



А.О. Вернер,
Т.М. Устинова ✉,
Ю.О. Коньшаков ,
Н.Г. Венгерович

Анализ требований к проведению исследований ингаляционной токсичности химических веществ

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Государственный научно-исследовательский испытательный институт
военной медицины» Министерства обороны Российской Федерации,
ул. Лесопарковая, д. 4, Санкт-Петербург, 195043, Российская Федерация

✉ Устинова Татьяна Михайловна; gniiivm_5@mil.ru

РЕЗЮМЕ

Актуальность. Изучение токсичности химических веществ при ингаляционном введении имеет ряд особенностей, вызывающих затруднения при планировании эксперимента. Параметрами выбора при этом являются: вид экспериментальных животных, тип ингаляционной установки и способ ингаляции (динамический или статический).

Цель. Анализ практики применения нормативных требований к проведению доклинических исследований токсичности химических веществ при их ингаляционном введении.

Обсуждение. Проведен сравнительный анализ требований международных и отечественных стандартов (ГОСТ 32542-2013, ГОСТ 32643-2020, ГОСТ 32636-2020, ГОСТ 32383-2013, ГОСТ 32646-2014) по исследованию ингаляционной токсичности химических веществ. Показано, что совершенствование нормативной правовой базы связано с внедрением правил надлежащей лабораторной практики и использованием риск-ориентированного подхода к определению классов опасности исследуемых веществ. Отмечено, что класс опасности вещества определяют у грызунов без переноса дозовой зависимости на человека. Выявлены различия основных правил проведения ингаляционного воздействия в исследованиях на грызунах при изучении острой, подострой, субхронической и хронической токсичности. Описаны современные подходы, позволяющие оценивать ингаляционную токсичность химических веществ и лекарственных средств с помощью тестов *in vitro*, заменяющих исследования на животных.

Выводы. Согласно действующим нормативным документам объектом исследований ингаляционной токсичности являются крысы/мыши, которые имеют анатомические различия с человеком. В качестве альтернативы исследованиям на животных разрабатываются и валидируются методы *in vitro*, которые требуют рассмотрения и утверждения регуляторными органами.

Ключевые слова: ингаляционное введение; острая токсичность; подострая токсичность; субхроническая токсичность; хроническая токсичность; надлежащая лабораторная практика

Для цитирования: Вернер А.О., Устинова Т.М., Коньшаков Ю.О., Венгерович Н.Г. Анализ требований к проведению исследований ингаляционной токсичности химических веществ. *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. Регуляторные исследования и экспертиза лекарственных средств*. 2023. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-zzz>

Финансирование. Работа выполнена без спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.

Anna O. Verner,
Tatiana M. Ustinova ✉ ,
Yury O. Kon'shakov ,
Nikolay G. Vengerovich 

Analysis of Requirements for Inhalation Toxicity Studies of Chemicals

State Scientific Research Testing Institute of Military Medicine
4 Lesoparkovaya St., Saint Petersburg 195043, Russian Federation

✉ Tatiana M. Ustinova; gniiivm_5@mil.ru

ABSTRACT

Scientific relevance. Studies of the inhalation administration of chemicals are associated with challenges in designing experiments. The parameters to be selected include the experimental animal species, the inhalation chamber, and the mode of inhalation (dynamic or static).

Aim. This study aimed to analyse the practical application of regulatory requirements to non-clinical studies of the inhalation toxicity of chemicals.

Discussion. This review compares the international requirements for studying the inhalation toxicity of chemicals and corresponding Russian standards, including GOST 32542-2013, GOST 32643-2020, GOST 32636-2020, GOST 32383-2013, and GOST 2646-2014. The improvement of the legal and regulatory framework correlates with adopting the Good Laboratory Practice and the risk-based approach to categorising test substances into hazard classes. Hazard classes are determined in rodents without dose extrapolation to humans. The authors present the differences between the main guidelines on inhalation exposure in rodent studies of acute, subacute, subchronic, and chronic toxicity. The article describes current approaches to assessing the inhalation toxicity of chemicals, which allow researchers to replace animal studies with *in vitro* tests.

Conclusions. According to the current regulatory standards, inhalation toxicity is studied in rats/mice, which have anatomical differences from humans. As an alternative to animal studies, researchers are developing and validating *in vitro* methods, which yet require regulatory review and approval.

Key words: inhalation administration; acute toxicity; subacute toxicity; subchronic toxicity; chronic toxicity; good laboratory practices

For citation: Verner A.O., Ustinova T.M., Kon'shakov Yu.O., Vengerovich N.G. Analysis of requirements for inhalation toxicity studies of chemicals. *Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products. Regulatory Research and Medicine Evaluation*. 2023. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2023-zzz>

Funding. The study was performed without external funding.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.

Введение

Исследования токсичности химических веществ, поступающих в организм ингаляционным путем, проводятся в различных сферах деятельности человека для установления предельно допустимых концентраций (ПДК) веществ в воздухе при строительстве и эксплуатации производственных, жилых помещений и транспорта, при оценке профессиональных рисков для здоровья работников, а также для исследования токсичности лекарственных средств. Проведение таких исследований сопряжено с рядом трудностей, связанных с особенностями планирования эксперимента и выбором способа введения химического вещества лабораторным животным (интраназально — только через слизистую носа, эндотрахеально — минуя верхние дыхательные пути, ингаляционно — только

через нос или только через голову, либо путем воздействия на всю поверхность тела в камерах), а также с выбором установок для ингаляционного введения, поддерживающих статический или динамический способ ингаляции.

В фармацевтической отрасли ингаляционный путь введения препаратов является относительно новым, особенно для биотехнологических лекарственных препаратов, которые также могут применяться ингаляционно [1, 2]. Сложности в планировании и проведении исследований влекут за собой несоответствия в трактовке терминов и определений, а также в интерпретации результатов. Например, существуют расхождения в наименовании исследований токсичности в зависимости от их продолжительности. В США и странах Европейского союза придерживаются

следующей классификации: до 28 сут включительно – подострая токсичность; 29–90 сут (3 мес.) – субхроническая токсичность; свыше 3 мес. – хроническая токсичность. В России же используется другая классификация: исследования продолжительностью менее 28 сут – субхроническая токсичность; свыше 28 сут – хроническая. Различия в терминологии могут вводить в заблуждение относительно истинной продолжительности исследования при планировании экспериментов, в также при анализе научной литературы [2].

Для обеспечения достоверности результатов доклинических исследований лекарственных средств и для гармонизации отечественных требований с международными, в первую очередь с изложенными в документах Организации экономического сотрудничества и развития (Organisation for Economic Co-operation and Development, OECD) в Российской Федерации как национальный стандарт с 1 марта 2010 г. утверждены правила надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice, GLP)¹. Однако в реестре Росаккредитации на сегодняшний день зарегистрировано только 14 испытательных лабораторий, работающих в соответствии с методическими рекомендациями OECD².

Цель работы – анализ практики применения нормативных требований к проведению доклинических исследований токсичности химических веществ при их ингаляционном введении.

Нормативные правовые акты

Исследования острой, подострой, субхронической и хронической токсичности при ингаляционном введении в лабораториях, аккредитованных по GLP, проводятся в соответствии

с протоколами OECD³ № 403, 412, 413 и 452 соответственно. В Российской Федерации аналогичные требования для проведения этих видов исследований изложены в межгосударственных стандартах, которые действуют в странах Евразийского экономического союза, а также в Таджикистане и Молдове, что определяет возможность дальнейшего экспорта и импорта продукции:

- 1) ГОСТ 32542-2013⁴ используют при проведении испытаний химической продукции для количественной оценки риска в соответствии с согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ (СГС)⁵;
- 2) ГОСТ 32643-2020⁶ и ГОСТ 32636-2020⁷ используют для определения токсичности исследуемого химического вещества при ингаляционном поступлении в организм в результате повторного воздействия продолжительностью 28 и 90 сут соответственно, а также для количественной оценки риска при вдыхании газов, паров и аэрозолей наноматериалов;
- 3) ГОСТ 32383-2013⁸ используют для определения максимальной дозы, не вызывающей явного нежелательного эффекта (no-observed-adverse-effect level, NOAEL), что может быть использовано для установления критерия безопасности исследуемого вещества для человека (рекомендуется проведение комбинированного исследования хронической токсичности и канцерогенности);
- 4) ГОСТ 32646-2014⁹ используют в качестве дополнения к ГОСТ 32542-2013 для проведения частных процедур тестирования газов, паров и аэрозолей.

Пересмотр указанных стандартов и внесение в них изменений были связаны с необходимостью проведения испытаний аэрозольных

¹ ГОСТ 33044-2014. Принципы надлежащей лабораторной практики. (OECD Guide 1:1998, IDT).

² Реестр испытательных лабораторий (центров), соответствующих принципам надлежащей лабораторной практики. <https://fsa.gov.ru/infrastructure/nadlezhashchaya-laboratornaya-praktika-v-rossii/reestr-ispitatelnykh-laboratoriy-tsentr-vo-sootvetstviyuyushchikh-printsipam-nadlezhashchey-laboratorno/>

³ OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 4 Health Effects. <https://doi.org/10.1787/20745788>

⁴ ГОСТ 32542-2013. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении. Соответствует международному документу OECD Test No. 403:2008 Acute inhalation toxicity. <https://doi.org/10.1787/9789264070608-en>

⁵ <https://unece.org/ru/ghs-rev5-2013>

⁶ ГОСТ 32643-2020. Токсичность подострая ингаляционная: 28-дневное исследование. Модифицирован по отношению к международному документу OECD Test No. 412:2018 Subacute inhalation toxicity: 28-day study. <https://doi.org/10.1787/9789264070783-en>

⁷ ГОСТ 32636-2020. Субхроническая ингаляционная токсичность: 90 дневное исследование. Модифицирован по отношению к международному документу OECD Test No. 413:2018 Subchronic inhalation toxicity: 90-day study. <https://doi.org/10.1787/9789264070806-en>

⁸ ГОСТ 32383-2013. Изучение хронической токсичности при ингаляционном поступлении. Соответствует международному документу OECD Test No. 452:2008 Chronic toxicity studies. <https://doi.org/10.1787/9789264071209-en>

⁹ ГОСТ 32646-2014. Острая ингаляционная токсичность – метод определения класса острой токсичности (метод АТС). Соответствует международному документу OECD Test No. 436:2008 Acute inhalation toxicity – Acute toxic class method. <https://doi.org/10.1787/9789264076037-en>

частиц, включая наноматериалы. Исследования токсичности наноматериалов в Российской Федерации регламентированы ГОСТ 32643-2020 и ГОСТ 32636-2020, а также ГОСТ Р ИСО 10808-2015¹⁰.

Практика применения требований нормативных документов при проведении исследований

Результаты анализа научной литературы за последние 5 лет показали, что на территории Российской Федерации проводится малое количество исследований ингаляционной токсичности согласно принятым ГОСТ [3–5]. Большинство отечественных авторов планируют и проводят эксперименты, не используя принятые в Российской Федерации рекомендации [6–8]. Это может быть связано со сложностями при введении паров, газов и аэрозолей, при выборе способа введения и типа ингаляционной камеры, а также при валидации метода. По этой причине в России встречаются исследования с использованием в качестве альтернативного способа эндотрахеального введения химических веществ как наиболее просто осуществимого при отсутствии специальной ингаляционной техники. Однако данный метод введения, используемый для суспензий или относительно крупнодисперсных аэрозолей, не в полной мере отражает естественный процесс поступления веществ в организм через органы дыхания и может использоваться только на предварительной стадии исследований [9]. При этом в странах OECD большинство исследований ингаляционной токсичности, несмотря на сложность таких исследований, выполняется в соответствии с принятыми стандартами [10–13].

Основные принципы проведения исследований ингаляционной токсичности, особенности метода и детальное описание процедуры представлены в ГОСТ 32542-2013. Согласно этому документу исследование рекомендуется проводить на молодых здоровых линейных крысах. Допустимо использовать другие виды животных при обосновании их выбора. Важным этапом при изучении острой токсичности является выбор вида исследования: традиционный протокол, согласно которому группы животных подвергаются воздействию вещества в предельной

концентрации, и протокол Концентрация×Время (протокол C×t). Выбор вида исследования зависит от его целей. Так, согласно традиционному протоколу группы животных подвергают воздействию вещества в предельной концентрации или в серии концентраций поэтапно в заранее установленный, составляющий менее 24 ч промежуток времени, в камерах, предназначенных для воздействия через всю поверхность тела. Протокол C×t применяют для оценки токсичности вещества в одной концентрации (тест на предельно допустимую концентрацию) или в серии концентраций при различной продолжительности времени. Такой подход позволяет воздействовать на животных веществом в различных концентрациях. Испытания данного вида проводят в камере, предназначенной для воздействия через нос (голову)¹¹.

Для обеспечения воздействия исследуемого вещества на все важные области трахеобронхиального дерева необходимо определить размер частиц аэрозолей и паров, которые могут конденсироваться и превращаться в аэрозоль. Рекомендуется использование аэрозоля с масс-медианным аэродинамическим диаметром (mass median aerodynamic diameter, MMAD) частиц в диапазоне от 1 до 4 мкм с геометрическим стандартным отклонением (geometric standard deviation, GSD) в диапазоне от 1,5 до 3,0.

При изучении острой токсичности опираются на получение данных фактической (аналитической) концентрации, которая представляет собой количество исследуемого препарата в зоне дыхания животного в ингаляционной камере. Эту концентрацию определяют, используя адсорбционный и химический методы, метод непосредственной оценки, а также неспецифические методы (гравиметрический, капельный анализ). Указанный в документе гранулометрический состав аэрозолей должен определяться не менее двух раз за 4 ч выдержки при помощи каскадного импактора или другого инструмента (например, аэродинамического спектрометра)¹².

Перед основным исследованием острой токсичности проводят предварительное исследование, результаты которого используют для оценки эффективности изучаемого препарата и выбора уровня концентрации для экспозиции. Далее

¹⁰ ГОСТ Р ИСО 10808-2015. Наноаэрозоли для оценки токсичности при ингаляционном поступлении в организм. Контроль характеристик. Указано, что для предотвращения выброса наноаэрозоля в окружающую среду испытания проводят в специальном закрытом помещении, оборудованном вытяжной вентиляцией согласно OECD Guidance document on inhalation toxicity studies. Series on testing and assessment No. 39:2009. [https://one.oecd.org/document/env/jm/mono\(2009\)28/rev1/en/pdf](https://one.oecd.org/document/env/jm/mono(2009)28/rev1/en/pdf)

¹¹ ГОСТ 32542-2013. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении.

¹² Там же.

проводят поэтапное исследование по протоколу C_xt.

В отличие от отечественных стандартов тесты OECD № 412, 413 и 452 содержат более детальные указания по проведению исследования, включающие измерение массы тела лабораторных животных, учет потребления ими пищи и воды, оценку функции легких, изучение особенностей возникающей патологии, проведение бронхоальвеолярного лаважа (БАЛ), офтальмологического исследования, макроскопии органов и тканей, гистологического исследования.

Исследования подострой, субхронической и хронической токсичности не предполагают использования различных видов протоколов, из-за чего возникает проблема выбора модели экспозиции и типа ингаляционных камер. По умолчанию в этих исследованиях должна использоваться интраназальная модель. Такой метод предпочтителен для изучения жидких и твердых аэрозолей и паров, которые могут конденсироваться в форме аэрозолей. При этом допускается воздействие через всю поверхность тела лабораторного животного с последующим обоснованием использования этого метода в отчете исследования. Выбор ингаляционных камер зависит от эксперимента, например при проведении исследования по изучению подострой токсичности должны использоваться динамические ингаляционные камеры. Использование статических камер, в которых отсутствует воздушный поток, не допускается¹³.

Сравнительный анализ действующих рекомендаций по проведению исследований различных видов ингаляционной токсичности представлен в *таблице 1*. При пересмотре документов было рекомендовано соблюдать новые нормативы для возможности проведения исследования аэрозолей с частицами нанодиапазона и повышения способности к осаждению исследуемого вещества в легких: MMAD частиц должен быть не более 2 мкм, а GSD – от 1 до 3 (*табл. 1*).

Также при пересмотре ГОСТ 32643-2020 и ГОСТ 32636-2020 были учтены принципы гуманного обращения с животным. Рекомендовано при планировании исследования отдавать предпочтение тем вариантам процедуры, которые предполагают использование минимального количества животных.

В публикациях [14–16] отражены изменения, произошедшие при пересмотре тестов OECD № 412 и 413, касающиеся общего плана

проведения исследования и агрегатного состояния исследуемого вещества (газ, пар, жидкий аэрозоль или твердый аэрозоль). Отмечены особенности организации исследования, в том числе введение новых стандартных операционных процедур, проведение бронхоальвеолярного анализа жидкости, измерение нагрузки на легкие, измерение MMAD, а также измерение размера частиц в реальном времени, контроль концентрации наноразмерного материала в камере ингаляционного воздействия. Авторы отметили, что введение новых правил для оценки тяжести воспаления легких и легочной нагрузки противоречит политике OECD, и предлагают пересмотреть новые требования. По новым правилам изучение состава жидкости, полученной в результате проведения БАЛ, для всех исследуемых химических веществ следует выполнять путем разделения легких для гистопатологии и БАЛ. Для измерения легочной нагрузки должно исследоваться целое легкое, что подразумевает введение в эксперимент дополнительных животных. В результате количество животных в тесте № 412 увеличивается с 40 до 120, а в тесте № 413 – с 80 до 160. Использование большего количества животных требует обновления или добавления еще одной ингаляционной камеры, портов для экспонирования, увеличивает стоимость исследования и противоречит принципам гуманного обращения с животными. По результатам анализа авторами была представлена схема проведения исследования легких, учитывающая анатомические особенности лабораторных крыс и позволяющая снижать количество животных при изучении токсичности. Для проведения гистоморфологических исследований и оценки результатов БАЛ предложено извлекать правое легкое, а доля левого легкого может использоваться для измерения легочной нагрузки. Данная схема была проверена в исследованиях с растворимыми наночастицами серебра и нерастворимыми наночастицами золота. Было показано, что наночастицы равномерно распределялись в долях легких крыс [14–16].

Различия способов интерпретации результатов исследования ингаляционной токсичности химического вещества для грызунов согласно документам OECD представлены в *таблице 2*. Следует отметить, что большое значение в протоколах уделено анализу пригодности частиц для вдыхания, полученной аналитической концентрации и анализу вероятного механизма действия исследуемого вещества.

¹³ ГОСТ 32643-2020. Токсичность подострая ингаляционная: 28-дневное исследование.

ГОСТ 32636-2020. Субхроническая ингаляционная токсичность: 90 дневное исследование.

ГОСТ 32383-2013. Изучение хронической токсичности при ингаляционном поступлении.

Таблица 1. Сравнительный анализ рекомендаций по проведению исследований ингаляционной токсичности

Table 1. Comparison of recommendations on inhalation toxicity studies

Основные характеристики <i>Main characteristics</i>	Вид исследования: <i>Study type:</i>		
	острая токсичность ¹⁴ <i>acute inhalation toxicity¹⁴</i>	подострая токсичность ¹⁵ <i>subacute inhalation toxicity¹⁵</i>	субхроническая токсичность ¹⁶ <i>subchronic inhalation toxicity¹⁶</i>
Вид животных <i>Animal species</i>	Предпочтительно крысы <i>Preferably, rats</i>		
Количество животных в группе <i>Number of animals per group</i>	Не регламентировано <i>Not standardised</i>	Каждая группа не менее чем 5 ♂ и 5 ♀ <i>At least 5 ♂ and 5 ♀ per group</i>	
Сроки проведения эксперимента <i>Timing of the experiment</i>		28 сут <i>28 days</i>	90 сут <i>90 days</i>
Модель экспозиции <i>Exposure model</i>	Традиционный протокол – воздействие через всю поверхность тела; протокол C×t – воздействие только через нос <i>Traditional protocol: whole-body exposure; C×t protocol: nose-only exposure</i>	Интраназально или в камерах. Для жидких и твердых аэрозолей и паров, способных конденсироваться с образованием аэрозолей, – только интраназальное воздействие <i>Intranasal administration or inhalation chambers. Liquid and solid aerosols and vapours capable of forming aerosols are studied using intranasal administration only.</i>	
Ингаляционные камеры <i>Inhalation chambers</i>	Динамические или статические <i>Dynamic or static chambers</i>	Только динамические <i>Dynamic chambers only</i>	
Предельные концентрации <i>Limit concentrations</i>	Газы – 20000‰; пары – 20 мг/л; аэрозоли – 5 мг/л <i>Gases: 20000‰; vapours: 20 mg/L; aerosols: 5 mg/L</i>		
Гранулометрический состав исследуемого препарата <i>Particle size distribution of the test medicinal product</i>	MMAD от 1 до 4 мкм; GSD от 1,5 до 3,0 <i>MMAD: 1–4 μm; GSD: 1.5–3.0</i>	MMAD не более 2 мкм; GSD – от 1,0 до 3,0 <i>MMAD: not more than 2 μm; GSD: 1.0–3.0</i>	

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. C – концентрация исследуемого вещества; t – время воздействия; MMAD – масс-медианный аэродинамический диаметр частиц; GSD – геометрическое стандартное отклонение.

Note. C, concentration of the test substance; t, time of exposure; MMAD, mass median aerodynamic diameter; GSD, geometric standard deviation.

Проведение теста OECD № 452 позволяет получить данные о профиле токсичности исследуемого вещества у животных, которые можно использовать в качестве предварительной оценки его безопасности для человека. Кроме того, на основании полученных данных могут быть инициированы дополнительные исследования репродуктивной токсичности, иммунотоксичности, нейротоксичности или канцерогенности. Следует учитывать, что при прогнозировании результатов воздействия исследуемого вещества на человека необходимо учитывать межвидовую изменчивость и возможное отсутствие релевантности. Протокол исследования № 452 достаточно длителен и трудоемок для выполнения, но содержит допущение о сокращении

срока исследования до шести или девяти месяцев, что регламентируется целями и задачами исследования. В случае сокращения срока исследования необходимо предоставить обоснование необходимости такого сокращения.

Европейское партнерство по альтернативным подходам к тестированию на животных (European Partnership for Alternative Approaches to Animal Testing, EPAA) совместно с Межведомственным центром по оценке альтернативных токсикологических методов (NTP (National Toxicology Program) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods, NICEATM) проводит семинары, посвященные исследованиям ингаляционной токсичности наноматериалов

¹⁴ ГОСТ 32542-2013. Основные требования к проведению испытаний по оценке острой токсичности при ингаляционном поступлении. (OECD Test No. 403:2008 Acute inhalation toxicity).

¹⁵ ГОСТ 32643-2020. Токсичность подострая ингаляционная: 28-дневное исследование. (OECD Test No. 412:2018 Subacute inhalation toxicity: 28-day study).

¹⁶ ГОСТ 32636-2020. Субхроническая ингаляционная токсичность: 90 дневное исследование. (OECD Test No. 413:2018 Subchronic inhalation toxicity: 90-day study).

Таблица 2. Основные критерии для интерпретации результатов исследования ингаляционной токсичности согласно рекомендациям Организации экономического сотрудничества и развития

Table 2. Main criteria for the interpretation of inhalation toxicity study results according to guidelines issued by the Organisation for Economic Co-operation and Development

Протокол исследования № 403 ¹⁷ <i>Study protocol No. 403¹⁷</i>	Протоколы исследования № 412 и 413 ¹⁸ <i>Study protocols No. 412 and No. 413¹⁸</i>	Протокол исследования № 452 ¹⁹ <i>Study protocol No. 452¹⁹</i>
<p>Вдыхаемые частицы должны быть пригодны для ингаляционного применения, особенно если не соблюдены требования к размеру частиц. Должны быть указаны:</p> <ul style="list-style-type: none"> • последовательность использованных методов определения номинальной и фактической концентрации вещества; • зависимость фактической концентрации от номинальной; • вероятная причина гибели животных и возможный механизм действия исследуемого вещества (определяющий общее или локальное влияние на организм) <p><i>The particles should be fit for inhalation administration, especially if the particle-size criteria could not be met.</i></p> <p><i>The following should be specified:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Sequence of methods used to determine the nominal and analytical concentrations;</i> • <i>Relationship of the analytical and nominal concentrations;</i> • <i>Probable cause of death and predominant mode of action (systemic versus local)</i> 	<p>Должны быть оценены:</p> <ul style="list-style-type: none"> • пригодность аэрозольных частиц для вдыхания с учетом их размера, особенно если норматив MMAD не может быть выполнен; • сопоставимость методов, используемых для определения аналитических и номинальных концентраций исследуемого вещества; • зависимость аналитических и номинальных концентраций; • вероятная причина гибели животных и возможный механизм действия вещества (системное или локальное). <p>Следует определить:</p> <ul style="list-style-type: none"> • органы-мишени; • значения стандартной концентрации или NOAEC и LOAEC; • возможные осложнения, которые могут повлиять на результаты исследования; • методологию определения легочной нагрузки (по необходимости) <p><i>The following should be addressed:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Respirability of aerosol particles in terms of their size, especially if the MMAD standard could not be met;</i> • <i>Consistency of methods used to determine analytical and nominal concentrations of the test substance;</i> • <i>Relationship of the analytical and nominal concentrations;</i> • <i>Probable cause of death and predominant mode of action (systemic versus local).</i> <p>Следующее должно быть определено:</p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Target organs;</i> • <i>BMC or NOAEC and LOAEC;</i> • <i>Potential complications, which may affect the study results;</i> • <i>Methodology of post-observation lung burden determinations (if necessary)</i> 	<p>Должны быть указаны:</p> <ul style="list-style-type: none"> • зависимость «концентрация — ответ»; • влияние механизма действия; • рассмотрение возможности моделирования эксперимента; • накопление и использование базы данных ретроспективного контроля; • значимость полученных данных для человека <p><i>The following should be specified:</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • <i>Concentration-response relationship;</i> • <i>Influence of the mode of action;</i> • <i>Discussion of any modelling approaches;</i> • <i>Historical control data accumulation and use;</i> • <i>Relevance of the data obtained for humans</i>

Таблица составлена авторами / The table is prepared by the authors

Примечание. MMAD — масс-медианный аэродинамический диаметр частиц; NOAEC — максимальная доза, не вызывающая явного нежелательного эффекта; LOAEC — минимальная доза, не вызывающая явного нежелательного эффекта.

Note. MMAD, mass median aerodynamic diameter; BMC, benchmark concentration; NOAEC, no-observed-adverse-effect concentration; LOAEC, lowest-observed-adverse-effect concentration.

и острой системной токсичности, рассматривает текущие методы тестирования острой токсичности, а также подходы, которые помогут сократить и (или) заменить исследования острой ингаляционной токсичности у млекопитающих²⁰ [17].

Исследования острой ингаляционной токсичности проводятся только на крысах или мышах в соответствии с рекомендациями OECD, тесты № 403 и 433, результаты которых могут оказаться необъективными из-за различия строения и функционирования дыхательных путей у различных видов животных, что затрудняет выводы о потенциальной опасности вдыхаемых

соединений для человека. На сегодняшний день не существует альтернативной модели *in vitro*, которая могла бы быть принятой регуляторными органами для замены исследования ингаляционной токсичности на животных. В руководстве ЕРАА указано, что NOAEL, полученная для исследуемого вещества в других исследованиях, должна быть скорректирована для проведения исследований ингаляционной токсичности до эквивалентной концентрации с учетом данных об анатомических и видовых различиях, например минутного объема дыхания, частоты дыхания и др. [18].

¹⁷ OECD Test No. 403: Acute inhalation toxicity. <https://doi.org/10.1787/9789264070608-en>

¹⁸ OECD Test No. 412: Subacute inhalation toxicity: 28-day study. <https://doi.org/10.1787/9789264070783-en>

OECD Test No. 413: Subchronic inhalation toxicity: 90-day study. <https://doi.org/10.1787/9789264070806-en>

¹⁹ OECD Test No. 452: Chronic toxicity studies. <https://doi.org/10.1787/9789264071209-en>

²⁰ https://www.thepsci.eu/acute_inhalation_toxicity

Для изучения местного токсического действия при ингаляционном введении важны следующие параметры: характер оседания исследуемого вещества на поверхности органов дыхания и пути его выведения из организма. С одной стороны, осаждение вдыхаемых веществ зависит от динамики воздушного потока, которая различна у животных и человека из-за анатомических различий как верхних, так и нижних дыхательных путей. С другой стороны, на клиренс вещества влияют объем тканей, типы клеток, состав и распределение слизи, биохимические механизмы активации дыхательных путей и ферментозависимые процессы.

Легкие крысы имеют моноподиальный характер ветвления дыхательных путей, тогда как у человека имеют симметричное разветвление. Таким образом, у человека в области бифуркации трахеи происходит скопление частиц исследуемого вещества, что невозможно воспроизвести на моделях грызунов. Кроме того, диаметр дыхательных путей у крысы меньше, чем у человека. В результате вдыхание нерастворимого твердого аэрозоля может приводить к закупорке дыхательных путей крыс и, как следствие, к гибели самих животных при исследовании препарата в высоких дозах, даже если соединение не токсично для человека.

Опубликованы результаты использования двух альтернативных методов *in vitro*, подходящих для определения острой ингаляционной токсичности. Первая тест-система представляет собой 3D-модель мукоцилиарной ткани *in vitro* – EpiAirway™, состоящую из нормальных человеческих эпителиальных клеток трахеи/бронхов, культивируемых на границе раздела воздух-жидкость (air-liquid interface, ALI). Модель, воспроизводящая характерную для человека структуру ткани и клеточную морфологию и имеющая высокую однородность, состоит из базальных эпителиальных клеток, структурированных при помощи кератина 5⁺, бокаловидных клеток, продуцирующих слизь, функциональных плотных соединений и пульсирующих ресничек²¹ [19]. Подтверждение чувствительности тест-системы было показано при ее использовании для прогнозирования токсичности 59 химических веществ. Предварительно класс токсичности этих веществ был определен в исследованиях на животных. Использование модели EpiAirway™ позволило идентифицировать химические вещества, относящиеся к I–II классам токсичности по СГС с чувствительностью 100% и специфичностью 43,1% [20]. Согласно данным

поисковой базы PubMed за последние 5 лет, авторы исследований широко применяли модель EpiAirway™ для скрининга лекарственных средств, проявляющих активность против вируса SARS-CoV-2, однако полученные результаты требовали подтверждения в дополнительных исследованиях [21–23]. Так, например, была показана эффективность митоксантрона для ингибирования инфекции SARS-CoV-2 с дозозависимым снижением вирусной нагрузки как через 24 ч, так и через 96 ч после инфицирования [24].

Другая тест-система *in vitro* представляет собой органотипическую модель ткани первичных трахеобронхиальных эпителиальных клеток человека (normal human bronchial epithelial cells, NHBE), имеющих *in vivo* подобную структуру и функции. Данная тест-система формируется *in situ* путем дифференцировки клеток NHBE на границе ALI, созданной на полупроницаемой мембранной подложке (например, Transwell®, Millipore®, Millicell®). Апикальная поверхность культуры ALI подвергается воздействию окружающего воздуха, который насыщает кислородом эпителиальные клетки и способствует клеточной дифференцировке. В этих двухфазных условиях культивирования клетки NHBE пролиферируют и дифференцируются в поляризованную псевдомногослойную тканеподобную структуру, напоминающую эпителий дыхательных путей, с реснитчатыми клетками, перемежающимися бокаловидными клетками, обращенными к апикальной стороне, и базальными клетками, распространяющимися вдоль базолатеральной мембраны. Наличие обращенной к воздуху поверхности позволяет проводить исследования *in vitro*, имитирующие воздействие на органы человека. Однако этот метод требует дальнейшей стандартизации и валидации [25].

В работе [26] использование тест-системы *in vitro* было предложено при исследовании фиброза легкого, вызванного воздействием многослойными углеродными нанотрубками. Использование этой модели имело ряд преимуществ: имитировало легкое человека, позволяло упростить расчет дозы, а также проводить параллельное тестирование сокультур для оценки сопоставимости результатов. Метод ALI рассматривается регуляторными органами для использования в практике доклинических исследований, и данная тест-система, возможно, будет применяться наряду с обязательным 90-дневным исследованием ингаляционной токсичности. В результате можно будет осуществлять оценку фибриногенного потенциала

²¹ <http://www.mattek.com/mattekproduct/epi-airway/>

исследуемых наночастиц с использованием двух тест-систем *in vitro* и *in vivo* [26].

Сравнение трех тест-систем (ALI, клеточная линия альвеолярного эпителия человека (A549) и мышинные макрофаги) проводили на образцах газообразных выбросов при сжигании древесины. Было показано, что воздействие аэрозолей *in vitro* и *in vivo* вызвало противоположный порядок повреждений ДНК. Опыты *in vitro* являлись более чувствительными тест-системами. При их использовании было выявлено, что газообразная фракция выбрасываемых аэрозолей вызвала неблагоприятные токсические эффекты. Однако авторами поддерживается проведение параллельных экспериментов *in vitro* и *in vivo* для оценки сопоставимости результатов исследования аэрозолей, при этом предпочтение отдается альтернативным клеточным методам [27].

Таким образом, в настоящее время для исследования ингаляционной токсичности успешно применяют методы *in vitro*, однако используемые тест-системы еще не приняты регуляторными органами для полной замены исследований на животных.

Заключение

Проведенный анализ основных нормативных правовых документов по исследованию острой, подострой и хронической ингаляционной токсичности показал, что данные документы основаны на риск-ориентированном подходе, подразумевающим количественную оценку риска, связанного с воздействием на организм химических веществ при их вдыхании. При этом в отечественных стандартах не уделяется внимание

вопросу расчета экспозиционных и поглощенных доз для газов, паров и аэрозолей, что необходимо для оценки эффективности лекарственных препаратов при обосновании выбора подходящего для медицинского применения ингалятора.

Основной задачей исследования токсичности химических веществ при ингаляционном введении является определение предельной концентрации химического вещества, токсичной для грызунов, согласно традиционному протоколу, а также протоколу Концентрация×Время ($C \times t$), позволяющему оценить среднюю летальную концентрацию (LC_{50}) и нелетальную пороговую концентрацию (LC_{01}) вещества. Протокол $C \times t$ позволяет проводить количественную оценку риска и определять класс токсичности в соответствии с согласованной на глобальном уровне системой классификации и маркировки химических веществ.

Отмечено, что предпочтительным объектом исследований во всех рассмотренных нормативных правовых документах определены крысы/мыши, которые имеют анатомические различия с человеком. При этом класс токсичности вещества определяют у грызунов без переноса дозовой зависимости на человека. Изучение хронической токсичности по ГОСТ 32383-2013 позволяет оценить значимое влияние исследуемого вещества на человека, однако процедура исследования является трудозатратной и длительной (продолжительность 12 мес.). В качестве альтернативы исследованиям на животных разрабатываются и валидируются методы *in vitro*, которые требуют рассмотрения и утверждения регуляторными органами.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Wolfreys A, Kilgour J, Allen AD, Dudal S, Freke M, Jones D, et al. Review of the technical, toxicological, and PKPD considerations for conducting inhalation toxicity studies on biologic pharmaceuticals—the outcome of a cross-industry working group survey. *Toxicol Pathol.* 2021;49(2):261–85. <https://doi.org/10.1177/0192623321988841>
2. Васильев АН, Ниязов РР, Гавришина ЕВ, Драницына МА, Куличев ДА. Проблемы планирования и проведение доклинических исследований в Российской Федерации. *Ремедиум.* 2017;(9):6–19. Vasiliev AN, Niyazov RR, Gavrishina EV, Dranitsyna MA, Kulichev DA. Problems of planning and conduct of preclinical trials in the Russian Federation. *Remedium.* 2017;(9):6–19 (In Russ.). EDN: ZOLGIP
3. Сафандеев ВВ, Белоедова НС, Порошин МА, Силицкая ТА. Современные подходы к оценке острой ингаляционной токсичности химических веществ в воздушной среде на примере производного гидроксикумарина. *Медицина труда и экология человека.* 2022;(2):205–23.
4. Никилин ВС, Кочкаров РР, Беляев ВА, Михайленко ВВ, Гвоздецкий НА. Исследования острой ингаляционной токсичности озono-воздушной смеси. *Вестник КрасГАУ.* 2019;(8):111–6. Nikulin VS, Kochkarov RR, Belyaev VA, Mikhaylenko VV, Gvozdetsky NA. The research of acute inhalation toxicity of ozone and air mixture. *Bulletin of*

- KrasGAU. 2019;(8):111–6 (In Russ.).
EDN: [VLSXRF](#)
5. Мартусевич АК, Федотова АС, Тужилкин АН, Соловьева АГ, Гольгина ЕС, Мартусевич АА. Состояние окислительного метаболизма крыс в оценке субхронической токсичности ингаляций оксида азота. *Вестник Нижегородской государственной сельскохозяйственной академии*. 2020;(2):52–7. Martusevich AK, Fedotova AS, Tuzhilkin AN, Solovieva AG, Golygina ES, Martusevich AA. The state of oxidative metabolism of rats' blood for assessment of subchronic toxicity of nitric oxide inhalation. *Vestnik of Nizhny Novgorod State Agricultural Academy*. 2020;(2):52–7 (In Russ.).
EDN: [GWMBMO](#)
 6. Мартусевич АК, Соловьева АГ, Мартусевич АА. Особенности адаптации эритроцитов крыс к длительному воздействию низких доз оксида азота. *Вестник Ульяновской государственной сельскохозяйственной академии*. 2017;(1):114–9. Martusevich AK, Solovieva AG, Martusevich AA. Peculiarities of adaptation of rat erythrocytes to long-time impact of low dose of nitric oxide. *Vestnik of Ulyanovsk State Agricultural Academy*. 2017;(1):114–9 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18286/1816-4501-2017-1-114-119>
 7. Елина ТС, Квач ЛА, Васильева ЕН. Изучение острой токсичности субстанции бетагистина дигидрохлорид при ингаляционном пути поступления в организм белых мышей. В кн.: *Актуальные проблемы биомедицины – 2020*. СПб; 2020. С. 238–40. Elina TS, Kvach LA, Vasilieva EN. Study of the acute toxicity of the betahistine dihydrochloride substance through inhalation in white mice. In: *Current Problems of Biomedicine – 2020*. St.-Petersburg; 2020. P. 238–40 (In Russ.).
EDN: [HLOEQM](#)
 8. Соловьева АГ, Перетягин СП. Влияние субхронического воздействия ингаляций оксида азота на метаболические процессы в крови экспериментальных животных. *Биомедицинская химия*. 2016;62(2):212–4. Solovieva AG, Peretyagin SP. The effect of subchronic inhalations of nitric oxide on metabolic processes in blood of experimental animals. *Journal of Biomedical Chemistry*. 2016;62(2):212–4 (In Russ.).
<https://doi.org/10.18097/PBMC20166202212>
 9. Воробьев ВВ, Сигаев ВИ, Толчинский АД, Успенская СН, Иванова ЮВ, Звягина ЕВ и др. Оценка токсичности многостенных углеродных нанотрубок для крыс при ингаляционном поступлении. По результатам острого и хронического экспериментов. *Медицина экстремальных ситуаций*. 2017;59(1):14–32. Vorobiev VV, Sigaev VI, Tolchinsky AD, Uspenskaya SN, Ivanova YuV, Zvyagina SP, et al. Multi-wall carbon nanotubes inhalation toxicity in rats assessed in acute and chronic experiments. *Extreme Medicine*. 2017;59(1):14–32 (In Russ.).
EDN: [YHCZBZ](#)
 10. Park CM, Jeon S, Kim YH, Kim J, Choi SJ, Shim I, et al. Sodium dichloroisocyanurate toxicity in rats during a 90-day inhalation toxicity study. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2022;456:116279.
<https://doi.org/10.1016/j.taap.2022.116279>
 11. Murashevych B, Girenko D, Maslak H, Stepanskiy D, Abraimova O, Netronina O, Zhminko P, et al. Acute inhalation toxicity of aerosolized electrochemically generated solution of sodium hypochlorite. *Inhal Toxicol*. 2022;34(1–2):1–13.
<https://doi.org/10.1080/08958378.2021.2013348>
 12. Lee SK, Jo MS, Kim HP, Kim JC, Yu IJ. Quality assurance for nanomaterial inhalation toxicity testing. *Inhal Toxicol*. 2021;33(5):161–7.
<https://doi.org/10.1080/08958378.2021.1926602>
 13. Pleus RC. Repeated dose inhalation developmental toxicity study in rats exposed to cellulose insulation with boric acid additive. *Inhal Toxicol*. 2018;30(13–14):542–52.
<https://doi.org/10.1080/08958378.2019.1576806>
 14. Chung YH, Gulumial M, Pleus RC, Yu IJ. Animal welfare considerations when conducting OECD test guideline inhalation and toxicokinetic studies for nanomaterials. *Animals (Basel)*. 2022;12(23):3305.
<https://doi.org/10.3390/ani12233305>
 15. Park JD, Kim JK, Jo MS, Kim YH, Jeon KS, Lee JH, et al. Lobar evenness of deposition/retention in rat lung of inhaled silver nanoparticles: an approach for reducing animal use while maximizing endpoints. *Part Fibre Toxicol*. 2019;16:2.
<https://doi.org/10.1186/s12989-018-0286-9>
 16. Kim HP, Kim JK, Jo MS, Park JD, Ahn K, Gulumain M, et al. Even lobar deposition of poorly soluble gold nanoparticles (AuNPs) is similar to that of soluble silver nanoparticles (AgNPs). *Part Fibre Toxicol*. 2020;17:54.
<https://doi.org/10.1186/s12989-0220-00384-w>
 17. Clippinger J, Allen D, Jarabek AM, Corvavo M, Gaca M, Gehen S, et al. Alternative approaches for acute inhalation toxicity testing to address global regulatory and non-regulatory data requirements: An international workshop report. *Toxicol In Vitro*. 2018;48:53–70.
<https://doi.org/10.1016/j.tiv.2017.12.011>
 18. Jones DR, Baldrick P. Association of inhalation toxicologists' (AIT) review of regulatory aspects for inhalation toxicology studies. *Inhal Toxicol*. 2013;25(2):84–90.
<https://doi.org/10.3109/08958978.2012.757400>
 19. Movia D, Bruni-Favier S, Prina-Mello A. *In vitro* alternatives to Acute Inhalation Toxicity Studies in animal models – a perspective. *Front Bioeng Biotechnol*. 2020;8:549.
<https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00549>
 20. Jackson GR, Maione AG, Klausner M, Hayden PJ. Pre-validation of an acute inhalation toxicity test using the EpiAirway *in vitro* human airway model. *Appl In Vitro Toxicol*. 2018;4(2):149–58.
<https://doi.org/10.1089/aivt.2018.0004>
 21. McAuley AJ, van Vuren PJ, Mohammed MUR, Goldie S, Riddell S, Godde NJ, et al. Use of human lung tissue models for screening of drugs against SARS-CoV-2 infection. *Viruses*. 2022;14(11):2417.
<https://doi.org/10.3390/v14112417>
 22. Wang AQ, Hagen NR, Padiiha EC, Yang M, Shah P, Chen CZ, et al. Preclinical pharmacokinetics and *in*

- in vitro** properties of GS-441524, a potential oral drug candidate for COVID-19 treatment. *Front Pharmacol.* 2022;13:918083.
<https://doi.org/10.3389/fphar.2022.918083>
23. Di Cristo L, Grimaldi B, Catelani T, Vazques E, Pompa PP, Sabella S. Repeated exposure to aerosolized graphene oxide mediates autophagy inhibition and inflammation in a three-dimensional human airway model. *Mater Today Bio.* 2020;6:100050.
<https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100050>
24. Zhang Q, Radvak P, Lee J, Xu Y, Cao-Dao V, Zheng W, et al. Mitoxantrone modulates a heparan sulfate-spike complex to inhibit SARS-CoV-2 infection. *Sci Rep.* 2022;12(1):6294.
<https://doi.org/10.1038/s41598-022-10293-x>
25. Cao X, Coyle JP, Xiong R, Wang Y, Heflich RH, Ren B, et al. Invited review: human air-liquid-interface organotypic airway tissue models derived from primary tracheobronchial epithelial cells – overview and perspective. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 2021;57(2):104–32.
<https://doi.org/10.1007/s11626-020-00517-7>
26. Clippinger AJ, Ahluwalia A, Allen D, Bonner JC, Halappanavar S, Hotchkiss JA, et al. Expert consensus on an **in vitro** approach to assess pulmonary fibrogenic potential of aerosolized nanomaterials. *Arch Toxicol.* 2016;90(7):1769–83.
<https://doi.org/10.1007/s00204-016-1717-8>
27. Ihtantola T, Bucchianico SD, Happo M, Ihalainen M, Uski O, Bauer S, et al. Influence of wood species on toxicity of log-wood stove combustion aerosols: a parallel animal and air-liquid interface cell exposure study on spruce and pine smoke. *Part Fibre Toxicol.* 2020;17(1):27.
<https://doi.org/10.1186/s12989-020-00355-1>

Вклад авторов. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям ICMJE. Наибольший вклад распределен следующим образом: А.О. Вернер – идея исследования, подбор и анализ литературы, написание и оформление текста рукописи; Т.М. Устинова – критический пересмотр текста рукописи, обобщение результатов исследования; Ю.О. Коньшаков – участие в написании, редактировании и переработка текста, ответственность за целостность всех частей рукописи; Н.Г. Венгерович – утверждение окончательного варианта рукописи для публикации.

Authors' contributions. All the authors confirm that they meet ICMJE criteria for authorship. The most significant contributions were as follows. *Anna O. Verner* elaborated the study idea, selected and analysed literature, drafted and formatted the manuscript. *Tatiana M. Ustinova* critically reviewed the manuscript and summarised the study results. *Yury O. Kon'shakov* drafted, edited, and revised the manuscript, and agreed to be accountable for the integrity of all parts of the work. *Nikolay G. Vengerovich* approved the final version of the manuscript for publication.

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Вернер Анна Олеговна

SPIN-код: 7620-7211

verner.anna@spcpcu.ru

Устинова Татьяна Михайловна, канд. биол. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9579-9190>

gniiivm_5@mil.ru

Коньшаков Юрий Олегович, канд. мед. наук

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8596-6469>

gniiivm_5@mil.ru

Венгерович Николай Григорьевич, д-р мед. наук, доцент

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3219-341X>

gniiivm_5@mil.ru

Поступила 11.07.2023

После доработки 25.08.2023

Принята к публикации 06.09.2023

Online first _____

Anna O. Verner

SPIN-код: 7620-7211

verner.anna@spcpcu.ru

Tatiana M. Ustinova, Cand. Sci. (Biol.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-9579-9190>

gniiivm_5@mil.ru

Yury O. Kon'shakov, Cand. Sci. (Med.)

ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8596-6469>

gniiivm_5@mil.ru

Nikolay G. Vengerovich, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-3219-341X>

gniiivm_5@mil.ru

Received 11 July 2023

Revised 25 August 2023

Accepted 6 September 2023

Online first _____