

МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ЗАПОРІЗЬКИЙ ДЕРЖАВНИЙ МЕДИКО-ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ
УНІВЕРСИТЕТ

Утюж І.Г., Денисенко В.В., Самура Б.Б., Бєленічєв І.Ф., Горчакова Н.О.,
Бухтіярова Н.В. , Сепетий Д.П., Алієва О.Г., Демянюк М.С.

СУЧАСНІ ПРОБЛЕМИ ФІЛОСОФІЇ МЕДИЦИНИ

Монографія

За загальною редакцією І.Г.Утюж

Дніпро
Журфонд
2025

ЗМІСТ

ВСТУП.....	4
РОЗДІЛ 1. ФІЛОСОФІЯ МЕДИЦИНИ: СОЦІАЛЬНО-ФІЛОСОФСЬКИЙ АСПЕКТ.....	5
1.1. Вступ до філософії медицини: філософська картина світу та медицина.....	5
1.2. Актуальні проблеми філософії медицини: соціально-філософський аналіз.....	29
1.3. Політизація тілесності: біополітична концепція та її трансформація в ХХІ ст.....	54
РОЗДІЛ 2. ЕПІСТЕМОЛОГІЧНИЙ ДИСКУРС ФІЛОСОФІЇ МЕДИЦИНИ.....	84
2.1. Методологічна матриця в медицині: теоретико-практична мудрість клініциста.....	84
2.2. Фармацевтичні та етико-правові аспекти токсикологічних досліджень: вибір між інформативністю та гуманністю.....	106
РОЗДІЛ 3. ЕТИЧНІ ПРОБЛЕМИ В МЕДИЦИНІ ТА БІОЕТИЦІ.....	136
3.1. Теорії персональної ідентичності як призми розгляду біоетичної проблематики.....	136
3.2. Філософські та етичні питання медико-біологічних досліджень.....	162
3.3. Пацієнт як суб'єкт гідності: дестигматизація онкохвороби в клінічному дискурсі та освітній парадигмі медицини.....	196
Відомості про авторів.....	216

2.2. Фармацевтичні та етико-правові аспекти токсикологічних досліджень: вибір між інформативністю та гуманністю*

За період з 90-х років минулого століття і до теперішнього часу препарати, що впливають на ЦНС (нейролептики, антидепресанти, снодійні, протисудомні тощо) за частотою призначень та оборотом продажів у промислово розвинених країнах міцно посіли лідируюче місце.

Як БАДи, харчові добавки активно використовують фармакологічні інгредієнти здатні модулювати активність головного мозку та його метаболізм.

За цей же період часу опубліковані результати клінічних досліджень, які переконливо демонструють побічні реакції з боку ЦНС у таких препаратів як β -адреноблокатори, модулятори системи ренін-ангіотензин, контрацептиви і т.д. Все це фокусує увагу фармакологів та токсикологів на проблему нейробезпеки лікарських засобів та проведення глибших досліджень нейротоксичності.

Проведення широкомасштабних досліджень нейротоксичності потенційних лікарських засобів обмежується їх дорожнечою та проблемою етичного використання лабораторних тварин. Використання лабораторних тварин у фармакологічних та токсикологічних дослідженнях є аксіоматичним з погляду експериментальної науки і проводитиметься завжди. Але ці дослідження трудомісткі, вимагають додаткового персоналу, наявності віварію, викликають страждання тварин та їхню загибель. Тому з кінця 80-х рр. минулого століття в науковому середовищі вчених Європи та США активно обговорюється питання про токсикологічні дослідження *in vitro* та, зокрема, про нейротоксикологічні дослідження *in vitro*.

Однак, через складність нервової системи, багатофункціональність нейронів, а також наших обмежених знань про нейрометаболізм і молекулярно-біохімічні процеси, що беруть участь у реалізації нейротоксичності хімічних сполук та потенційних лікарських засобів, досить погано прогнозується, наскільки адекватно система для методів *in vitro* (культура нейронів, суспензія нейронів, суспензія мітохондрій, синапсом і т.д.) буде відображати зміни живого організму та його нервової системи.

Тому складно розробити в дослідженнях *in vitro* тест батареї, щоб замінити в умовах *in vivo* тест-систем.

Дослідження *in vitro* добре підходять для вивчення фармакологічних та токсикологічних процесів у більш ізольованому контексті та найбільш

*© **Беленічев Ігор Федорович**, доктор біологічних наук, професор, завідувач кафедри фармакології та медичної рецептури з курсом нормальної фізіології Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, 2025

© **Бухтіярова Ніна Вікторівна**, кандидат медичних наук, доцент, доцент кафедри клінічної лабораторної діагностики Запорізького державного медико-фармацевтичного університету, 2025

© **Горчакова Надія Олександрівна**, доктор медичних наук, професор, професор кафедри фармакології Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 2025

успішно використовуються для з'ясування механізмів токсичності, ідентифікації клітин-мішеней для нейротоксичності та виявлення складних молекулярно-біохімічних змін, спричинених лікарськими препаратами. Відтворення надійної моделі мозку *in vitro* є складним завданням, оскільки складно зібрати різні типи клітин, враховуючи міжклітинні взаємодії та позаклітинний матрикс. Нейрони, незважаючи на те, що є популярнішими клітинами в токсикологічних дослідженнях, не є найпоширенішими в мозку. Враховуючи роль і значення, яке займає сімейство гліальних клітин, їх також можна використовувати для вивчення нейротоксичності лікарських засобів.

Сімейство гліальних клітин включає астроцити та олігодендроцити, які відіграють роль у підтримці та живленні нейронів. Крім того, мікроглія захищає нейрони та їх синапси, постійно регулюючи гомеостаз. Дедалі більше даних свідчать, що у разі нейрозапалення ці клітини підтримують руйнацію нейронів і можуть бути активними учасниками нейродегенеративних процесів.

Інші типи клітин, виявлені в мозку, – це стовбурові клітини та ендотеліальні клітини. Перші можуть диференціюватися в будь-який тип нейрональних клітин для заміни пошкоджених або втрачених, а другі є основним компонентом судинної мережі мозку, необхідними для виживання цього органу. Як функціональні одиниці гематоенцефалічного бар'єру (ГЕБ) також присутні перицити, оскільки вони необхідні для підтримки бар'єрних функцій. Постійний зв'язок між цими типами клітин має основне значення для розвитку та правильного функціонування мозку, але їх нелегко імітувати *in vitro*.

Позаклітинний матрикс цінний своїми специфічними характеристиками, утвореними лектиканами, протеогліканами з лектиновим доменом та доменом зв'язування гіалуронової кислоти. Нативний склад цієї матриці характеризується біоактивними сигналами у таких компонентах, як ламінін, які впливають на нервові процеси, а також певними механічними характеристиками, такими як її жорсткість, які впливають на клітини.

Клітини тварин є джерелом, що найчастіше використовується для моделей нейродегенеративних захворювань і нейротоксичності, а також для вивчення фармакодинаміки та токсикодинаміки лікарських засобів через їх доступність та великі знання про їх фенотипи, але вони не повністю передбачають відповідь клітин людини на введення нейротоксину або лікарського препарату. Нейрони виділяють із мозку молодих дрібних тварин. Однак ці клітини важко очистити, вони ростуть повільніше і можуть втрачати свій фенотип у культурі.

В якості альтернативи їм широко використовуються іморталізовані клітинні лінії (первинні клітини, модифіковані для нескінченного розмноження, через їхню здатність швидко зростати, для підтримки своєї стійкості протягом великої кількості пасажів) через їхню низьку вартість при отриманні та обслуговуванні. Незважаючи на те, що ці типи клітин дуже корисні, отримані результати можуть вводити в оману, оскільки вони не є точною копією всіх клітин, присутніх в органі. Це відбувається через деякі

особливості білків-транспортів, білків щільних контактів і бар'єрних функцій мембран, що іноді призводить до отримання різних результатів залежно від клітинної лінії.

Крім безсмертних клітинних ліній та первинних культур, у дослідженнях нейротоксичності *in vitro* можна використовувати культури стовбурових клітин, але це пов'язано з етичними проблемами. Отримання дорослих стовбурових клітин утруднено або навіть неможливе. Нещодавні досягнення в галузі біології стовбурових клітин та тканинної інженерії зробили революцію в галузі досліджень нейродегенерації та нейротоксичності, дозволивши розробляти складні моделі людського мозку *in vitro*. Ці моделі, включаючи двовимірні моношарові культури, тривимірні органоїди, органи-на-чіпах та біоінженерні тривимірні моделі тканин, спрямовані на відтворення клітинної різноманітності, структурної організації та функціональних властивостей нативного людського мозку. Традиційні дослідження продемонстрували сприйнятливості різних типів двовимірних клітин мозку до інфекції, з'ясували механізми, що лежать в основі нейроапоптозу, спричиненого нейротоксинами та деякими нейропсихотропними препаратами, та визначили потенційні ланки-мішені для нейротоксикології.

Поточне методологічне вдосконалення дозволило технології 3D-моделей подолати проблеми 2D-клітин, такі як обмежена клітинна різноманітність, неповне мікрооточення та відсутність морфологічних структур, наголосивши на необхідності подальших технологічних досягнень.

Наголошується на важливості використання клітин людського мозку *in vitro* для з'ясування складної динаміки моделювання нейротоксичності на етапах від 2D-моношару до біоінженерної 3D-моделі тканини. Ці нейрони у досліджах *in vitro* дозволили дослідникам розкрити специфічні для людини механізми, що лежать в основі різних механізмів загибелі клітин внаслідок дії нейротоксинів та нейропсихотропних препаратів. Використання в нейротоксикологічних дослідженнях *in vitro* різних молекулярних і біохімічних маркерів ЦНС, а також морфометричних параметрів нейрона може бути утруднено, тому що вони можуть змінюватися при прояві нейропротективної, а не нейротоксичної дії потенційного лікарського засобу. Тому необхідно визначити і використовувати молекулярні або біохімічні маркери, що дозволяють чітко судити тільки про нейротоксичність препаратів.

Як морфологічні параметри нейротоксичності досить добре зарекомендували себе показники нейроапоптозу. Очевидно, що для дослідження нейротоксичності у досліджах *in vitro* необхідно використовувати маркери (молекулярні або біохімічні), концентрація яких достовірно змінюється під час реалізації конкретних механізмів нейротоксичності. Наприклад, при дослідженні нейротоксичності *in vitro* деяких цитостатиків антрациклінового ряду стали відомі такі маркери прояву їхньої нейротоксичності як антиапоптичні білки bcl-2 та білок теплового шоку масою 70кДа. Ці дані вперше було отримано групою дослідників під

керівництвом член-кор. НАН та АМН України, проф. І. С. Чекмана при вивченні впливу доксорубіцину на головний мозок та міокард та корекції цих порушень новим препаратом з ендотеліопротективними та нейропротективними властивостями “Ангіолін”. При інкубуванні суспензії нейронів з низкою психостимуляторів та ноотропів *in vitro* стали відомі такі маркери як антитіла до фенциклідинового сайту NMDA (NR2-тест).

Розглядається використання як маркерів нейротоксичності глутатіону відновленого та нітротирзину. За останнє десятиліття виявлено принципово нові особливості участі глутатіон-залежних ферментів, глутаредоксину та самого глутатіону у процесах нейротоксичності та нейропротекції. GSH є важливим внутрішньоклітинним антиоксидантом, відіграє особливу роль у підтримці клітинного редокс-статусу за рахунок участі в тіол-дисульфідному обміні, що забезпечує регуляцію цілого ряду функцій клітини, у тому числі регуляцію генної експресії, активності окремих ферментів та ферментних систем. Збереження оптимального для нервової клітини співвідношення GSH/GSSG є суттєвим для її життєздатності. Зниження рівня GSH нижче за показники норми може бути індикатором нейротоксичності при якій відбувається порушення клітинного редокс-статусу і зміна редокс-залежної регуляції генів.

Порушення внутрішньоклітинного балансу GSH спостерігається при прояві нейротоксичної дії антибіотиків, солей важких металів, похідних фенілалкіламінів. Відомо, що відновлений глутатіон є нейротрансмітером та нейромодулятором (у мікромольних концентраціях є агоністом глутаматних рецепторів; у мілімольних концентраціях модулює SH-групи NMDA рецепторів). Тому зниження GSH та депривація мРНК для GSH є важливим маркером нейротоксичності багатьох психостимуляторів. Нами вперше виявлено взаємозв'язок експресії білків-шаперонів молекулярною масою 70 кДа з порушеннями функціонування глутатіонової ланки тіол-дисульфідної системи при введенні нейротоксину МФТП (1-метил-4-феніл-1,2,3,6-тетрагідропіридин).

Введення МФТП викликало зниження відновленої форми глутатіону та опосередковано призводило до депривації експресії білка HSP70. Виявлений механізм може бути одним із проявів нейротоксичної дії деяких нейропсихотропних препаратів.

Докладне вивчення нейротоксичності виявило таке. Моделювання в умовах *in vitro* нейротоксичності шляхом внесення до інкубаційної нейрональної суспензії МФТП викликало генерацію активних форм кисню та посилене утворення оксиду азоту та його дериватів. Проведені дослідження показали, що з ранніх термінів спостереження (на 15 хвилині інкубації) починається посилений синтез NO, стимуляція продукції якого здійснюється за рахунок гіперактивації нейрональної ізоформи NO-синтази. Активність обох конститутивних ізоформ (нейрональної та ендотеліальної) прямо залежить від внутрішньоклітинної концентрації іонів кальцію, і значно підвищується при розвитку глутаматної ексайтотоксичності, що викликає посилений приплив Ca^{2+} усередину клітини. Синтезований NO взаємодіє з

аліфатичними та ароматичними амінами з утворенням N-нітроамінів, про що свідчить підвищення вмісту нітротирозину. Так, вміст нітритів підвищувався на 30 хвилині спостереження, досягаючи перевищення вихідних значень у 2,6 разів до кінця спостереження. Подібні дані отримані і для рівня нітротирозину, концентрація якого була вищою за вихідні значення на 60 хвилині спостереження в 1,72 рази.

Паралельно з формуванням нітрозативного стресу відзначалося порушення функціонування антиоксидантної системи, що виявлялося у накопиченні вільних радикалів, і як наслідок, збільшення рівня продуктів окисної модифікації білкових молекул. Підвищення вмісту альдегідних і кетонних похідних білків реєструвалося на 30 хвилині – на 23,4 і 26,2% відповідно, щодо значень контрольної суспензії. Окислювальної модифікації у цих умовах піддаються і клітинні ферменти. Нами на 60 хвилині спостереження відзначалося зниження на 42,1% активності СОД, яка відіграє ключову роль у знешкодженні супероксид-радикалу, що утворюється та накопичується в тканинах у великій кількості. При цьому деяка частина синтезованого NO, зв'язуючись із високотоксичним супероксид-радикалом, утворює молекулу пероксинітриту. При цьому, по-перше, накопичуються значні кількості надзвичайно нейротоксичного ONOO⁻, а по-друге, значно знижується біодоступність NO. Нітрити взаємодіють з цистеїном з утворенням S-нітросоцистеїну та з глутатіоном з утворенням S-нітроглутатіону. S-нітроглутатіон є основною транспортною молекулою перенесення NO. Деякими дослідженнями встановлено, що транспорт NO відбувається з утворенням N₂O₃, який потім нітрозулює тіоли, ще більше виснажуючи запаси глутатіону і зміщуючи тіол-дисульфідну рівновагу, що підтвердило наші дослідження. Накопичення окисленого глутатіону – у 3,3 рази щодо контрольної серії, відбувалося на тлі зниження його відновленої форми у 2,9 раза та гальмування активності ферментів його метаболізму. Після того, як маркери нейротоксичності визначені у дослідженнях *in vitro*, вони повинні бути підтверджені дослідженнями на цілісному організмі.

У наших дослідженнях показано, що зміна концентрації перерахованих вище маркерів нейротоксичності добре корелює зі ступенем неврологічних порушень у тварин. Встановлена нами залежність досліджуваних показників за більш високого ступеня неврологічних порушень пов'язана, мабуть, з розвитком оксидативного та нітрозуючого стресів та зривом компенсаторних можливостей організму. Крім того, під дією надлишку АФК окисної модифікації піддаються самі HSP70 білки, знижується експресійна активність генів, що кодують синтез останніх. В результаті статистичного аналізу даних було встановлено кореляційну залежність між отриманими показниками. Для визначення сили та статистичної значущості кореляції використовували коефіцієнт Пірсона (r). Встановлено, що індекс неврологічного дефіциту знаходиться в тісній залежності від рівня білків теплового шоку 70 як у корі мозку (r = -0,914), так і в гіпокампі (r = -0,813).

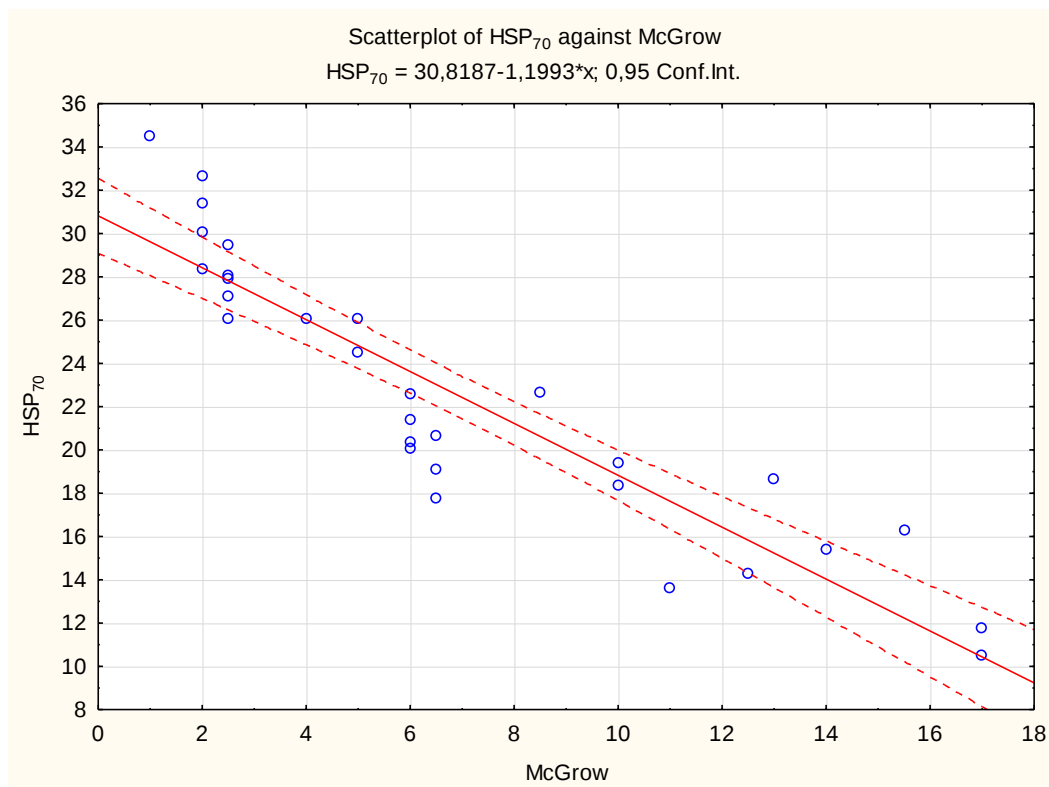


Рис. 1. Залежність індексу неврологічного дефіциту від рівня HSP70 у корі головного мозку у експериментальних тварин

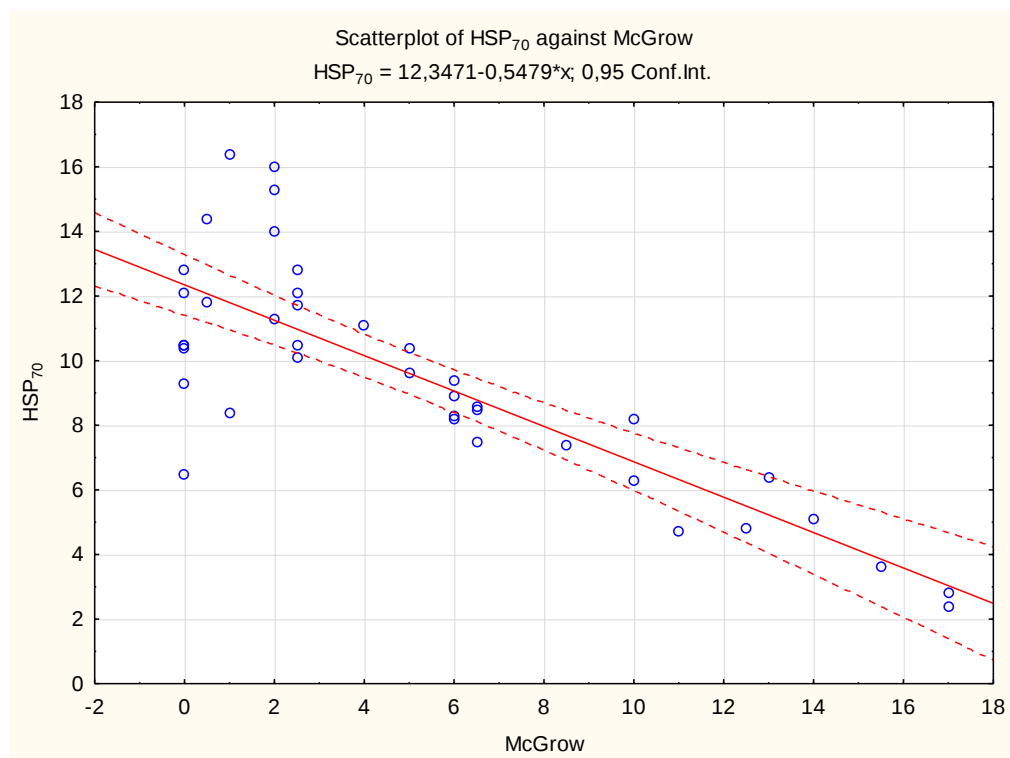


Рис. 2. Залежність індексу неврологічного дефіциту від рівня HSP70 у гіпокампі у експериментальних тварин

Поверхневі тривимірні графіки дозволяють візуалізувати тісний взаємозв'язок між вираженістю оксидативного стресу (нітротирозин), рівнем

експресії HSP 70 та формуванням неврологічного дефіциту на 4 добу експериментальної ішемічної нейродеструкції (рис. 1) та гіпокампі (рис. 2).

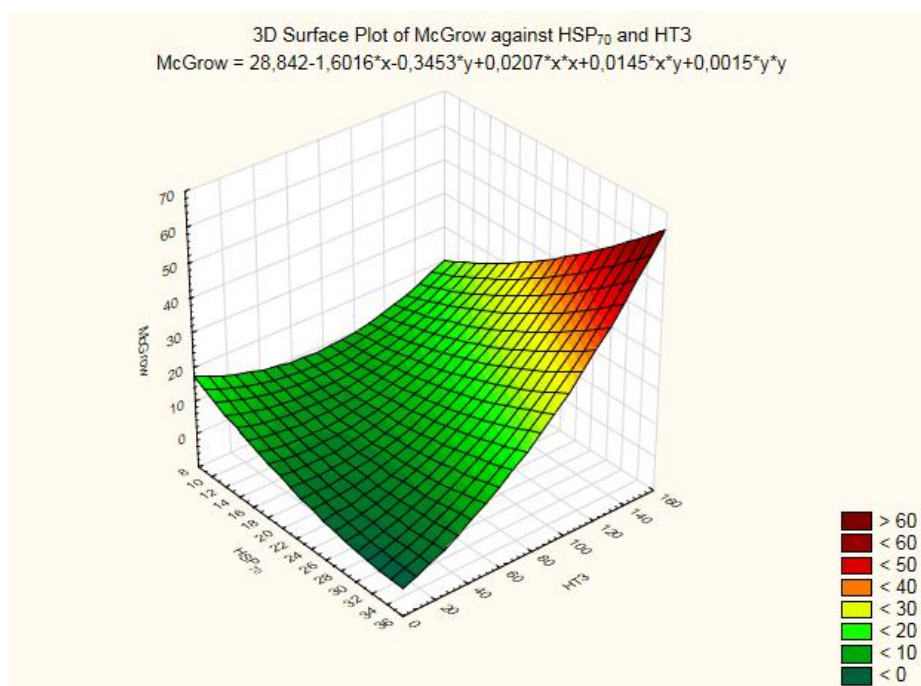


Рис. 3. Сполученість змін рівнів HSP70 та нітротирозину в корі головного мозку з розвитком неврологічного дефіциту у експериментальних тварин

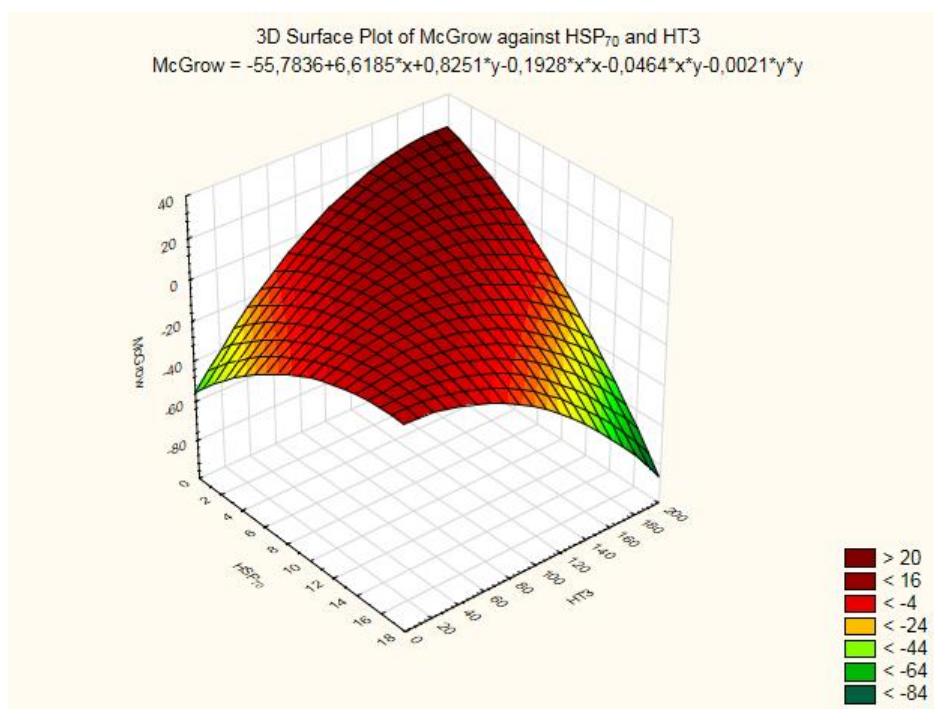


Рис. 4. Сполученість змін рівнів HSP70 та нітротирозину в гіпокампі з розвитком неврологічного дефіциту у експериментальних тварин

При розрахунку лінійної регресії як залежна змінна була обрана індекс неврологічного дефіциту, незалежними змінними виступали концентрації

нітротирозину і HSP70 в корі і гіпокампі головного мозку. Отримані результати свідчать про значну точність лінійної моделі. Подальші дослідження щодо підтвердження вибраних маркерів – HSP70, нітротирозин, відновлений глутатіон для оцінки ступеня пошкодження ЦНС підтвердили правильність вибору та дозволили виявити залежність між співвідношенням відновлений глутатіон та неврологічними порушеннями у тварин з ішемічними порушеннями головного мозку.

Моделювання ішемічної нейродеструкції викликало формування неврологічної симптоматики в усіх експериментальних тварин, про що свідчило підвищення балів неврологічного дефіциту за шкалою McGraw. Виходячи з цього, всіх прооперованих тварин розділили на 3 групи: перша – тварини з легкою неврологічною симптоматикою, друга – середній ступінь, третя – група з важким ступенем вираженості порушень. Проведені біохімічні дослідження показали чітку залежність неврологічних порушень від вивчених показників.

У цитозолі головного мозку тварин з легким неврологічним дефіцитом (середній бал – 2,35) спостерігалось падіння вмісту відновленої форми глутатіону на 47,6% та накопичення нітротирозину на 94,7% щодо показників інтактних тварин, що свідчить про розвиток оксидативного та нітрозативного стресу. Подальше збільшення неврологічних порушень супроводжувалося подальшим прогресуванням патобіохімічних реакцій. Так, у групі 2, яка характеризувалася середнім ступенем тяжкості за шкалою McGraw, підвищення неврологічного бала на 4,1 одиниці протікало на тлі падіння на 56,0% пула відновленого глутатіону та підвищення нітротирозину на 40,1% відносно показників групи 1. У тварин з тяжкими неврологічними порушеннями у тканинах мозку відзначалося суттєве накопичення нітротирозину, який вважається маркером накопичення найбільш токсичного продукту нітрозативного стресу – пероксинітриту. Рівень цього показника в 3,76 разу перевищував показники інтактної групи і був на 38,2 та 93,7% більше значень групи 2 та 1 відповідно. Посилене утворення пероксинітриту обумовлено усуненням тіол-дисульфідної рівноваги в нейронах. Відновлені тіоли, в першу чергу, глутатіон, здатні пов'язувати активні форми NO і запобігати утворенню пероксинітриту, обмежуючи тим самим його токсичну дію. Це твердження підтверджується нашими дослідженнями. Зниження концентрації відновленого глутатіону протікало паралельно з накопиченням нітротирозину та формуванням неврологічного дефіциту (табл.1). У групі 3 зареєстровано падіння у 11,6 разів порівняно з інтактними тваринами рівня відновленого глутатіону, що зрештою зумовило розвиток стійкого неврологічного дефіциту ($11,8 \pm 0,39$ балів).

Для статистичної оцінки результатів спочатку досліджували характер розподілу змінних, що вивчаються. Перевірку нормальності розподілу проводили із застосуванням W-тесту Шапіро-Вилка та критерію Колмогорова-Смирнова. Отримані дані показали, що аналізований розподіл не відрізняється від нормального. Це дозволяє при подальшому аналізі застосовувати параметричні критерії для статистичного аналізу різниці між

вибірками. Наявність або відсутність лінійного зв'язку між двома кількісними показниками, а також їх тісноту та статистичну значимість визначали обчисленням критерію кореляції Пірсона.

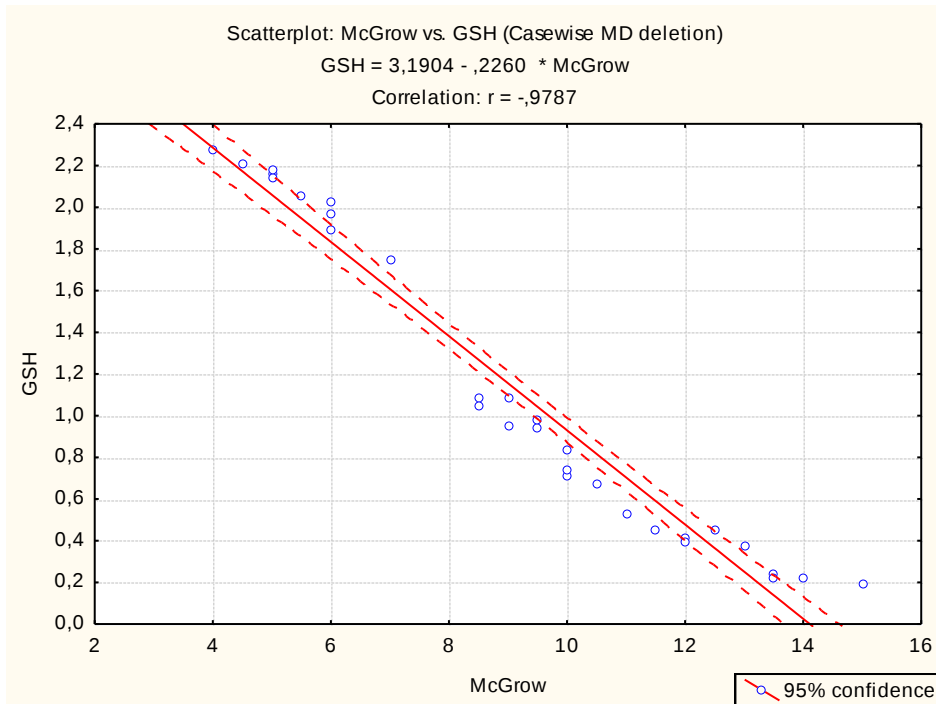


Рис. 5. Залежність ступеня неврологічного дефіциту від рівня відновленого глутатіону в головному мозку експериментальних тварин

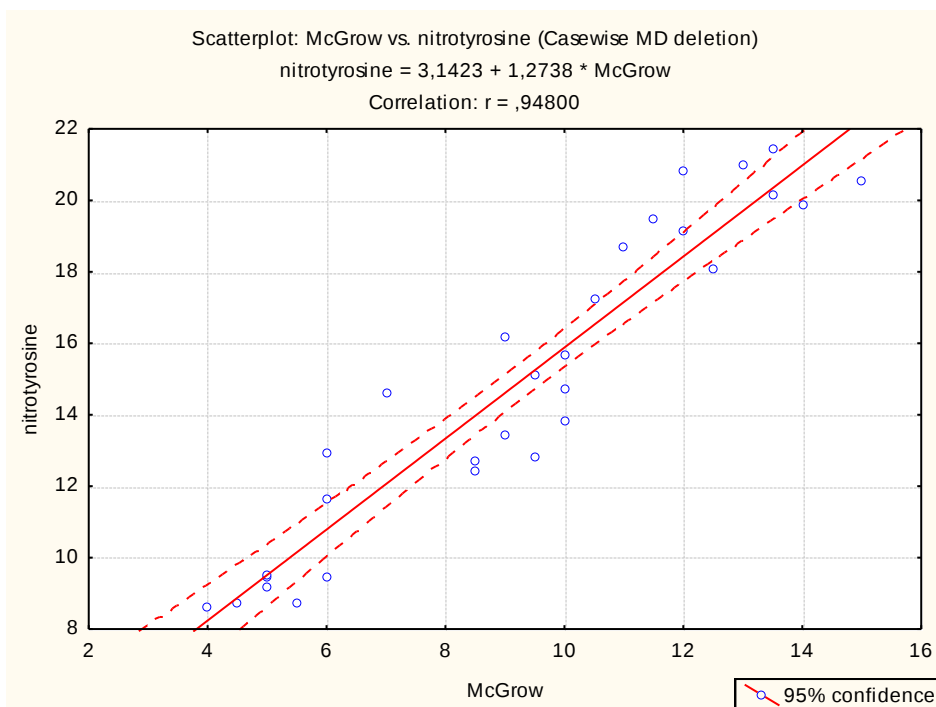


Рис. 6. Залежність ступеня неврологічного дефіциту від рівня нітритирозину в головному мозку експериментальних тварин

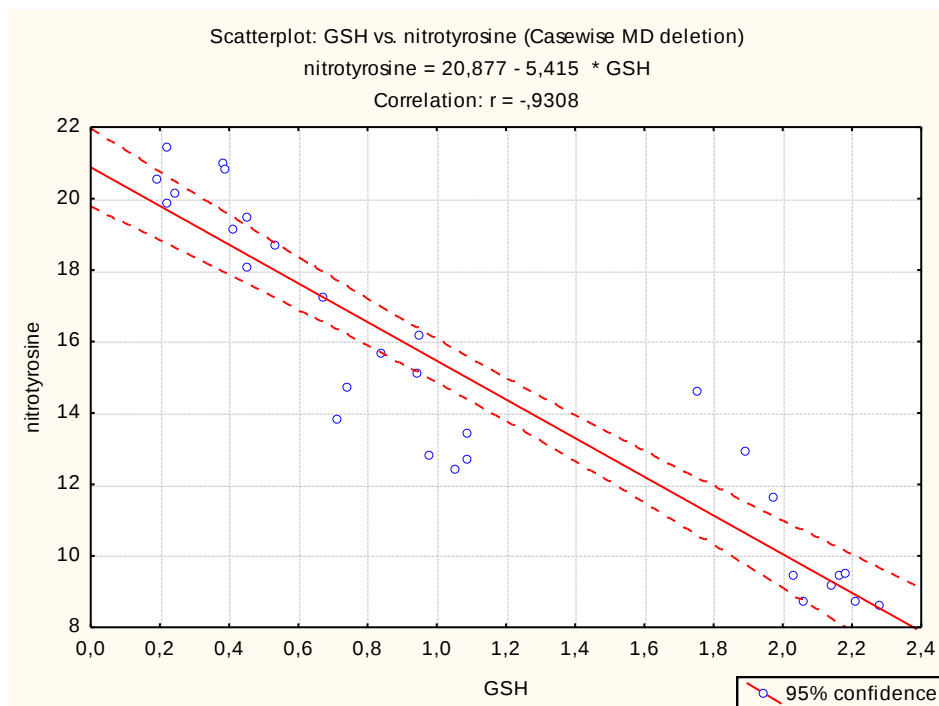


Рис. 7. Залежність концентрації нітротирозину від рівня відновленого глутатіону в головному мозку експериментальних тварин

Подані діаграми розсіювання для вибраних змінних (рис. 5 – 7) вказують на наявність вираженої прямолінійної залежності проаналізованих даних. Для неврологічної симптоматики відзначено негативну залежність з відновленим глутатіоном ($r = -0,9787$) та позитивну з рівнем нітротирозину ($r = 0,9480$). Отже, закономірною є наявність лінійного зв'язку нітротирозину з відновленим глутатіоном ($r = -0,9308$). Обчислені коефіцієнти кореляції Пірсона підтверджуються візуальною 3D-діаграмою (рис. 8), на якій графічно зображено взаємозв'язок динаміки концентрацій глутатіону та нітротирозину з вираженістю неврологічного дефіциту.

Хоча коефіцієнт кореляції і дозволяє кількісно охарактеризувати ступінь зв'язку показників, з його допомогою неможливо передбачити, чому в середньому дорівнюватиме значення одного показника при заданому значенні іншого. Це завдання вирішується застосуванням регресійного аналізу та розрахунком коефіцієнтів лінійної регресії. При розрахунку лінійної регресії як залежну змінну приймали бал неврологічного дефіциту. Отримані результати вказують на високу точність лінійної моделі: коефіцієнт множинної кореляції $R = 0,9731$; коефіцієнт детермінації $R^2 = 0,9469$; скоригований $R^2 = 0,943$ при $F = 241,01$; коефіцієнти Beta для глутатіону $= 0,5149$ ($p = 0,00023$), Beta для нітротирозину $= 0,4755$ ($p = 0,00054$). Таким чином, завдання регресійного аналізу вважатимуться вирішеним.

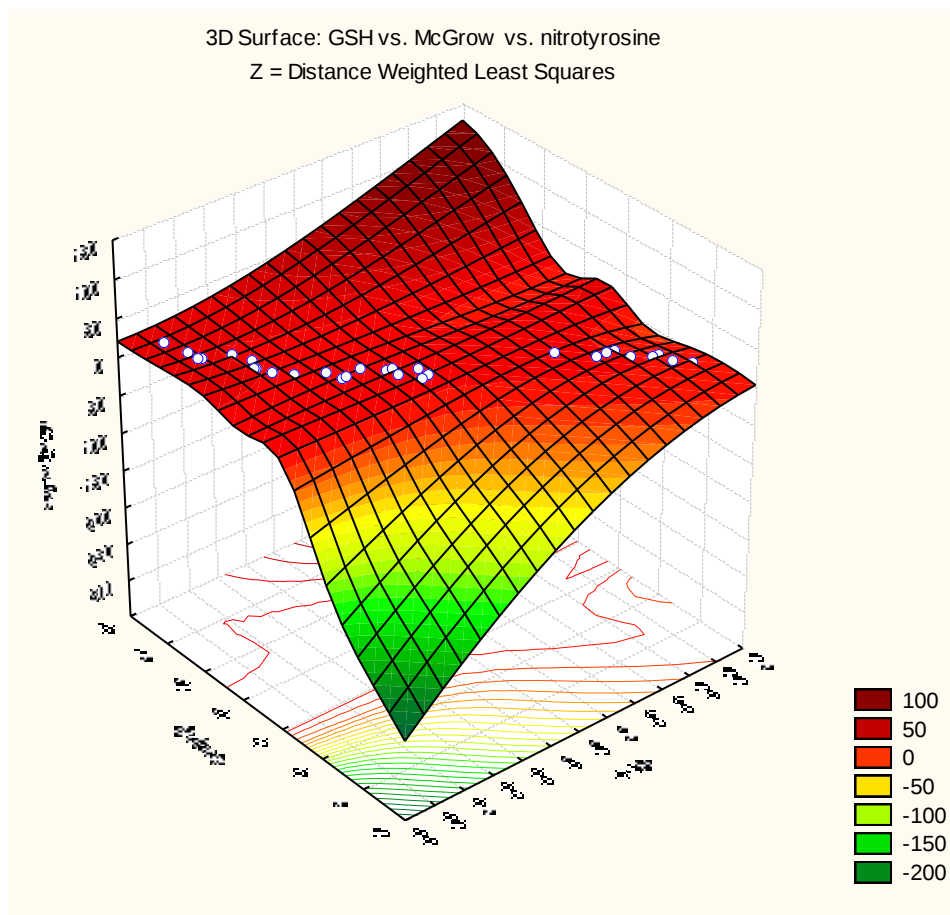


Рис. 8. Сполученість змін рівнів нітротирозину та відновленого глутатіону в головному мозку з неврологічним дефіцитом у експериментальних тварин

Враховуючи наявність чіткої лінійної залежності між дослідженими показниками, нам видається можливим обчислення коефіцієнта співвідношення рівня нітротирозину до відновленого глутатіону та можливість його використання для діагностики неврологічних порушень. З розрахованих коефіцієнтів випливає, що у нормальних умовах співвідношення нітротирозин/глутатіон ($K_{\text{нітро}}/\text{GSH}$) становить близько 1,3. Легкий рівень неврологічного дефіциту характеризується $K_{\text{нітро}}/\text{GSH}$ близьким до 5,0; при тяжких неврологічних порушеннях $K_{\text{нітро}}/\text{GSH}$ збільшується та становить близько 65,0.

Таким чином, пов'язана система «оксид азоту – відновлені тіоли» відіграє істотну роль у механізмах виживання нейронів за умов ішемічної нейродеструкції. Також подібний взаємозв'язок виявили разом проф. Опришко В.І. та аспірант Шастун Н.П. з ДДМА (м.Дніпро) при вивченні побічних ефектів з боку ЦНС у деяких антиконвульсантів, що свідчить про інформативність цього коефіцієнта та можливість його застосування при токсикологічних дослідженнях *in vitro*. Ключовим чинником підтримки нормального функціонування системи є підтримка певному рівні пула відновлених тіолів. Останні мають транспортні властивості щодо оксиду азоту, регулюють його біодоступність, є скавенджерами активних форм азоту

і запобігають утворенню пероксинітриту. Виявлено статистично достовірну лінійну залежність розвитку неврологічного дефіциту від функціонування сполученої системи «оксид азоту – відновлені тіоли».

Отримані результати розкривають значення системи глутатіону нейрона як важливої мішені нейропротективної терапії при ішемічному інсульті та є експериментальним обґрунтуванням для клінічного застосування модуляторів тіол-дисульфідної системи. Коефіцієнт співвідношення нітротирозину до відновленого глутатіону можна застосовувати з метою ранньої лабораторної діагностики когнітивно-мнестичних порушень у пацієнтів з церебральною патологією.

Таким чином, нами визначені специфічні маркери у дослідях *in vitro*, що мають найбільший інформаційний потенціал у наданні інформації про деякі важливі, виходячи з концепції біохімічної смерті нейрона, механізмів нейротоксичності. Інформативність цих маркерів експериментально підтверджена за умов цілісного організму.

Використання *in vitro*-тестів при оцінці безпеки, розробці ліків та нових продуктів стало загальноприйнятим. Згідно з принципами уряду США щодо використання тварин у наукових дослідженнях, тестуванні та освіті та політиці Міністерства охорони здоров'я США з гуманного поводження та використання лабораторних тварин, для проведення тестування на тваринах повинні використовуватися *in vitro* тест-методи визначення базальної цитотоксичності, де це прийнятно. Такі методи вважаються частиною зваженого підходу для оцінки початкової дози щодо гострої пероральної токсичності препаратів *in vivo*. Для деяких досліджуваних препаратів подібний підхід зменшує кількість тварин, що використовуються, а також частку тварин, які гинуть або умирять у процесі експерименту. Багато великих міжнародних компаній широко використовують альтернативні методи.

У 2007 році Національна наукова рада США опублікувала доповідь про майбутнє токсикологічних досліджень, в якій йдеться про те, що настав час розробки нової парадигми, не заснованої на використанні тварин. Основна пропозиція доповіді полягала у переорієнтації тестування на молекулярний рівень замість спостереження фенотипічних реакцій цілого організму, переході від тестування на цілій тварині на тестування на клітинному рівні. Такі пропозиції мають серйозні підстави, оскільки недосконалість і обмеження тестування на тваринах очевидні і зрозумілі. Традиційна токсикологія *in vivo* трудомістка, вона вимагає багато часу та витрати великої кількості продукту, що тестується. Тестування на тваринах важко адаптувати до сучасного напрямку високопродуктивних скринінгових технологій, що зрештою створює перешкоди на шляху масового скринінгу лікарських препаратів та хімічних речовин. Використання новітніх наукових інструментів для доказу безпеки та ефективності нових продуктів у найкоротші терміни, з більшою надійністю та меншими витратами є нагальною необхідністю.

Токсикологія нещодавно зазнала зсуву парадигми у бік використання альтернативних методів тестування, заснованих на знанні біологічних способів дії та шляхів, що відповідають за несприятливі ефекти, що визначаються як шляхи несприятливих результатів (AOP).

AOP являє собою логічну конструкцію, яка пов'язує висхідну молекулярну ініціюючу подію (MIE) (наприклад, взаємодія хімічної речовини з молекулярною мішенню) з несприятливим результатом (AO), прогресуючи через серію ключових подій (KE).

В даний час поширення набувають методи комп'ютерного прогнозу нейротоксичності потенційних лікарських засобів. Розробка стратегії скринінгу великої кількості хімічних речовин вкрай актуальна через потенційну дію сполук, які можуть мати довгострокові несприятливі наслідки для здоров'я нервової системи, що призводить до нейродегенерації. Шляхи несприятливих результатів (AOP) надають інформацію про відповідні молекулярні ініціюючі події (MIE) та ключові події (KE), які можуть дати інформацію про розробку обчислювальних альтернатив для цих складних ефектів.

Ми пропонуємо метод скринінгу, що інтегрує декілька моделей кількісної структури-активності (QSAR). Були змодельовані MIE існуючих мереж AOP нейротоксичності різних етапів розвитку – дитинство, зрілості, старіння – для прогнозування нейротоксичності. Для моделювання кожного MIE використовувалися моделі Linear Regression, Support Vector Machine Regression, Random Forest Regression, Gradient Boosting Regression, K-Nearest Neighbors Regression. Прогнози, що повертаються окремими моделями, були інтегровані та оцінені щодо їхньої здатності передбачати нейротоксичність. Прогнози MIE використовувалися в різних типах класифікаторів і порівнювалися з іншими еталонними стандартами (хімічними дескрипторами та квантово-хімічними параметрами) для оцінки їхньої передбачуваної здатності до нейротоксичності. Класифікатори, засновані на прогнозах MIE, дали прогностичні результати, які можна порівняти з результатами, заснованими на хімічних дескрипторах і квантово-хімічних параметрів. Прогнози, що даються QSAR, можуть являти собою ефективний перший рівень підходів до тестування та оцінки для швидкого скринінгу багатьох хімічних речовин, надаючи інформацію про потенційні MIEs та пов'язані з ними механізми токсичності, а також розставити пріоритети щодо хімічних речовин для додаткового і більш цілеспрямованого скринінгу нейротоксичності *in vitro*.

Сполуки з невідомою нейротоксичністю можуть бути віднесені до різних рівнів токсичної небезпеки на основі кількості активованих MIE та ступеня їх активації. Припускаємо, що хімічні речовини, що мають аналогічні MIE/KE як речовини з доведеною нейротоксичністю, з більшою ймовірністю самі будуть токсичними.

Виявлено можливий синергізм між концепцією AOP та моделюванням QSAR у токсикології. Таким чином, можна використовувати моделі QSAR для прогнозування потенціалу хімічних речовин у модуляції MIEs та для

визначення пріоритетності хімічних речовин залежно від їхнього токсикологічного профілю.

Подано інтегровану обчислювальну систему для прогнозування нейротоксичного потенціалу, яка заснована на ідентифікації MIE, активних хімічних сполук. MIE, нейротоксичності відомих речовин, були ідентифіковані з недавно опублікованих у відкритому друку мереж AOP, потім були опрацьовані моделями QSAR для прогнозування кожного MIE. Прогнози з QSAR для окремих MIE були оцінені щодо їхньої здатності розрізняти нейротоксичні та ненейротоксичні сполуки і також включені як складова частина інтегрованої обчислювальної системи прогнозування нейротоксичності. MIE використовувалися як незалежні змінні в різних підходах машинного навчання і порівнювалися за їхньою передбачальною силою з іншими широко використовуваними методами хімічного опису - графічна структура, квантово-хімічні параметри.

Програма QSAR для передбачення MIEs змогла визначити правильний спосіб дії кількох нейротоксичних потенціалів у відомих хімічних сполук з високим рівнем небезпеки. Наприклад, було правильно передбачено, що дихлофентіон (97-17-6), паратіон (56-38-2), параоксон (311-45-5), діазинон (333-41-5), фізостигмін (57-47-6), ібогаїн (83-74-3) стимулюють холінергічну нейротрансмісію за допомогою інгібування АХЕ, тоді як 3-нітропропіонова кислота (504-88-1), гліфосат (1071-83-6) та аргіопін (105029-41-2) взаємодіють з рецепторами НМДА. Дійсно, повідомляється, що дві перші сполуки стимулюють глутаматергічну нейротрансмісію та викликають ексайтотоксичність після активації NMDA, що призводить до окислювального стресу та загибелі нейронів, тоді як останній, як повідомляється, інгібує глутаматергічну нейротрансмісію після блокади постсинаптичних рецепторів. Було правильно передбачено, що ротенон (83-79-4) та дильдрин (60-57-1) інгібують комплекс I (НАДН-дегідрогеназу) і викликають дегенерацію дофамінергічних нейронів, спричинену активними формами кисню (АФК), та локомоторний дефіцит. Крім підвищення біологічної значущості, прогнози MIE спрощують моделі до меншого числа змінних (тобто менше 20), тоді як у разі використання квантово-хімічних дескрипторів у моделі можуть бути включені кілька сотень змінних. Розроблені RF для прогнозування окремих MIEs дали задовільні передбачувальні результати і були підтверджені як цінний метод у галузі обчислювальної токсикології. Також у токсикології використовуються методи *in vitro* із застосуванням клітинних культур.

Клітини *in vitro* є засобом, що забезпечує подальший розвиток у цьому напрямку. В даний час можна культивувати широкий спектр клітин різних типів, у тому числі з різних тканин і видів. Це дуже зручно, тому що створюються умови для визначення органо-і видоспецифічної токсичності. Якщо ж використовуються клітини людини, то мінімізуються проблеми міжвидової екстраполяції. Іншими словами, переваги тестів *in vitro* полягають у тому, що вони швидкі, недорогі та дозволяють досліджувати специфічні механізми дії досліджуваних агентів.

Ще одна перевага моделей *in vitro* полягає у можливості роботи безпосередньо на культурах клітин людини, що робить отримані дані адекватнішими при їх проєкції на організм людини. Крім того, використання культур клітин дозволяє встановити характер біологічної активності досліджуваних сполук безпосередньо на клітинному рівні та врахувати складні синергічні та/або різноспрямовані ефекти сумішей хімічних сполук.

Великий внесок у розвиток нового напрямку – токсикології *in vitro* зробив Б'єрн Екволл. Сформульована ним концепція т.з. базової цитотоксичності лежить в основі використання тестів на культурі клітин для визначення гострої токсичності хімічних речовин замість тестів на тваринах. Щоб на практиці перевірити свої теорії, було організовано міжнародний токсикологічний проєкт під назвою Multicentre Evaluation of In Vitro Cytotoxicity Programm (MEIC), де 50 відібраних хімічних речовин тестувалися в 100 лабораторіях у всьому світі, причому було застосовано більше 60 різних тестів *in vitro*. Результати проєкту MEIC наочно продемонстрували можливість використання тестів *in vitro* для прогнозування токсичних концентрацій хімічних речовин в організмі людини. У ході роботи над цим проєктом було виділено 3 типи токсичності:

1. Базова (загальна) цитотоксичність – несприятливий вплив хімічних речовин на загальні для всіх клітин структуру та функції, необхідні для виживання клітини, поділу, реплікації ДНК тощо.

2. Органоспецифічна цитотоксичність – вплив на структури та функції, специфічні для певних клітин тканин та органів.

3. Позаклітинна токсичність – проявляється, якщо ксенобіотик безпосередньо не впливає на клітину, але його дія критична на рівні цілісного організму та охоплює процеси, що відбуваються поза клітинами (наприклад, клітинна секреція).

У багатьох закордонних посібниках зазначено, що всі три типи цитотоксичності можуть мати місце *in vivo*, тому повинні враховуватися у стратегії досліджень *in vitro*. Дослідження токсичності лікарських препаратів *in vitro* проводять на первинних культурах клітин та тканин, виділених з організму тварин, людини, а також тіх, що перевиваються або постійних, отриманих з окремих видів пухлин. До первинних культур клітин людини належать гепатоцити, епітеліоцити, кератиноцити, хондроцити. Первинні культури клітин тварин представлені гепатоцитами, клітинами крові. Також для оцінки токсичності використовують постійні клітинні лінії людини: клітини недрібноклітинного раку легень – А-549, нейробластоми NB-1, епітеліальні клітини синовіальної рідини McCoу та ін. Серед постійних клітинних ліній тварин у токсикологічних дослідженнях використовують: фібробласти мишей – L939, BALB; клітини гепатоми щурів – HTC; клітини пухлини Ерліха мишей та ін. Зі спеціалізованих клітин можна виділити еритроцити периферичної крові мишей BALB/с, сперматозоїди бика, м'язові клітини щура. Дослідження на різних клітинних лініях надає чітку інформацію про потенційні ефекти лікарських препаратів та їх специфічну дію.

В даний час дослідження загальної та специфічної токсичності потенційних тератогенів найбільш ефективно проводяться із застосуванням поліпотентних стовбурових клітин ембріонів людини, які здатні до диференціації *in vitro* з утворенням міокардіальних, м'язових, ендотеліальних клітин, гепатоцитів.

При оцінці тканинної токсичності використовують зрізи тканин та реконструйовані моделі, які імітують нормальні тканини *in vitro*. Такі моделі дозволяють проводити такі випробування, як дослідження дратівливої дії лікарських препаратів, дослідження фототоксичності, дослідження абсорбції речовини через шкіру та її бар'єрної функції та ін. На сьогодні відомі комерційні органотипові та реконструйовані моделі епідермісу, такі як EPISKIN, EpiDerm, Full Thickness. На зазначених моделях були виконані досліді з вивченням шкідливої дії великої кількості хімічних речовин.

Ці моделі стандартизовані, зареєстровані та внесені Європейською організацією економічного співробітництва та розвитку (OECD) у аркуш інструкцій із тестування токсичності хімічних речовин, а також до нового Європейського законодавства REACH. Одним із найскладніших напрямків у створенні альтернативних моделей вивчення токсичності є розробка моделей бар'єрних систем організму. У цьому напрямі найбільш вагомим успіхом досягнуто у відтворенні епітеліального бар'єру, який є першою перешкодою на шляху проникнення ксенобіотика в організм. Для досліджень інтерстиціального бар'єру найбільшого розвитку набули моделі процесів абсорбції з використанням клітинних ліній HT-29 та Caco-2. Щодо гематоенцефалічного бар'єру, що є важливим для багатьох токсичних речовин, то в цьому напрямку розробляються тривимірні моделі, що містять гліальні та ендотеліальні клітини. Були створені органотипові моделі: модель ока для вивчення дратівливої дії на заміну тесту Драйзера на кроликах. Система клітинних культур, аналогічна до головного мозку, що розроблена для тестування нейротоксичності.

Нейрони є основними клітинами, відповідальними за передачу електричних сигналів у мозку. Зв'язок та передача сигналів нейронів здійснюється синапсами, спеціалізованими сполуками між двома нейронами, де передаються хімічні та електричні сигнали. На основі їх впливу на мозок нейрони можна загалом класифікувати як збуджуючі нейрони, які можуть стимулювати нейронну активність, та гальмівні нейрони, які пригнічують активність. Збудливі нейрони передають сигнали, які активують інші нейрони, через збуджуючі нейротрансмітери (наприклад, глутамат), тоді як гальмівні нейрони передають сигнали, які пригнічують активність інших нейронів, вивільняючи гальмівні нейротрансмітери, такі як гамма-аміномасляна кислота (ГАМК). Таким чином, баланс між збуджуючими та гальмівними нейронами має вирішальне значення для підтримки нейронного ланцюга. Збудливі проєкційні нейрони класифікуються на основі їх еферентних цілей, при цьому інтрателенцефальний (ІТ) тип проєктується в інші кіркові області і смугасте тіло, в той час як пірамідальний тракт (РТ) тип проєктується більш віддалені цілі, такі як таламус, середній мозок, стовбур та

спиний мозок. ІТ нейрони полегшують внутрішньокіркову комунікацію та кортикостріатні зв'язки, які необхідні для інтеграції сенсорної інформації та координації складної поведінки. РТ нейрони особливо важливі для сенсорного сприйняття та виконання рухів, кодуючи окремі потоки інформації, необхідні для сприйняття тактильних чи візуальних стимулів та для ініціювання рухових реакцій. Здоровий людський мозок підтримує постійне співвідношення збуджуючий/гальмуючий (Е/І) для підтримки нормальної функції та стабільності. Дисбаланс у співвідношенні Е/І може призвести до неврологічних розладів при нейротоксичності деяких нейропсихотропних препаратів депримируючої дії.

Кортикальні інтернейрони відіграють вирішальну роль у підтримці балансу Е/І у нейронних ланцюгах, використовуючи ГАМК як ключовий передавач. Різні підтипи гальмівних нейронів, включаючи ті, які експресують три різних кальційзв'язуючих білка парвальбумін (PV), кальбіндин (CB) та кальретинін (CR) у різних популяціях, соматостатин (SST) та вазоактивний інтестинальний пептид (VIP), класифікуються з різною морфологією та електрофізіологією. PV-інтернейрони беруть участь у контролі нейронних спайків і мережевих коливань, зазвичай націлюючись на область навколо тіла клітини пірамідальних нейронів, у той час як SST-інтернейрони націлюються на дистальні дендритні області і відіграють ключову роль у регуляції локальної провідності між синапсом і дендритним шипиком. Інтернейрони PV беруть участь у просуванні прямого гальмування, полегшуючи синхронізацію низькочастотних спайків, в той час як інтернейрони SST посилюють зворотне гальмування, що має вирішальне значення для синхронізації високочастотних спайків. Цей складний баланс між нейронами PV та SST необхідний для тонкої регуляції синаптичного зворотного зв'язку. Інгібуючі нейрони VIP демонструють високу щільність шипиків на своїх дендритах та наявність збудливих синаптичних контактів. Цей щільний зв'язок та наявність множинних збудливих синапсів на окремих шипиках припускають, що інтернейрони VIP ефективно деполяризуються кластеризованими синаптичними входами, полегшуючи їх роль у пластичності кори. Дослідження показали, що зміни в інгібуючих нейронах PV відіграють центральну роль у когнітивній дисфункції при нейротоксичній дії нейролептиків, психостимуляторів, галюциногенів. В останні десятиліття моделі *in vitro* для відтворення людського мозку були широко розроблені для вивчення розвитку мозку, гомеостазу та нейротоксичності. Ці моделі поділяються на двовимірні моношарові культури, двовимірні трансвели, тривимірні органоїди, органи-на-чіпах та біоінженерні тканинні моделі, що прагнуть імітувати складність нативного мозку, включаючи молекулярні профілі, клітинні популяції, функції, взаємодії та структури. Двовимірна моношарова клітинна культура та трансвелові системи корисні для базових кінетичних досліджень для отримання гомогенних нейронних відповідей при тестуванні ліків, але їм не вистачає складності тканини людського мозку, такої як клітинна різноманітність, просторова орієнтація та тривимірна морфологія. Brain-on-a-chip (BoC) – це нова технологія, яка спрямована на

імітацію структури та функції людського мозку у мікрофлюїдному пристрої. Вона поєднує принципи мікрофлюїдики, тканинної інженерії та біології стовбурових клітин для створення платформи для вивчення мозку в контрольованому рідинному стані та реалістичному середовищі. Системи Organ-on-chip дозволяють вивчати різноманітну мікрофізіологію людського мозку, включаючи гематоенцефалічний бар'єр, запальну систему та багатоорганні комунікації. Таким чином, значний прогрес у технології клітинної та тканинної інженерії для створення більш складних систем моделей людського мозку, включаючи 3D-органоїди, органи-на-чипі та біоінженерні моделі тканин, пропонує більш точне уявлення про унікальну природу людського мозку. Гематоенцефалічний бар'єр (ГЕБ) є найважливішою структурою між кров'ю та мозком. Він регулює транспорт молекул, захищає від патогенів і таким чином є основною перешкодою для ефективної доставки ліків у мозок. Традиційні *in vitro* моделі ГЕБ мають обмеження у відтворенні складних анатомічних та фізіологічних особливостей гематоенцефалічних бар'єрів. Проте нещодавні досягнення у технології органів на чіпі призвели до розробки моделей ГЕБ на чіпі. Ці моделі використовують мікрорідинні пристрої для більш точного відтворення мікросередовища ГЕБ та міжклітинних взаємодій шляхом включення клітин ендотелію мікросудин мозку, астроцитів, перицитів та різних нервових клітин для імітації структури та функції ГЕБ. Моделі ГЕБ на чіпі пропонують кілька переваг, включаючи можливість вивчати молекулярні токсикологічні механізми лікарських засобів, скринінг нейропротективної активності серед сполук – кандидатів та прогнозування нейродоступності нових молекул.

Розроблені в даний час методи отримання нервових клітин в індивідуальному стані дозволяють отримати якісно нову та достовірну інформацію про стан нервової тканини в умовах тестування нових хімічних сполук або проведення нейротоксичності відомих лікарських засобів. Для досліджень *in vitro* використовують білих щурів-самців у віці 4 тижні та масою 80–100 г. Виділення збагачених фракцій нейронів та нейроглії проводиться у два етапи. На першому етапі мозкова тканина дезінтегрується з метою отримання клітинної суспензії, на другому здійснюється диференціальне ультрацентрифугування в градієнті щільності сахарози і фіккола. Для отримання нейронів та нейроглії щурів декапітують і швидко витягують мозок. Кору головного мозку відокремлюють від білої речовини, подрібнюють і переносять у розчин, що містить 7,5% полівінілпіролідону (ПВП), 1% бичачий сироватковий альбумін (БСА) та 10 мМ CaCl₂. Отриману суспензію фільтрують через три сита під незначним тиском для зменшення втрат нейрональних клітин. Після послідовного пропускання через сито клітинну суспензію нашаровують на градієнт, що складається з 1М та 1,75М сахарози. Центрифугування проводять при 60 000 g протягом 15 хв (при температурі 10 °C). В результаті центрифугування одержують два шари та щільний осад. Верхній шар представлений залишками мієлінових оболонки, другий шар складається з гліальних та нейрональних клітин. Осад,

представлений тілами нейронів, відповідав ступеню чистоти 90%. Надалі проводять додаткове очищення другого шару шляхом другого фільтрування та ультрацентрифугування. Виділені нейрональні клітини відмивають від сахарози та альбуміну охолодженим фізіологічним розчином (температура розчину 4°C). Отриману таким чином суспензію поділяють на серії:

1) інтактна (суспензія нейронів без внесення фармакологічних або хімічних агентів, що досліджуються);

2) контрольна: до суспензії нейронів додають досліджувані речовини у зростаючих концентраціях, кратним їх молекулярній масі.

Нейротоксичність досліджуваних речовин оцінюють за:

а) тістом з нітритом срібла. Принцип методу заснований на вибіркового фарбуванні (в темний колір) нейронів, що дегенують. З цією метою готують мазки на предметному склі із суспензії нейронів інтактної, контрольної та проби з додаванням потенційних нейропротекторів, які фіксували сумішшю спирту, формаліну та оцтової кислоти (7:2:1), з подальшим фарбуванням нітратом срібла для виявлення дегенеруючих нейронів. Про нейротоксичність досліджуваних агентів судять за появою в пробі нейронів, що дегенують;

б) за методом диференціального визначення апоптуючих клітин. Для цього використовують методику диференціального фарбування апоптуючих та некротуючих клітин флуорисцентними барвниками: hoechst 33342 (апоптоз) та етідіумом бромідом (некроз). Для цього мазки послідовно фарбують протягом 15 хв Hoechst 33342 (50 мкг/мл) та етідіумом бромідом (10 мкг/мл). Після кожного барвника мазки промивають фосфатним буфером з подальшою фіксацією в 5% розчині формальдегіду (20 хв.). Кількість некротичних клітин підраховують за допомогою флуоресцентного мікроскопа; некротичними, вважаються великі червоні клітини, апоптичними – зелені із фрагментованими ядрами.

Крім дослідження нейротоксичності досліджуваних речовин *in vitro* за ступенем їхнього впливу на процеси клітинної загибелі, можливе вивчення в суспензії нейронів низки біохімічних показників енергетичного обміну, оксидативного стресу, NO-; ГАМК-ергічної тіол-дисульфідної систем, а також імуноферментним методом – деяких маркерів деструктивних процесів нервової тканини (нейроспецифічні білки, нейротрофічні фактори). Особливий інтерес щодо нейротоксичності *in vitro* можуть представляти деякі молекулярні маркери морфо-функціонального стану нервової тканини:

1. Основний білок мієліну (MBP) визначається методом ІФА або імуноблотінгом. MBP виділяється за будь-якого пошкодження нервової тканини.

2. Фосфорильований нейрофіламент Н (pNF-H) визначається методом ІФА або імуноблотінгом. pNF-H – чутливий маркер ушкоджень аксонів.

3. Експресія/концентрація білків теплового шоку в головному мозку визначається імуногістохімічно, імуноблотінгом, ІФА. В еволюційному відношенні Hsp відносяться до висококонсервативних білків та виявляються у всіх організмах від бактерій до людини. Це свідчить про те, що вони

виконують фундаментальні клітинні функції. Як цитопротекторні властивості стрес-білків, так і їхня роль у процесах нормальної життєдіяльності клітини багато в чому визначається тим, що ці білки є шаперонами. Шаперони – це білки, які полегшують формування вторинної та третинної структури інших білків. Hsp також беруть участь у процесах репарації або елімінації неправильно згорнутих або денатурованих білків. Відповідно до сучасної класифікації виділяють сім (останнім часом йдеться навіть про вісім) типів sHsp, які поділяють або за м.м., або за функціями, що виконуються в клітині. Розрізняють малі Hsp (small Hsp, sHsp) із м.м. 25/27 кДа, 22 і 20 кДа, а також високомолекулярні Hsp110, 100, 90, 70, 60, 40. За характером синтезу Hsp (подібно до NO-синтази) поділяються на конститутивні та індукцйбельні. Конститутивні Hsp синтезуються в клітині постійно, і для їх активації не потрібно впливу на клітину пошкоджуючого фактора, тобто синтез їх при стресі не збільшується. Синтез індукцйбельних Hsp починається незабаром після впливу на клітину агента, що ушкоджує.

4. DR5 (Death Receptor) визначається імуногістохімічно, імуноблотінгом. «Рецептори смерті» (DR) містять цитоплазматичні домени смерті DD (death domain), які, зв'язуючись з лігандом смерті, залучають адапторні білки, що містять домени DD та домен виконавця смерті – DED (death eff ector domain).

5. Сімейство Bcl-2 визначаються ІФА, імуногістохімічно, імуноблотінгом. Сімейство клітинних білків Bcl-2 налічує 17 членів. Білки сімейства Bcl-2 виявляють широкий спектр активності від пригнічення апоптозу до його індукції. Сімейство включає субсімейства, що відрізняються функціонально і структурно: субсімейство найближчих гомологів Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-w та ін) – інгібіторів апоптозу; білки субсімейств Bax і BH3, що промотують апоптоз. Апоптоз асоціюється з різними змінами у мітохондріях, включаючи вивільнення цитохрому-С у цитоплазму. Bcl-2-споріднені білки включені в регуляцію цих змін шляхом формування каналів у мембрані, через які цитохром-3 надходить у цитоплазму. При цьому Bcl-2 і Bcl-XL пригнічують викид цитохрому-С, а Bax-стимулює. Однак Bcl-2 може пригнічувати здатність Bax формувати канали. Крім того, Bcl-2 і Bcl-XL можуть пов'язувати цитохром-С безпосередньо і витіснити його з апоптосоми, запобігаючи цим активації каспаз.

Дослідженнями останніх років встановлено, що мітохондрія є пріоритетною мішенню в реалізації токсикодинаміки багатьох лікарських препаратів (цитостатиків, антибіотиків, серцевих глікозидів тощо). У зв'язку з цим доцільно в токсикологічних дослідженнях *in vitro* проводити оцінку «мітодеструктивної дії».

Для дослідження *in vitro* «мітодеструктивної дії» потенційних нейропротекторів за наступною методикою з головного мозку виділяють мітохондріальну фракцію:

У дослідах використовуються білі щури масою тіла 160-170 г. З головного мозку швидко видаляли кров, відокремлювали від мозкової

оболонки і досліджувані шматочки поміщали рідкий азот. Потім подрібнювали в рідкому азоті до порошкоподібного стану і гомогенізували в 10-кратному об'ємі середовища при (2°C), що містить (у ммольх): сахарози – 250, трис-НСІ-буфера – 20, ЕДТА-1 (рН 7,4). При температурі (+4°C) методом диференціального центрифугування на рефрижераторній центрифугі виділяють мітохондріальну фракцію. Для очищення мітохондріальної фракції від великих клітинних фрагментів попередньо проводиться центрифугування протягом 7 хвилин при 1000g, потім супернатант повторно центрифугують протягом 20 хвилин при 17000g. Супернатант зливають та зберігають при -80°C. Осад мітохондрій ресуспендують у середовищі виділення, що містить бичачий сироватковий альбумін (0,5 мг/мл) і знову осаджують протягом 10 хвилин при 17000g. Мітохондрії суспендують у середовищі виділення, суспензія містить 40-60 мг білка/мл. Для тривалого зберігання мітохондрій заморожують при -80 °C. Для визначення швидкості відкриття мітохондріальної пори використовують суспензію 0,5-1,0 мг білка/мл. Для проведення досліджень в інкубаційну суміш вносять суспензію мітохондрій (1 мг білка в пробі). 1 мМ КН₂РО₄ можна вносити в момент індукції відкриття пір через 5 хв. після внесення речовини, що вивчається.

Варіанти інкубаційної суміші:

1. 120 мМ КСІ, 0,5 мМ КН₂РО₄, 2 мМ глутамату, 1 мМ малату, 20 мМ трис-амінометану, рН 7,4.
2. 70 мМ цукрози, 5 мМ НЕРЕС, 70 мМ КСІ, 0,5 – 1 мМ КН₂РО₄, рН 7,4.

Загальний об'єм інкубаційної суміші складає 3 мл.

Перед дослідом у проби вносять досліджувані речовини (10 – 100 мкМ у пробі) та інкубують 2 хв.

Мітодеструктивна дія вивчається за здатністю досліджуваної речовини посилювати відкриття мітохондріальних пір (МП) та знижувати мітохондріальний потенціал Ψ . Відкриття МП визначають при $\lambda = 540$ нм при 25 °C при постійному перемішуванні протягом 25 хв. Визначення мітохондріального потенціалу проводять із сафроніном О (9 мкМ на пробу) по різниці світлопоглинання при 515 і 525 нм ($A_{515} - A_{525}$ нм).

У контексті вищевикладеного слід проаналізувати етико-правові основи токсикологічних досліджень.

Як відомо, гуманне ставлення до людей починається з гуманного ставлення до тварин. На сьогоднішній день міжнародною спільнотою було прийнято достатньо правових актів, які регулюють належну поведінку людини з тваринами, у тому числі лабораторними під час проведення медико-біологічних експериментів. Серед них досить важливе місце займає Положення про використання тварин у біомедичних дослідженнях, прийняте 41 Всесвітньою медичною асамблеєю у вересні 1989 року. Основні постулати цього Положення наказують такі принципи використання тварин під час проведення біомедичних досліджень:

– проведення навчальних заходів із персоналом науково-дослідних установ з питань правильного поводження, транспортування та догляду за тваринами;

– забезпечення ветеринарного супроводу медико-біологічних експериментів;

– всі дослідні установи повинні дотримуватись правил гуманного поводження з лабораторними тваринами.

Не менш важливим документом є Міжнародні рекомендації (етичний кодекс) щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин, які розроблені та опубліковані у 1985 році Радою міжнародних наукових організацій. Основні етико-правові положення, закріплені рекомендаціями, мають такий зміст:

– з метою розробки більш досконалих засобів охорони здоров'я за потреби слід застосовувати математичні моделі, машинне моделювання та біологічні системи *in vitro*;

– експерименти на тваринах слід проводити тільки після оцінки їх значення для здоров'я людини або самих тварин і для прогресу біологічних знань, для експериментів необхідно використовувати тільки здорових особин у мінімально необхідній кількості;

– дослідникам слід ставитися до тварин таким чином, щоб звести до мінімуму незручності, страждання і біль, що завдаються їм, у тому числі із застосуванням належних седативних, анальгетичних або наркотичних засобів відповідно до норм, прийнятих у ветеринарній практиці (при необхідності відступу від цієї норми, рішення приймається відповідним компетентом);

– у важких ситуаціях, які не підлягають лікуванню, тварини підлягають смертвінню безболісним способом;

– лабораторним тваринам слід забезпечити оптимальні умови життя з ветеринарним доглядом;

– навчання персоналу, що проводить дослідження, гуманному поводженню з тваринами.

Обидва документи, як бачимо, мають на увазі життєву необхідність проведення медико-біологічних досліджень з участю тварин. Але якщо перший документ, а саме Положення про використання тварин у біомедичних дослідженнях, не містить альтернативи дослідженням за участю тварин, то другий документ, а саме Міжнародні рекомендації (етичний кодекс) щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин, містить у собі альтернативу дослідам, поставленим на лабораторних тваринах, яка включає застосування математичних моделей, машинного моделювання та біологічних систем *in vitro*. Хоча, згідно з згаданими Міжнародними рекомендаціями, така альтернатива повинна застосовуватися лише «там, де необхідно», а не «там, де можливо». Тобто, виходячи з логіки авторів зазначеного документа, методи дослідження, альтернативні дослідженням з тваринами повинні застосовуватися лише в тому випадку, якщо певний вид дослідження не може показати належної якості результатів без застосування таких альтернативних методів, а не в ситуації з точністю до

навпаки, коли застосування альтернативних методів дозволяє забезпечити належну якість експериментів. Саме останній спосіб застосування альтернативних методів різко скоротив необхідність використання для цих цілей лабораторних тварин.

Європейська Конвенція про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментів або в інших наукових цілях, прийнята державами-членами Ради Європи 18 березня 1986 року в Страсбурзі, закріплює такі постулати:

- тваринам, які використовуються в наукових цілях, повинні бути забезпечені належний догляд, ветеринарний супровід та умови, що дозволяють задовольняти їх фізіологічні та етологічні потреби;

- наукові дослід з тваринами не повинні здійснюватися, якщо є виправдана та здійсненна можливість застосування іншого прийнятного наукового методу без використання тварин і держави повинні заохочувати застосування таких методів;

- у разі необхідності проведення наукових експериментів з тваринами, необхідний уважний підхід до вибору конкретних тварин із бажаним обґрунтуванням такого вибору компетентним державним органом, вибору найбільш безпечних та найменш травматичних методів з найменшою кількістю випробуваних тварин та найбільш задовільними результатами;

- повсюдне використання методів загальної чи місцевої анестезії або методів аналгезії, якщо це можливо та доцільно;

- найбільш болючі та травматичні наукові заходи мають проводитися лише за згодою компетентного державного органу;

- по завершенню будь-якої наукової процедури особою, відповідальною за цю процедуру або ветеринаром, приймається рішення про збереження тварини або її умертвіння гуманним методом у разі, якщо тварина постійно відчуватиме біль або тривогу;

- жодна тварина після участі у важкому для її здоров'я експерименті не може бути використана повторно для наукових цілей, крім випадків проведення процедур під анестезією та подальшого умертвіння або якщо це передбачає мінімальне втручання;

- за рішенням компетентних державних органів тварина після проведених над нею експериментів може бути відпущена на свободу, якщо забезпечений дослідниками догляд дозволяє тварині перебувати в нормальному фізіологічному стані, випуск тварини на свободу для досягнення навчальних чи тренувальних цілей не допускається;

- створення у державах спеціальної дозвільної системи органів, які видавали б відповідні дозволи компетентним особам на проведення експериментів за участю тварин;

- установи-розплідники та установи-постачальники, а також установи-користувачі повинні бути зареєстровані у відповідній державній інстанції, умови утримання тварин повинні відповідати міжнародним стандартам, у тому числі з відповідним маркуванням, веденням реєстрів та належним ветеринарним доглядом;

– бродячі домашні тварини не можуть бути використані в наукових дослідженнях, для цих цілей використовуються тварини, що походять тільки з установ-розплідників або установ-постачальників, якщо не застосовується загальне або спеціальне визволення;

– належна професійна підготовка осіб, які проводять дослідження з використанням тварин;

– дослідження з використанням тварин в освітніх цілях для професійної підготовки кадрів можуть відбуватися лише під наглядом компетентної відповідальної особи і лише у випадках, якщо мета таких занять не може бути досягнута іншими методами (наприклад, за допомогою аудіовізуальних засобів тощо);

– держави проводять спеціальну статистику проведення досліджень, дані якої передаються Генеральному Секретарю Ради Європи;

– з метою уникнення непотрібних повторень наукових досліджень із використанням тварин, держави визнають результати таких досліджень, проведених в інших державах.

Останнім часом, як у національному законодавстві країн Європи, так і всього світу загалом, тенденції захисту як загальних прав тварин, так і їхнього захисту у сфері проведення біомедичних досліджень більш посилюються.

Наприклад, у країнах Євросоюзу повна заборона випробування косметичних засобів на тваринах, а також заборонено: купірування хвоста, вух, видалення кігтів.

Вперше у європейському регіоні на конституційному рівні обов'язок забезпечити благополуччя тварин закріпила Швейцарія. У 1994 році проведений у Швейцарії референдум змінив статус тварин з «речі» на істот, що «відчувають». У Швейцарії Законом від 1978 року докладно врегульовано питання забезпечення благополуччя та захисту від жорстокого поводження не лише домашніх тварин, а й лабораторних та сільськогосподарських. Закон містить вимоги до умов утримання тварин, підготовки персоналу для роботи з лабораторними тваринами, умов отримання дозволу на утримання диких та домашніх тварин, торгівлі тваринами, транспортування. Окрема увага приділена отриманню дозволу на проведення експериментів, а також необхідності знеболювання тварин під час експериментів.

2002 року Німеччина доповнила Конституцію положенням про захист тварин (стаття 20a). До вживання конкретних заходів щодо захисту тварин привела активна діяльність громадських організацій (Tierschutzverein) – Товариств захисту тварин. Закон про захист тварин встановлює штрафні санкції у разі порушення правил поводження з тваринами, а також встановлено спеціальне оподаткування. У Німеччині евтаназію здорових тварин повністю заборонено.

Іспанія вперше у світі зрівняла права людини та тварин. У 2008 році визнала право кожної людиноподібної мавпи на життя, свободу та захист від жорстокості. Тепер в Іспанії мавпи не можуть розглядатися як об'єкти приватної власності, заборонені дослідження на мавпах, утримання їх для

циркових та телевізійних програм та серйозно покращено умови проживання у зоопарках.

Нова Зеландія офіційно визнала у квітні 2016 року, що всі тварини є розумними істотами. Переслідуються ті люди, які жорстоко поводитися з тваринами. Заборонено дослідження та досліди на тваринах.

Індія стала першою країною у світі, яка визнала права дельфінів. Дельфінів слід розглядати як «особи нелюдської природи» з наданням їм права вважатися індивідуумами. Заборона на дельфінарії та утримання дельфінів у неволі. Крім того, Індія стала першою країною в Південній Азії, яка заборонила тестування косметики та її інгредієнтів на тваринах.

Проведені дослідження показали, що реконструйовані моделі, що імітують нормальні тканини *in vitro*, мають хорошу кореляцію із системною токсичною дією, що визначається у тварин. Таким чином, дослідження з використанням клітинних культур дозволяють проводити порівняльну експрес-оцінку токсичності та небезпеки хімічної речовини, дослідження порушення обміну речовин у клітині, вивчення цито- та органотоксичності, мутагенних та канцерогенних ефектів. Для дослідження цитотоксичності ксенобіотиків на культурі клітин рекомендовано такі тести:

- 1) визначення кількості життєздатних клітин із використанням трипанового синього;
- 2) визначення вмісту загального білка як показника приросту клітинної маси, який також може бути показником клітинної проліферації;
- 3) визначення змін активності дихальних ферментів у тесті з метилтетразолієм (МТТ);
- 4) оцінка лізосомальної активності та інтенсивності процесів активного мембранного переносу – по поглинанню барвника нейтрального червоного;
- 5) оцінка ступеня пошкодження цитоплазматичної мембрани – після виходу в середовище інкубації ферменту лактатдегідрогенази (ЛДГ).

Крім перерахованих вище методів, досить часто застосовуються такі тести, як визначення порушення регуляції іонного складу, оцінка порушення процесів метаболізму, визначення вмісту аденозинтрифосфату (АТФ) у клітинах та інкубаційному середовищі, оцінка морфологічних змін клітин.

Для вивчення органотоксичності використовують тести, що і при визначенні загальної токсичності, а також специфічні маркери: ферменти аланінамінотрансфераза (АЛТ) та аспартатамінотрансфераза (АСТ) – для клітин печінки; ЛДГ та тропонін – для клітин серцевої тканини; для фіброblastів шкіри – швидкість синтезу колагену; для імунотоксичності – синтез інтерлейкінів та антитіл, рівень С-реактивного білка. Крім того, для всіх типів клітин можна провести ПЛР (полімеразну ланцюгову реакцію) діагностику з метою визначення активації того чи іншого гена, що відповідає за синтез білка, ферменту, кофактора. За результатами вищевказаних тестів визначають такі параметри, як IC50 (концентрація, що пригнічує зростання 50% клітин у культурі), LC50 (концентрація речовини, що викликає загибель 50% клітин), EC50 (концентрація, що викликає зниження функції у 50% клітин).

На сьогодні вже є певні досягнення використання культури клітин при дослідженні хронічної токсичності *in vitro*. При цьому тривалість експозиції досліджуваної речовини, як мінімум, триває п'ять діб. Інкубація з препаратом може бути як безперервною, так і у вигляді кількох повторних його введень у культуральне середовище.

Порівнюючи досліди, які проводять на тваринах та експерименти на культурі клітин в умовах *in vitro*, можна виділити ряд переваг. По-перше, тести на культурі клітин можна проводити в мікрокількості. Дозу досліджуваної речовини, одержуваної кожною клітиною, можна вимірювати та контролювати з досить високою точністю, що полегшує встановлення токсичної концентрації ксенобіотика. По-друге, дослідження на культурі клітин дають результати, що дозволяють проводити кількісну оцінку, вивчати залежності «доза – ефект» та «структура – активність». По-третє, перевагою методу культури клітин є висока технологічність процесу досліджень та автоматизація значної їх частини, можливість проведення скринінгу одночасно кількох речовин та безпосередньо на клітинах органів людини. Проблема впровадження альтернативних методів вивчення токсичності та безпеки різних хімічних речовин, у т.ч. лікарських препаратів, у систему доклінічних досліджень залишається актуальною, але водночас ще далеко незавершеною. У найближчому майбутньому належить включити знання про механізми, отримані під час клітинних і молекулярних досліджень, до великого арсеналу даних *in vivo*, щоб докладніше описати токсикологічні механізми, і навіть створити парадигму використання даних *in vitro* для прогнозу токсичності *in vivo*. Цінність методів *in vitro* є загальновизнаним фактом, проте їхнє повсюдне впровадження може бути реалізовано лише внаслідок спільних зусиль токсикологів та представників державних установ.

Як показують результати найсучасніших медико-біологічних досліджень, ефективність токсикологічних досліджень у біологічних системах *in vitro* в більшості випадків не поступається ефективності досліджень із використанням піддослідних тварин (*in vivo*). У контексті вирішення етико-правових проблем, пов'язаних з реалізацією принципу гуманізму та захистом прав тварин, недопущення жорстокого поводження з ними, перед сучасною наукою має бути поставлене серйозне завдання з удосконалення та повсюдного впровадження в практику медико-біологічних досліджень технологій *in vitro* з метою значного зменшення кількості дослідів *in vivo*, зведення їх до можливого мінімуму з перспективою повної відмови від досліджень з використанням піддослідних тварин, а також правова регламентація вищезгаданих процесів у площині міжнародного права та національного законодавства країн світу.

На сьогоднішній день міжнародні акти, що регламентують права тварин у процесі проведення медико-біологічних досліджень, за всієї своєї прогресивності та гуманізму, орієнтацією на захист прав лабораторних тварин, характеризуються низкою недоліків, серед яких:

– не можуть мати обов'язкової юридичної сили, оскільки прийняті не державами, а міжнародними організаціями (наприклад, Положення про використання тварин у біомедичних дослідженнях, Міжнародні рекомендації щодо проведення медико-біологічних досліджень з використанням тварин);

– немає міжнародно-правового акта, який би поширювався на всі країни світу, на рівні ООН і з урахуванням сучасних досягнень медико-біологічної науки;

– немає міжнародної компетентної інстанції, завданням якої був контроль за використанням тварин у медико-біологічних експериментах;

– немає Єдиного реєстру проведення медико-біологічних досліджень за участю тварин, щоб уникнути недоцільних повторень.

Крім того, слід обов'язково, як на міжнародному, так і національному рівні прийняти програми розвитку та підтримки наукових робіт з вивчення впровадження біосистем *in vitro* у практику токсикологічних досліджень. На національному рівні необхідно запровадити кримінальну відповідальність за порушення міжнародних стандартів щодо проведення біомедичних досліджень з використанням тварин, посилити інші види відповідальності, створити спеціальну систему державних органів, які відповідають за політику використання тварин у медико-біологічних цілях та здійснюють контроль у цій сфері. Як у міжнародне, так і національне законодавство слід запровадити пряму заборону застосування технологій *in vivo* у разі можливості застосування технологій *in vitro*.

Список використаних джерел

Програмно-математичні технології в розробці та створенні лікарських засобів. (2023). Чекман, І. С., Беленічев, І. Ф., Рижов, А. А., Риженко, В. П., Горчакова, Н. О., Бурлака, Б. С., Резніченко Н. Ю. Дніпро: Журфонд.

Трахтенберг, І. М., Коваленко, В. М., Кокшарьова, Н. В., Жмінько, П. Г. (2008). *Альтернативні методи і тест-системи. Лікарська токсикологія.* К.: Авіцена.

Adeleye, Y., Andersen, M., Clewell, R., Davies, M., Dent, M., Edwards, S., Fowler, P., Malcomber, S., Nicol, B., Scott, A., Scott, S., Sun, B., Westmoreland, C., White, A., Zhang, Q., Carmichael, P. L. (2015). Implementing Toxicity Testing in the 21st Century (TT21C): Making safety decisions using toxicity pathways, and progress in a prototype risk assessment. *Toxicology*, Jun 5;332:102–11. doi: 10.1016/j.tox.2014.02.007.

Aguilar, T. A. F., & Bañuelos, E. G. (2018). Bioethics in the Use of Experimental Animals. *InTech*. doi: 10.5772/intechopen.74520.

Anadón, A., Martínez, M. A., Castellano, V., Martínez-Larrañaga, M.R. (2014). The role of *in vitro* methods as alternatives to animals in toxicity testing. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*, Jan;10(1):67–79. doi: 10.1517/17425255.2014.854329.

Astashkina, A., Mann, B., Grainger, D. W. (2012). A critical evaluation of in vitro cell culture models for high-throughput drug screening and toxicity. *Pharmacol Ther.*, Apr;134(1):82–106. doi: 10.1016/j.pharmthera.2012.01.001.

Barbosa, D. J., Capela, J. P., de Lourdes Bastos, M., Carvalho F. (2015). In vitro models for neurotoxicology research, *Toxicology Research*, Volume 4, Issue 4, 801–842, <https://doi.org/10.1039/c4tx00043a>.

Belenichev, I., Aliyeva, O., Burlaka, B., Burlaka, K., Kuchkovskyi, O., Savchenko, D., Oksenych, V., Kamyshnyi, O. (2024). Development and Optimization of Nasal Composition of a Neuroprotective Agent for Use in Neonatology after Prenatal Hypoxia. *Pharmaceuticals* (Basel), Jul 26;17(8):990. doi: 10.3390/ph1708099.

Belenichev, I., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Makyeyeva, L., Morozova, O., Oksenych, V., Kamyshnyi, O. (2024). Methodological Approaches to Experimental Evaluation of Neuroprotective Action of Potential Drugs. *Int J Mol Sci*, Sep 28;25(19):10475. <https://doi.org/10.3390/ijms25191047>.

Belenichev, I., Popazova, O., Bukhtiyarova, N., Ryzhenko, V., Pavlov, S., Suprun, E., Oksenych, V., Kamyshnyi, O. (2025). Targeting Mitochondrial Dysfunction in Cerebral Ischemia: Advances in Pharmacological Interventions. *Antioxidants* (Basel), Jan 18;14(1):108. doi: 10.3390/antiox14010108.

Belenichev, I., Popazova, O., Bukhtiyarova, N., Savchenko, D., Oksenych, V., Kamyshnyi, O. (2024). Modulating Nitric Oxide: Implications for Cytotoxicity and Cytoprotection. *Antioxidants* (Basel), Apr 23;13(5):504. doi: 10.3390/antiox13050504.

Belenichev, I., Ryzhenko, V., Popazova, O., Bukhtiyarova, N., Gorchakova, N., Oksenych, V., Kamyshnyi, O. (2024). Optimization of the Search for Neuroprotectors among Bioflavonoids. *Pharmaceuticals* (Basel), Jul 3;17(7):877. doi: 10.3390/ph17070877.

Belenichev, I.F., Aliyeva, O.G., Popazova, O.O., Bukhtiyarova, N.V. (2023). Involvement of heat shock proteins HSP70 in the mechanisms of endogenous neuroprotection: the prospect of using HSP70 modulators. *Front Cell Neurosci*, Apr 17;17:1131683. doi: 10.3389/fncel.2023.1131683.

Capula, M., Corno, C., El Hassouni, B., Li Petri, G., Arandelović, S., EORTC PAMM Group. (2019). A Brief Guide to Performing Pharmacological Studies In Vitro: Reflections from the EORTC-PAMM Course «Preclinical and Early-phase Clinical Pharmacology». *Anticancer Res.*, Jul;39(7):3413-3418. doi: 10.21873/anticancer.13485.

Cesana, B. M. (2018). Are the Ethical Committees for pharmacological research bureaucratic bodies? *J Public Health Res.*, Jan 4;6(3):1340. doi: 10.4081/jphr.2017.1340.

Fröhlich, E. (2013). Cellular targets and mechanisms in the cytotoxic action of non-biodegradable engineered nanoparticles. *Curr Drug Metab.*, Nov;14(9):976-88. doi: 10.2174/138920021131409000.

Gadaleta, D.; Spînu, N.; Roncaglioni, A.; Cronin, M.T.D.; Benfenati, E. (2022). Prediction of the Neurotoxic Potential of Chemicals Based on Modelling of Molecular Initiating Events Upstream of the Adverse Outcome Pathways of

(Developmental) Neurotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 3053. <https://doi.org/10.3390/ijms23063053>.

Gao, X.; Wang, H.; Chen, K.; Guo, Y.; Zhou, J.; Xie, W. (2024). Toxicological and Pharmacological Activities, and Potential Medical Applications, of Marine Algal Toxins. *Int. J. Mol. Sci.*, 25, 9194. <https://doi.org/10.3390/ijms25179194>.

Guth, K. et al. (2015). Suitability of skin integrity tests for dermal absorption studies in vitro. *Toxicol In Vitro*, Vol. 29, №1, 113-23.

Holme, J. A., Dybing, E. (2002). The use of n vitro methods for hazard characterisation of chemicals. *Toxicology Letter*, Vol 127, №-13, 136–141.

Kirkland, D. J., Henderson, L., Marzin, D., Müller, L., Parry, J. M., Speit, G., Tweats, D.J., Williams, G.M. (2005). Testing strategies in mutagenicity and genetic toxicology: an appraisal of the guidelines of the European Scientific Committee for Cosmetics and Non-Food Products for the evaluation of hair dyes. *Mutat Res.*, Dec 30;588(2):88-105. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.09.006.

Krewski, D., Andersen, M. E., Tyshenko, M. G., Krishnan, K., Hartung, T., Boekelheide, K., Wambaugh, J. F., Jones, D., Whelan, M., Thomas, R., Yauk, C., Barton-Maclaren, T., Cote, I. (2020). Toxicity testing in the 21st century: progress in the past decade and future perspectives. *Arch Toxicol.*, Jan;94(1):1-58. doi: 10.1007/s00204-019-02613-4.

National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine; Division on Earth and Life Studies; Institute for Laboratory Animal Research; Roundtable on Science and Welfare in Laboratory Animal Use. Advancing Disease Modeling in Animal-Based Research in Support of Precision Medicine: Proceedings of a Workshop. Washington (DC): National Academies Press (US); 2018 May 30. 5, In Vitro Alternatives to Animal Models. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507212>.

Nunes, C., Proença, S., Ambrosini, G., Pamies, D., Thomas, A., Kramer, N. I., Zurich, M. G. (2023). Integrating distribution kinetics and toxicodynamics to assess repeat dose neurotoxicity in vitro using human BrainSpheres: a case study on amiodarone. *Front Pharmacol.*, 6;14:1248882. doi: 10.3389/fphar.2023.1248882.

O’Flaherty, R., Bergin, A., Flampouri, E., et al. (2020). Mammalian cell culture for production of recombinant proteins: A review of the critical steps in their biomanufacturing. *Biotechnology Advances*, 2020;43:107552. doi:10.1016/j.biotechadv.2020.107552.

Reddy, N., Lynch, B., Gujral, J., Karnik, K. (2023). Alternatives to animal testing in toxicity testing: Current status and future perspectives in food safety assessments. *Food Chem Toxicol.*, Sep;179:113944. doi: 10.1016/j.fct.2023.113944.

Schuppli, C. A., Fraser, D. (2005). The interpretation and application of the three Rs by animal ethics committee members. *ATLA.*, Vol. 33. № 5, 487–500.

Speit, G. (2009). How to assess the mutagenic potential of cosmetic products without animal tests? *Mutat Res.*, Aug;678(2):108-12. doi: 10.1016/j.mrgentox.2009.04.006.

Stresser, D. M., Kopec, A. K., Hewitt, P. et al. (2024). Towards in vitro models for reducing or replacing the use of animals in drug testing. *Nat. Biomed. Eng* 8, 930–935. <https://doi.org/10.1038/s41551-023-01154-7>.

Thiotriazoline and its Today. (2025). Mazur, I., Belenichev, I., Kucherenko, L., Siusiuka, V., Reznichenko, N., Kyryliuk, A., Ryzhenko, V., Shevchenko, A., Khromylova, O. Dnipro, Jurfond. ISBN 978-966-934-648-3.

U.S. Government Principles for the Utilization and Care of Vertebrate Animals Used in Testing, Research, and Training. <https://olaw.nih.gov/policies-laws/gov-principles.htm>

Verstraelen, S., Jacobs, A., De Wever, B., Vanparys, P. (2013). Improvement of the Bovine Corneal Opacity and Permeability (BCOP) assay as an in vitro alternative to the Draize rabbit eye irritation test. *Toxicol In Vitro*, Jun;27(4):1298-311. doi: 10.1016/j.tiv.2013.02.018.