D.G. Metabonomics in Toxicology: A Review / D.G. Robertson // *Toxicological Sciences*. — 2005. — 85. — P.809 — 822.
21. Lung and spleen contents of free amino acids after pyrazinamide treatment / L.B. Bondarenko, V.N. Kovalenko, N.A. Saprykina // *Acta Toxicologica*. — 2006. — 14, N1 — 2. — P.79 — 86.
22. Бондаренко Л.Б. Пул свободных аминокислот сердца крыс в норме и при введении пиразинамида / Л.Б. Бондаренко, Н.А. Сапрыкина, В.Н. Коваленко // *Токсикологический вестник (Россия)*. — 2007. — №6. — С.24 — 28.
23. Metabonomics: Evaluation of nuclear magnetic resonance (NMR) and pattern recognition technology for rapid in vivo screening of liver and kidney toxicants / D.G. Robertson, M.D. Reily, R.E. Sigler [et al.] // *Toxicol.Sci.* — 2000 — 57. — P.326 — 337.
24. Final report on the pilot joint EMEA/FDA VXDS experience on qualification of nephrotoxicity biomarkers/<http://www.emea.europa.eu>.

Надійшла до редакції 09.03.2012 р.