

УДК 541.11

## ПРОБЛЕМА БЕЗОПАСНОСТИ ПРИМЕНЕНИЯ НУТРИЦЕВТИКОВ

© 2019 г. Н. В. Гончаров<sup>1, 2, \*</sup>, М. А. Терпиловский<sup>1</sup>, В. Е. Соболев<sup>1, 2</sup>,  
Е. А. Корф<sup>1</sup>, Д. А. Белинская<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России,  
г. п. Кузьмоловский, Ленинградская область, Россия

\*e-mail: ngoncharov@gmail.com

Поступила в редакцию 18.03.2019 г.

После доработки 09.04.2019 г.

Принята к публикации 09.04.2019 г.

Рассмотрена проблема безопасного применения нутрицевтиков – биологически активных соединений природного происхождения, являющихся компонентами не только лекарственных растений, но и других представителей растительного и животного мира. Большинство из них обладают антиоксидантными или противовоспалительными свойствами, в силу чего нутрицевтики могут обеспечить профилактику многих заболеваний человека и животных при условии регулярного применения. Токсические эффекты нутрицевтиков изучены в гораздо меньшей степени, хотя имеющиеся данные со всей очевидностью свидетельствуют о том, что безопасность многих из них не может быть полностью гарантирована. Поскольку у млекопитающих достаточно много генетических, анатомических и физиологических аналогий, они широко используются в доклинических исследованиях лекарственных средств и других ксенобиотиков, несмотря на разного рода недостатки подобных исследований, обусловленные, в том числе или в первую очередь, видовыми отличиями. Отсутствие токсичности у животных не означает, что побочные реакции будут отсутствовать у человека. В настоящее время идет интенсивная разработка альтернативных моделей в целях использования в экспериментальной биологии и медицине. Кроме того, статистические алгоритмы обработки данных могут стать эффективным инструментом для выявления и объяснения сложных физиологических эффектов нутрицевтиков. Использование различных моделей и алгоритмов обработки данных приведет к созданию более объективной научной основы для оценки риска использования нутрицевтиков человеком.

*Ключевые слова:* нутрицевтики, доклинические исследования, биомаркеры, альтернативные модели, цитотоксичность

DOI: 10.1134/S0042132419050041

### ВВЕДЕНИЕ

Компоненты питания, используемые в качестве нутрицевтиков, можно классифицировать как пищевые волокна, пребиотики, пробиотики, полиненасыщенные жирные кислоты, антиоксиданты и другие компоненты натуральных продуктов. Они могут помочь в профилактике или даже лечении таких заболеваний, как ожирение, рак, остеопороз, артрит, диабет, сердечно-сосудистые заболевания и т.д. (Das et al., 2012; Gupta, 2016). Многие люди пьют травяные чаи в профилактических целях или в качестве альтернативы кофеинсодержащим напиткам. Существует также огромная индустрия пищевых добавок для спортсменов. Предполагаемое преимущество нутрицевтиков перед лекарственными средствами заключается в том, что они, как правило, не имеют побочных эффектов, в то время как их ощутимым недостатком

является относительно низкая эффективность, которая может быть преодолена либо путем увеличения дозировки, либо путем увеличения длительности применения. Однако такие представления могут оказаться обманчивыми из-за плохого понимания механизма действия нутрицевтиков и/или их некомпетентного применения. Слишком часто решение о применении нутрицевтиков зависит от рекламных заявлений, а не от данных научных исследований. Особенно сильно это явление выражено среди тех, кто занимается физкультурой и спортом, несмотря на то что нутрицевтики или другие подобные добавки не влияют на результаты профессиональных спортсменов при достаточном потреблении калорий, а многие контролируемые исследования не смогли подтвердить рекламируемый эргогенный эффект пищевых добавок (Mason, Lavalley, 2012; Desbrow et al., 2014).

В наше время американцы тратят более 28 млрд долларов на нутрицевтики и пищевые добавки (Ronis et al., 2018). В США распространение и применение пищевых добавок регулируется Законом о статусе и маркировке пищевых добавок (DSHEA, Dietary Supplement Health and Education Act) 1994 г. (Mueller, 1999). Согласно DSHEA, пищевая добавка – это продукт, содержащий такие ингредиенты как витамины, минералы, аминокислоты, травы или компоненты растений. Термин “нутрицевтик” не определен законодательством США, но в целом понимается как относящийся к очищенному продукту, полученному из съедобного для человека пищевого источника, который может обеспечить пользу для здоровья помимо базовой питательной ценности обычных продуктов питания. В европейском законодательстве также не упоминается термин “нутрицевтики”, и они могут рассматриваться в рамках нормативно-правовой базы для пищевых продуктов для особого питания (Particular nutritional uses, PARNUT) (Council Directive ..., 1989). PARNUT включает в себя продукты питания особого назначения, в том числе медицинского, безопасность и эффективность которых должным образом оценены в исследованиях *in vitro* и *in vivo*. Однако, в отличие от производства фармацевтических препаратов, для которого требуются документально подтвержденные доказательства эффективности и безопасности лекарств, в демонстрации эффективности пищевых добавок или нутрицевтиков нет необходимости. Следовательно, они, как правило, поступают на рынок без поддержки клинических испытаний, поэтому количество исследований побочных эффектов недостаточно. Во многих сообщениях о случаях появления побочных симптомов после приема нутрицевтиков причинно-следственные связи не были выявлены. Только постепенное накопление информации о множестве подобных случаев со временем поможет установить, связаны ли неблагоприятные последствия с приемом нутрицевтиков. Однако уже сейчас имеются веские основания утверждать, что риск неблагоприятных последствий довольно значительный (Ronis et al., 2018).

Дело в том, что растения синтезируют множество вторичных метаболитов, роль которых состоит в дополнительной защите от самых разных травоядных животных и паразитов, поэтому потребление нутрицевтиков в течение более или менее длительного времени может вызвать непредсказуемые эффекты. Наиболее популярные, а поэтому хорошо изученные, стимуляторы физической или умственной активности являются нутрицевтиками: это кофеин, никотин, этанол и тетрагидроканнабинол. Известно, что они могут быть и токсичными, причем не только для наркоманов или алкоголиков. Однако многочисленные случаи отравления человека и животных были связаны с менее известными

ми (и менее изученными) компонентами растений, такими как пирролизидиновые алкалоиды (ПА), танины и сафрол (Manteiga et al., 1997). Некоторые токсичные примеси также являются компонентами пищевых продуктов, потребляемых в качестве источника нутрицевтиков (Shimshoni et al., 2015; Hassanin et al., 2017). В свою очередь, примеси могут быть компонентами как натуральных, так и искусственных добавок: так, многие резвератрол-содержащие нутрицевтики обогащены очищенным резвератролом, извлеченным из корня японского гороха *Polygonum cuspidatum* (Espín et al., 2007).

Доказательства потенциально полезного воздействия нутрицевтиков на здоровье человека получены главным образом на основании описательных и коррелятивных эпидемиологических данных (Sauer, Plauth, 2017). Проблема противоречий в сообщениях о влиянии нутрицевтиков часто лежит в области неадекватных моделей тестирования или квазинаучного объяснения полученных экспериментальных данных (Goncharov et al., 2016a). Физиологический контекст имеет большое значение для оценки эффектов пищевых добавок, многие из которых, возможно, были получены в экспериментах *in vitro* и часто не могут быть однозначно экстраполированы на эффекты, полученные *in vivo*. Биодоступность, метаболизм и распределение в тканях являются важнейшими факторами, которые необходимо учитывать для понимания биологических эффектов нутрицевтиков. Распространяясь по организму, нутрицевтики или их производные по-разному взаимодействуют с различными клетками и молекулярными мишенями (Sauer, Plauth, 2017). Кишечная микробиота является одной из основных мишеней нутрицевтиков, так что иногда очень сложно определить, какие именно биологически активные соединения ответственны за системный биологический эффект.

Экспериментальные животные играли и продолжают играть основную роль в биомедицинских исследованиях (Franco, 2013). С целью уменьшения количества подобного рода экспериментов была разработана стратегия трех R (reduction, refinement and replacement – сокращение, улучшение и замена) и предложены альтернативы лабораторному использованию животных (Doke, Dhawale, 2015). В то же время, крайне важно иметь максимум информации о безопасности и эффективности на основе именно доклинических исследований *in vivo*, также важно понять механизм действия нутрицевтиков (Santini et al., 2018).

## О ТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВАХ НУТРИЦЕВТИКОВ

Наиболее важными нутрицевтиками растительного происхождения являются изотиоцианаты, глюкозинолаты, сероорганические соединения (СОС), терпеноиды (каротиноиды, монотерпены и фитостерины), а также различные группы полифенольных соединений (антоцианы, флавоны, флаван-3-олы, изофлавоны, стильбеноид, эллаговая кислота (ЭК), эллагитанины (ЭТ) и др.) (Ismail et al., 2016). Некоторые из них обладают защитным эффектом против таких токсикантов, как четыреххлористый углерод, что было показано на примере экстракта зеленого чая (ЭЗЧ) в модели с использованием хомяков (Elgawish et al., 2015). В качестве другого примера можно привести защитное действие лецитина и/или галловой кислоты для предотвращения нейротоксичности оксида алюминия (Hassanin et al., 2017).

На фоне огромного количества публикаций, свидетельствующих о положительных эффектах нутрицевтиков, их токсические свойства практически незаметны и кажутся незначительными. В связи с этим интересной особенностью имеющих публикации является вопрос финансирования исследований их эффективности и безопасности. Авторы некоторых статей открыто заявляют, что финансирование исследования предоставлено компаниями, предлагающими изучаемый продукт для торговых целей (Vaughan et al., 2014). Добавки с активными ингредиентами, которые обеспечивают физиологический эффект, могут также вызывать побочные эффекты. Например, некоторые метаболиты (-)эпигаллокатехин-3-галлата (ЭГКГ) предположительно не уменьшают, но усиливают окислительный стресс и вызывают повреждение печени, где митохондрии являются возможной мишенью (Mazzanti et al., 2009, 2015; James et al., 2018). Помимо ЭЗЧ и ЭГКГ, ряд других лекарственных растений или их компонентов могут стать причиной гепатотоксических эффектов: это аюрведические и китайские травы, черный кохощ (клопогон), чапараль, дубровник обыкновенный, чистотел большой, гербалайф, гидроксикат, перец острый, мята болотная, шлемник, усниновая кислота и пирролизидиновые алкалоиды (Bunchorntavakul, Reddy, 2013). Изофлавоны сои — генистеин и даидзеин, а также его метаболит эквуол (4',7-изофлавандиол) обладают эстрогенными свойствами, в том числе способны вызывать гипертрофию матки, уменьшать размеры яичка, подавлять выработку андрогенов и т.д. (Tan et al., 2006; Akingbemi et al., 2007; Ronis et al., 2014, 2016). Имеются сообщения о случаях эндометриоза у женщин вследствие употребления изофлавоновых добавок, поэтому существует вполне определенный риск развития эстроген-чувствительного

рака у потребителей этих продуктов (Mahady et al., 2003).

$\alpha$ -Линоленовая кислота (АЛК) является предшественником более длинных омега-3 жирных кислот, эйкозапентаеновой (ЭПК) и докозагексаеновой (ДГК). Токсикологических данных по АЛК немного, и в целом она считается безопасным пищевым ингредиентом. Однако следует отметить, что АЛК, как и многие другие жирные кислоты, может образовывать продукты перекисного окисления липидов (ПОЛ) под воздействием воздуха или ультрафиолетового излучения. Также следует учитывать риск развития рака предстательной железы и дегенерации желтого тела. Эти риски связаны с потреблением АЛК в составе продуктов питания, хотя в целом доказательства связи АЛК с риском развития этих заболеваний противоречивы и неубедительны (Kim et al., 2014). В некоторых экспериментах введение эллаготанинов (ЭТ) крысам подавляло возникновение и развитие химически индуцированного рака толстой кишки и пищевода (Stoner et al., 2006). В других экспериментах не было выявлено никакого влияния на количество или размер аденом в тонкой кишке мышей при введении чистой эллаговой кислоты (ЭК) или ЭТ-содержащей диеты (Päivärinta et al., 2006). Такие противоречивые результаты могут быть получены как из-за различных типов опухолей, так и вследствие использования разных животных и экспериментальных моделей. Более важными и менее афишируемыми являются исследования, в которых было установлено, что ЭТ при введении в рацион крупного рогатого скота могут вызывать некроз печени и обладают нефротоксичностью (Filippich et al., 1991; Oelrichs et al., 1994).

Существует множество растений, содержащих СОС, токсичность которых варьирует у различных видов животных и в разных типах клеток организма (Munday, 2012; Goncharov et al., 2016b). Понятно, что повышенная токсичность СОС для раковых клеток — это позитивное событие для организма. СОС модулируют активность целого ряда ферментов, которые либо активируют (ферменты фазы 1 детоксикации ксенобиотиков: CYP2E1, CYP1A1 и CYP1A2), либо нейтрализуют (ферменты фазы 2 детоксикации ксенобиотиков: NAD(P)H:хиноноксидоредуктаза 1, глутатион S-трансфераза, UDP-глюкуронозилтрансфераза и др.) канцерогены посредством ингибирования активности гистондеацетилазы и образования аддуктов ДНК в тканях-мишенях (Navarro et al., 2011; Zhang et al., 2013). Как ни покажется странным, но постоянная активация антиоксидантных систем через генетические изменения в Nrf2 и Keap1 также способствует канцерогенезу. Некоторые раковые клетки задействуют для своих нужд систему Nrf2/Keap1 посредством мутаций соответствующих генов, обуславливая постоян-

ную активацию антиоксидантных систем пероксиредоксин/сульфидредоксин (Toyokuni, 2014). Позитивные эффекты СОС у млекопитающих часто связаны с их селективным токсическим воздействием на микроорганизмы. Например, установлено токсическое действие чеснока для многих грамположительных, грамотрицательных и кислотоустойчивых бактерий, среди которых *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella*, *Micrococcus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium*, *Mycobacterium* и *Helicobacter pylori* (Bayan et al., 2014).

Красный дрожжевой рис (КДР) — это один из продуктов функционального питания, получаемый в результате брожения красных дрожжей *Monascus purpureus* и содержащий биоактивный компонент монаколин К (химически идентичен ловастатину), который считается ключевым фактором снижения холестерина. В одном из исследований безопасности КДР были отмечены случаи миалгии и увеличения креатинфосфокиназы, повреждение печени и желудочно-кишечные реакции, в некоторых случаях — госпитализация пациентов (Mazzanti et al., 2017). Другой фактор риска при использовании КДР — токсичный метаболит микотоксин цитринин, что является серьезным препятствием для использования КДР в качестве продукта питания в связи с нефротоксичностью этого метаболита (Vanaoig-Pedros et al., 2016; Patel, 2016).

Некоторые виды зеленого чая или травяных настоев могут быть загрязнены ПА, которые попадают в них из различных сорняков, обладающей острой и хронической токсичностью, генотоксичностью, мутагенными и канцерогенными свойствами (Habs et al., 2017). 1,2-ненасыщенные ПА особенно важны с точки зрения токсикологической безопасности, поскольку являются генотоксичными канцерогенами (Chen et al., 2017). Активные метаболиты ПА образуются в организме после метаболической активации СYP3A4 в печени и затем могут вызвать синдром печеночной синусоидальной обструкции и отравление крупного рогатого скота (Wiedenfeld, Edgar, 2011; Jurgens et al., 2012). Другим источником ПА является мед, полученный пчелами из растений, синтезирующих ПА (Merz, Schrenk, 2016).

В некоторых китайских препаратах растительного происхождения содержатся токсичные алкилбензолы (Ning et al., 2018). Кроме того, метилэвгенол и родственные алкилбензолы были найдены в соусах песто и растительных добавках (РД) на основе мускатного ореха. Хотя следует отметить, что их токсичность, определяемая на основании установленного суточного потребления (УСП, не путать с расчетной суточной дозой лекарственных препаратов — Defined Daily Dose, DDD) и расчетных показателей предела воздей-

ствия (ППВ, Margin of Exposure, MoE) незначительна, и соусы песто могут представлять опасность лишь в случае их регулярного и длительного потребления (Al-Malahmeh et al., 2016, 2017). Следующий раздел посвящен этим и другим показателям, необходимым для оценки безопасности и токсичности нутрицевтиков.

### ИССЛЕДОВАНИЯ БЕЗОПАСНОСТИ И ТОКСИЧНОСТИ НУТРИЦЕВТИКОВ В ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ МОДЕЛЯХ НА ЖИВОТНЫХ: ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ, ПРОБЛЕМЫ И АЛЬТЕРНАТИВЫ

Биологическую активность препаратов растительного происхождения обычно проверяют в экспериментах *in vitro* и/или *in vivo*. Однако в исследованиях *in vitro* часто используют гораздо более высокие концентрации исследуемых соединений по сравнению с экспериментами *in vivo*. Другая значительная проблема состоит в том, что многие метаболиты нутрицевтиков, выявляемые в различных концентрациях в разных органах и тканях, тестировать либо невозможно, либо бессмысленно. Наконец, многие результаты, полученные на животных, невозможно экстраполировать на человека из-за принципиальных различий в физиологии (Espín et al., 2007). В идеале для более четкого понимания механизма действия и токсических свойств химических соединений, в том числе нутрицевтиков, необходимо использовать несколько моделей *in vitro* и не менее чем две модели *in vivo*.

Считается, что при лечении острых заболеваний можно не принимать нутрицевтики в качестве пищевых добавок, однако речь не идет о замене фармпрепаратов нутрицевтиками, сейчас вопрос стоит иначе: можно ли использовать нутрицевтики как средства адьювантной терапии или как средства профилактики? И если да, то следует ли проверять их на безопасность и токсичность? И если да, необходимо ли использовать для этого животных? Эксперименты на животных проводят для выявления органов-мишеней, на которые воздействуют активные компоненты препаратов, при условии, что они хорошо охарактеризованы, их примеси (если таковые имеются) также хорошо охарактеризованы, а процесс их производства стандартизирован (Kruger, Mann, 2003). Различные виды животных, в том числе рыбы, амфибии, птицы, мыши, крысы, хомяки, кролики, морские свинки, собаки, кошки и приматы имеют довольно долгую историю использования в экспериментальной токсикологии. Грызуны — наиболее популярный объект исследования, их доля составляет почти 80% от общего числа животных, используемых в ЕС для научных целей, далее следуют холоднокровные (9.6%) и птицы (6.3%) (European commission, 2010; Franco, 2013).

### Принципы оценки токсичности

Токсикологические исследования фармпрепаратов включают: 1) токсикометрию с проверкой на кумуляцию, 2) фармако- и токсикокинетические исследования, 3) исследования репродуктивных функций, 4) исследования генотоксичности, 5) исследования канцерогенности и (6) специальные фармакологические исследования, в том числе исследования *in vitro* и *in silico*, с целью объяснения выявленных токсических эффектов в исследованиях *in vivo* (Kruger, Mann, 2003). Оценка токсичности химических веществ проводится в острых, подострых, субхронических и хронических экспериментах. Для оценки острой токсичности, как правило, используется одна доза препарата, а наблюдения за животными продолжаются 14 дней. В субхронических исследованиях, которые являются наиболее популярными среди токсикологов и в то же время являются наиболее адекватными для оценки токсичности нутрицевтиков, животные получают вещество многократно (чаще всего ежедневно в равных дозах) на протяжении 90 сут. По завершению эксперимента производят эвтаназию животных с отбором образцов для гематологических и биохимических исследований, оценивают массу внутренних органов и отбирают материал для гистопатологического исследования. Для оценки генотоксичности обычно используют микроядерный тест, наличие отрицательного контроля обязательно.

Точки отсчета (points of departure) в токсикологии – это три точки на определяемой в эксперименте кривой доза–эффект, соответствующие наименьшему уровню наблюдаемого неблагоприятного воздействия (LOAEL, lowest-observed-adverse-effect level), уровню ненаблюдаемого неблагоприятного воздействия (NOAEL, no-observed-adverse-effect level) и статистической контрольной дозе (BMD, benchmark dose) (Augustin et al., 2013). Они необходимы для определения токсикологически безопасной референсной дозы (РД, reference dose – RfD) или референсной концентрации (РК, reference concentration – RfC), то есть той дозы или концентрации вещества, которые могут попадать в организм человека через ЖКТ, кожу или легкие ежедневно на протяжении всей жизни без вреда здоровью. В ЕС RfD понимается как расчетный безопасный уровень (DNEL, derived no-effect level); в Российской Федерации это соответствует величине ОБУВ, ориентировочный безопасный уровень воздействия). В Агентстве по охране окружающей среды США (EPA, Environmental Protection Agency) предлагают выражать RfD или RfC следующим образом (ChemSafetyPRO, 2018):

1. Референсная доза является ориентировочной расчетной величиной (ее неопределенность может лежать в диапазоне одного порядка), которая означает такое количество вещества, которое

является безопасным для здоровья человека (в том числе наиболее чувствительных индивидуумов) при ежедневном пероральном или чрезкожном попадании в организм в течение всей жизни; ее обычно выражают в мг/кг\_массы\_тела/сутки или в мг/кг;

2. Референсная концентрация является ориентировочной расчетной величиной (ее неопределенность может лежать в диапазоне одного порядка), которая означает такое количество вещества, которое является безопасным для здоровья человека (в том числе наиболее чувствительных индивидуумов) при непрерывном попадании в организм с вдыхаемым воздухом в течение жизни; ее обычно выражают в мг/л или миллионных долях (ppm, parts per million).

В США многие нутрицевтики были классифицированы как “в целом безопасные” (GRAS, generally recognized as safe), с приемлемым показателем NOAEL (Augustin et al., 2013). В дизайне исследований на животных важным параметром, который необходимо учитывать, является ППВ (MoE) между NOAEL и предполагаемым или установленным уровнем суточного потребления (EDI, estimated daily intake) человеком. Для пищевой добавки допустимый уровень ежедневного потребления (ADI, acceptable daily intake) обычно вычисляется путем применения 100-кратного коэффициента безопасности по отношению к величине NOAEL, полученной в исследованиях на животных. Если величина EDI ниже величины ADI, то воздействие считается безопасным. Эта концепция применима для нутрицевтиков, уровень потребления которых человеком не превышает 1.5 г/день (примерно 25 мг/кг/день), так как этот уровень можно подтвердить с учетом 100-кратного коэффициента безопасности по отношению к NOAEL в модели тестирования на крысах (по массе это составит около 5% рациона крысы) (Kruger, Mann, 2003). Концепция 100-кратного коэффициента безопасности не применима для лекарственных препаратов и основных компонентов пищи, так как в этом случае эффекты, полученные на животных, могут быть обусловлены не токсикологическими, а их фармакологическими или физиологическими свойствами.

В данном контексте следует привести пример неадекватных исследований на животных, в которых была выявлена гепатотоксичность экстракта зеленого чая (ЭЗЧ) и эпигаллокатехин-3-галлата (ЭГКГ). Очень высокая разовая доза ЭГКГ (500–750 мг/кг), вводимая внутрижелудочно натошак мышам C57BL/6J ежедневно в течение 3 дней, вызвала развитие воспалительного процесса в печени, некроз и кровоизлияния. Гепатотоксичность была сопряжена с повышением оксидативного стресса, снижением уровня супероксиддисмутазы и глутатионпероксидазы

(James et al., 2018). Понятно, что любую идею можно довести до абсурда, если слепо руководствоваться расхожими штампами или даже кем-то утвержденными нормативами без учета всех нюансов, связанных, например, с биодоступностью или механизмом действия того или иного вещества. ЭГКГ в чистом виде — это скорее лекарственный препарат, а не нутрицевтик, к нему нельзя применять требования 100-кратного коэффициента безопасности, иначе он, как большинство лекарственных препаратов, становится ядом. Тем более, если вводить его натошак, в то время как позитивный эффект он может оказывать лишь при употреблении после еды или хотя бы во время еды (вместе с едой), причем желательно содержащей жиры. Для сравнения приведем пример наших исследований влияния экстракта зеленого чая (ЭЗЧ), основным компонентом которого является ЭГКГ, на выносливость и утомляемость крыс в модели принудительного плавания. ЭЗЧ вводили животным в количестве, соответствующем дозе ЭГКГ 6 мг/кг (что почти на два порядка меньше дозы, используемой в работе Джеймс с соавт. (James et al., 2018)) в течение 2–3 нед. два раза в день после приема корма. Никакой гепатотоксичности при этом не было обнаружено. Более того, было показано, что ЭЗЧ увеличивает продолжительность плавания по сравнению с контрольными животными, которые употребляли воду (Новожилов и др., 2014). Дальнейшие исследования подтвердили эти результаты, а дополнительно было установлено, что употребление ЭЗЧ увеличивает выносливость за счет сокращения медленных мышечных волокон, адаптация которых связана с усилением экспрессии генов, ответственных за регуляцию баланса ионов кальция в мышцах (Корф и др., 2017). Самые последние данные наших исследований свидетельствуют о влиянии ЭЗЧ на состояние эритроцитов и метаболизм лактата (Гончаров и др., 2018а), то есть речь идет о плейотропном действии ЭЗЧ, векторные составляющие которого отличаются не только по своей направленности, но и по интенсивности влияния на метаболизм тех или иных органов и тканей в разных условиях и состояниях организма. К сожалению, в последнее время существует множество примеров того, как эксперименты с животными используются для оправдания явно предвзятой позиции исследователя, независимо от того, сводится ли эта позиция к восхвалению или уничтожению нутрицевтиков.

*Проблемы и альтернативы исследованиям, проводимым на лабораторных животных*

В 2004 г. был составлен перечень методологических проблем, связанных с научными исследованиями *in vivo* (Pound et al., 2004): 1) различия в

дозировках, сроках и схеме применения препаратов; 2) различия в отборе животных для исследований; 3) выбор препарата сравнения (отсутствие, плацебо, растворитель); 4) малый размер экспериментальных групп и упрощенный статистический анализ; 5) нюансы лабораторных методов, которые способны повлиять на результаты исследований; 6) выбор критериев эффективности и их релевантность при оценке клинического состояния человека; 7) продолжительность наблюдения (катамнеза) за животными до определения исхода заболевания и его релевантность по отношению к человеку. Несколько лет спустя было издано методическое руководство (“Animals in research: reporting *in vivo* experiments”, “Животные в науке: интерпретация экспериментов *in vivo*”, “ARRIVE”) с целью повысить стандарт качества научных данных, полученных в экспериментах на животных (Kilkenny et al., 2010). Они содержат перечень из 20 пунктов, которые необходимо освещать в научных публикациях с использованием животных. Предполагалось, что если следовать этим требованиям, то будут основания для объединения результатов исследований, соответствующих определенным критериям, в рамках систематических обзоров и/или мета-анализов, с тем чтобы делать более надежные выводы по данным экспериментов на животных. Однако многие полагают, что никакая экспериментальная модель на животных не способна спрогнозировать клинический ответ на терапию и исход заболевания у людей. Проблема заключается не в отсутствии побочных эффектов, поскольку многие из них наблюдаются и у животных, а именно в их прогностической значимости для человека. Поэтому систематические обзоры и мета-анализы данных, полученных в экспериментах на животных, не могут служить надежным подспорьем для выводов о воздействии препаратов на человека (Greek, Menache, 2013). Согласно некоторым аналитическим исследованиям, корреляция побочных эффектов, выявленных в эксперименте на животных и наблюдаемых у человека, составляет лишь 43% при использовании грызунов и 63% при использовании представителей других отрядов млекопитающих (Olson et al., 2000). Основу подобных публикаций составляет тезис о том, что животные и вовсе бесполезны в экспериментальной медицине, поскольку, независимо от подхода к проблеме, лабораторные животные и человек отличаются в принципе во всем (Greek, Menache, 2013). Однако в подобного рода публикациях реальный потенциал и перспективы развития науки учитываются, скажем так, не в полной мере.

В настоящее время мы не можем полностью отказаться от экспериментов на животных. Заявления о необходимости отказа — это популистские высказывания людей, которые, как правило, не имеют необходимой компетенции и не несут

при этом никакой ответственности. Безусловно, необходимо совершенствовать методологию работы с животными, заниматься разработкой алгоритмов системного анализа и интегративных подходов для того, чтобы сократить использование лабораторных животных и повысить их научную значимость для человека. Это особенно важно для поиска новых интегративных биомаркеров различных патологических состояний и инвариантных функциональных изменений у человека и животных, независимо от их филогенетической принадлежности и внутривидовой вариабельности (Goncharov et al., 2017b). Биомаркеры нужны не только для диагностики и прогноза, но и для разработки теорий патогенеза (Ghezzi et al., 2018). В связи с необходимостью использования биомаркеров в исследованиях механизма действия веществ и развития заболеваний обозначились две проблемы: первая возникает при рассмотрении многофакторных заболеваний, когда различные причины и их сочетания обуславливают многообразие в состоянии пациентов; вторая связана со сложностью измерения некоторых патогенетических факторов. В качестве примера второй проблемы можно привести теорию оксидативного стресса, согласно которой основным патогенетическим фактором являются активные формы кислорода (АФК), имеющие короткий период полужизни, в связи с чем измеряют обычно продукты взаимодействия биомолекул с АФК, а не сами АФК. Особенности биомаркеров, их смысл и значение в исследовании многофакторных заболеваний обсуждаются в ряде работ (Ghezzi et al., 2018; Goncharov et al., 2017b). Особенно важно исследовать биомаркеры в доклинических и клинических испытаниях нутрицевтиков, большинство из которых участвуют в окислительно-восстановительных реакциях и применяются в относительно малых количествах. Кроме того, в токсикологических исследованиях субхронического действия очень низких концентраций алифатических углеводов с помощью методов метабомики и хеометрики были выявлены новые метаболические маркеры токсического эффекта: соотношение содержания пиррофосфата к щавелевой кислоте в плазме крови крыс оказалось наиболее чувствительным маркером, получившим название «пиррофосфатный индекс». По результатам исследования была выдвинута гипотеза о ведущей роли редокс-баланса в патогенезе нейропатий, связанных с хроническим отравлением углеводами (Уколов и др., 2017).

Комбинаторные биомаркеры считаются более специфическими и чувствительными в медицинской диагностике по сравнению с одиночными биомаркерами, однако выявление комбинаторных биомаркеров сопряжено с непростым вычислительным анализом. Применение аналитической комбинаторики в сочетании с линейной

и ядерной гребневой регрессией позволило выявить несколько комбинаторных биомаркеров повреждения мышц с высокой прогностической точностью, которые могут стать объединяющим фактором для исследований как на животных, так и на людях (Terpilowski et al., 2018). Метаболические исследования с использованием хеометрики и других вычислительных методологий доказывают, что не минорные и экзотические, а очень простые биохимические маркеры и их производные могут выступать в роли чувствительных биомаркеров с высокой прогностической значимостью. Например, альбумин относится к числу немногих биомаркеров, которые позволяют оценить вероятность скорой смерти независимо от генетики, пола и предшествующих заболеваний (Fischer et al., 2014; Hui et al., 2014). Альбумин, как известно, является мажорным белком плазмы крови, который к тому же вносит основной вклад в пул белковых сульфгидрильных групп. Гомоцистеинилирование альбумина по остатку Cys34 повышает вероятность его окислительной деградации (Prakash et al., 2008). В связи с этим, сравнительный анализ свойств альбумина разных видов животных при наличии нутрицевтиков в среде, многие из которых являются антиоксидантами, — одна из важнейших задач предстоящих исследований *in vivo*, *in vitro* и *in silico* (Гончаров и др., 2017; Goncharov et al., 2017a).

Пищевые добавки, произведенные из растительного сырья и содержащие токсические вещества (например, алкенилбензолы), можно оценивать с помощью таких токсикометрических показателей как фактор токсической эквивалентности (ФТЭ) и показатель предела воздействия (ППВ, Margin of Exposure, MoE) (Al-Malahmeh et al., 2017). Концепция ФТЭ в свое время была предложена для хлорпроизводных дибензо-*n*-диоксинов (ХДД), когда в острых экспериментах на крысах подтвердилось предположение о том, что взаимодействие четырех гомологичных ХДД имеет аддитивный характер (Stahl et al., 1992). Для нутрицевтиков или их токсичных составляющих, таких как ПА, оценку риска обычно проводят по результатам (суб)хронического эксперимента на животных, а в качестве дозиметрического показателя была предложена концепция факторов относительной активности (ФОА, relative potency factors, RPF), имеющая большую перспективу для оценки токсикологического риска по сравнению с ФТЭ (Merz, Schrenk, 2016). Этот подход основан на прогнозируемом воздействии на человека метаболитов из различных источников (таких как еда и вода), пороге токсикологической угрозы (ПТУ, определяет максимальную допустимую ежедневную дозу для токсических примесей, от “threshold of toxicological concern”, ТТС) и концепции сравнительной токсичности (Terry et al., 2015). Главная задача — обеспечить безопасность

метаболитов для человека с минимальным количеством исследований *in vivo*, в то же время гарантируя безопасность человека в глобальном нормативном масштабе. Третья составляющая — сравнительная токсичность — введена для сравнения токсических профилей метаболитов между собой и с их предшественниками. Основная задача — установить наличие эмбриотоксического или канцерогенного эффекта на основе исследования механизма действия (МД, mode-of-action, MoA) и разработать ФОА в сравнении с исходными веществами. МД основных эффектов исходных веществ изучают детально, а для оценки относительной активности метаболитов по сравнению с исходными веществами проводят эксперименты *in silico*, *in vitro* и/или *in vivo*. Такая стратегия сравнительной оценки с учетом МД, относительной активности, прогнозируемого воздействия и ПТУ позволяет создать надежную базу данных, минимизировать использование лабораторных животных и при этом всесторонне оценить опасность для человека этих метаболитов (Terry et al., 2015).

Модели с применением животных и двумерных клеточных культур оказали огромное влияние на медицинские исследования, несмотря на присущие им недостатки и различия при сравнении с клиническими данными и результатами исследований *in vivo*. Трехмерные (3D) модели тканей стали дальнейшим этапом в развитии существующих методов, они призваны заполнить существующие пробелы и исправить присущие им недостатки (Konar et al., 2016). Большинство экзогенных веществ, в особенности нутрицевтики, имеют множество клеточных и молекулярных мишеней при низких уровнях специфичности и различных уровнях токсичности. Например, некоторые тиолы и дисульфиды используются как нутрицевтики и адъюванты в комплексной терапии сердечно-сосудистых и раковых заболеваний (Cerella et al., 2011; Ried, Fakler, 2014), но при определенных концентрациях они могут быть токсичны для эндотелиальных клеток (Прокофьева, Гончаров, 2014) и эритроцитов (Munday, 2012; Alzoubi et al., 2015; Mindukshev et al., 2016), причем посредником в проявлении их токсических эффектов выступают АФК. Развитие методологии цитофизиологического скрининга различных веществ, включая лекарственные препараты и нутрицевтики, является важнейшей научной проблемой. Кажется несомненным фактом, что между клеточным ответом *in vitro* и эффективностью терапии должна быть выраженная корреляция, однако это необходимо всякий раз доказывать.

### Цитотоксическая мощность

Работа в области экспериментальной и клинической медицины требует глубоких знаний о реакции клеток на самые разные стимулы и предполагает разработку новых теоретико-прикладных инструментов, поиск причинно-следственных связей и корреляций данных, полученных *in vitro* и *ex vivo*, с окончательными терапевтическими или токсическими эффектами *in vivo* (Mindukshev et al., 2016). Одним из таких инструментов может стать концепция “цитотоксической мощности”, первоначальная версия которой была опубликована ранее (Гончаров и др., 2018б). Принятые в настоящее время понятия “апоптотического индекса” и “апоптотического потенциала” недостаточны для адекватной количественной оценки и анализа проапоптотической активности химических веществ в пределах широкого диапазона терапевтических и токсических доз, поэтому в качестве альтернативы этим показателям была разработана концепция “цитотоксической мощности”, учитывающая не только апоптоз, но и другие типы клеточной гибели. Мы продолжаем развивать эту концепцию, и в настоящее время ее суть состоит в том, что в экспериментах *in vitro* окончательные расчеты значений эффективности проводятся не только с учетом временного развития процесса гибели клеток, но также с учетом соотношения количества вещества к числу исследуемых клеток. Цитотоксическую мощность ( $P$ ) вещества можно математически представить в виде отношения произведения количества вещества ( $S$ ), выраженного в молях, на интенсивность цитотоксического процесса ( $I$ ) к квадрату числа клеток ( $n$ ) за единицу времени ( $t$ ):

$$P = \frac{IS}{n^2 t}$$

Концепция и соответствующий алгоритм вычисления мощности позволяют выполнить корреляцию трансформацию квантованной зависимости в градуальную, основанную на стратегии многофакторного поиска, и, наряду с относительно универсальными показателями цитотоксичности, выявить и использовать тканеспецифические показатели (маркеры) — компоненты т. н. фенома. Для любого типа клеточной гибели можно выявить маркеры, уровень (количество) которых постепенно повышается или снижается перед гибелью клетки. Уровень экспрессии каждого маркера зависит от дозы (количества) цитотоксического вещества. Важно отметить, что мы наблюдаем экспрессию в живых клетках, вне зависимости от того, какой процент погибших клеток регистрируется; более того, мы можем наряду с этим определять экспрессию маркеров клетками на стадии раннего апоптоза или аутофагии, поскольку эти клетки считаются еще живыми. Таким образом, интенсивность развития того или иного



сигнала отражает повышение числа дискретных, функционально сопряженных, относительно стабильных и, в то же время, переходных внутриклеточных структур, являющихся компонентами клеточного фенома; мы называем их “фенами” ( $F$ ), тогда  $I = F/t$ . Единицей измерения цитотоксической мощности вещества является “мольфен” — количество наномолей вещества, изменяющего интенсивность экспрессии фенотипических маркеров (компонентов фенома) на 100 условных единиц в час с момента начала воздействия на 1000 клеток. Это определение, не претендующее на завершенность и полноту, придает особое значение количественному соотношению фенов и числа клеток, а также различным начальным состояниям клеток, что объясняет различия в динамике клеточной гибели внутри популяции. Концепция цитотоксической мощности может способствовать интеграции данных, полученных *in vitro* на различных типах клеток, с результатами исследований *in vivo*.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Животных используют в экспериментах тогда, когда необходимо выяснить, что происходит с живым организмом, который гораздо сложнее, чем сумма его частей. К сожалению, полностью заменить использование экспериментальных животных альтернативными методами в настоящее время невозможно. Выделяют четыре основания для использования животных в исследованиях (Anon, 2018a): 1) сугубо научный интерес; 2) необходимость создания моделей для изучения конкретных заболеваний; 3) необходимость разработки и тестирования разных видов терапии; и 4) обеспечение безопасности людей, животных и окружающей среды. В то же время, вклад экспериментальных животных в развитие методов клинической диагностики и терапии человека оценивается как очень низкий (Knight, 2008). Даже если наличие токсичности для животных может служить основанием для оценки риска по отношению к человеку, отношения правдоподобия бывают крайне противоречивы и варьируют в диапазоне более чем два порядка для различных классов соединений (Bailey et al., 2014). В связи с этим имеются вопросы к существующим руководствам по работе с животными, а также к исследователям, наблюдательным советам и спонсорам, от которых зависит внедрение концепции 3R (Ferdowsian, Beck, 2011). Научное сообщество признало основополагающую роль концепции 3R и необходимости максимально возможной транспарентности в отношении использования животных в биомедицинских исследованиях, что нашло отражение в Базельской декларации (Anon, 2018b). В основе регулирования исследований на животных лежит анализ соотношения

вред—польза (СВП, harm-benefit analysis, НВА), считающийся ключевой этической гарантией для животных (Round, Nicol, 2018). С другой стороны, акцент на практической значимости порой заставляет ученых преувеличивать социальную пользу их исследований, обещать слишком многое, что в итоге приводит к потере доверия к ним и их работам (Grimm et al., 2017; Eggel, Grimm, 2018). Таким образом, концепции выгоды и ее оценки требуют корректировки с точки зрения важности знаний как таковых. Получение научных знаний неразрывно связано с улучшением жизни людей и животных, состояния окружающей среды. Представления о СВП (англ. НВА) в их нынешнем виде имеют склонность переворачивать эту идею с ног на голову, согласно им исследования имеют ценность только в том случае, если полученные результаты сразу приносят общественную пользу (Grimm et al., 2017).

В поисках механизма действия нутрицевтиков часто приходят к выводу о бесполезности неестественного разделения интегральных эффектов на совокупность взаимодействий отдельных молекул с белком, следуя логике “парадигмы исследования механизма” (Weinberg, 2010). Эффекты нутрицевтиков, по всей видимости, являются следствием аддитивных, синергетических или ингибирующих межмолекулярных взаимодействий, так что конечный физиологический результат нельзя свести к отдельным молекулярным событиям. В настоящее время омик-технологии и соответствующий анализ данных позволяют структурировать системные эффекты (Гончаров и др., 2015; Sauer, Luge, 2015). Анализ “больших данных” (‘big data’ analysis), основанный на применении статистических программ машинного обучения (statistical machine-learning tools), становится важным инструментом для изучения сложных биологических явлений, причинно-следственных связей и для разработки соответствующих предсказательных моделей (Sauer, Plauth, 2017). Например, были разработаны новые подходы, основанные на реконструкции фазового пространства нелинейной динамической системы, для того чтобы отличать причинно-следственные связи от корреляций и продуктивно анализировать слабосвязанные динамические биологические системы (Sugihara et al., 2012). Для решения сложных биологических проблем следует чаще обращаться к омик-технологиям. Среди этих проблем — эпигенетические механизмы регуляции и их модуляция нутрицевтиками, которые действуют в том числе на ферменты, участвующие в эпигенетической регуляции генов (Gerhauser, 2018). Другая проблема связана с тем, что кишечная микробиота и ее метаболиты могут быть важными медиаторами взаимодействия диеты и эпигенома. Пока лишь несколько микробных метаболитов, среди которых фолат, фе-

нольные кислоты, S-(-)эквол, урוליцины, изотиоцианаты, коротко- и длинноцепочечные жирные кислоты, были протестированы на предмет их способности влиять на эпигенетические механизмы (Gerhauser, 2018).

Подходы и концепции, описанные в этой главе, могут значительно повысить прогностическую ценность исследований *in vitro*, чтобы в конце концов полностью отказаться — кто знает? — от исследований *in vivo*. Методология изучения безопасности и токсичности должна быть ориентирована на модели *in vitro* и *in silico*, особенно когда объектом исследования являются нутрицевтики. Этому способствуют как этические, так и финансовые соображения. Аморально приносить в жертву животных ради вполне здоровых людей, стремящихся быть еще здоровее. Задачи тестирования нутрицевтиков связаны с дальнейшей разработкой методов цитофизиологического скрининга *in vitro*, моделированием молекулярных взаимодействий *in silico*, а также с разработкой вычислительных алгоритмов для повышения прогностической значимости исследований. Эти направления должны стать неотъемлемыми компонентами методологии исследования природных компонентов пищевых продуктов — нутрицевтиков. Эти компоненты, вместе взятые, помогут значительно улучшить и здоровье человека, и наши знания о нем.

#### ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-015-00304) и в рамках госзадания АААА-А18-118012290142-9.

#### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

#### СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей и животных в качестве объектов изучения.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гончаров Н.В., Уколов А.И., Орлова Т.И. и др. Метаболизма: на пути интеграции биохимии, аналитической химии, информатики // Успехи соврем. биол. 2015. Т. 135. № 1. С. 3–17.
- Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Шмурак В.И. и др. Сравнительный анализ эстеразной и параоксоназной активности различных видов альбумина // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2017. Т. 53 (4). С. 271–281.
- Гончаров Н.В., Миндукушев И.В., Новожилов А.В. и др. Адаптивные биохимические изменения эритроцитов крысы после цикла принудительного плавания с применением экстракта зеленого чая и аммонийного прекодиционирования // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2018а. Т. 104. № 12. С. 1428–1441.
- Гончаров Н.В., Терпиловский М.А., Надеев А.Д. и др. Цитотоксическая мощь пероксида водорода по отношению к эндотелиальным клеткам *in vitro* // Биол. мембраны. 2018б. Т. 35. № 1. С. 16–26.
- Корф Е.А., Кубасов И.В., Вонский М.С. и др. Экстракт зеленого чая повышает экспрессию генов, ответственных за регуляцию баланса кальция в медленных мышцах крысы, при изнуряющей физической нагрузке // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2017. Т. 164. № 7. С. 10–14.
- Новожилов А.В., Тавровская Т.В., Войтенко Н.Г. и др. Эффективность экстракта зеленого чая в эксперименте с использованием двух моделей физической нагрузки // Бюл. эксперим. биол. и мед. 2014. Т. 158. № 9. С. 327–331.
- Прокофьева Д.С., Гончаров Н.В. Действие биогенных и абиогенных дисульфидов на клетки эндотелия в культуре: сравнение трех методов оценки жизнеспособности // Цитология. 2014. Т. 56. № 6. С. 410–418.
- Уколов А.И., Кессених Е.Д., Радилов А.С. и др. Токсикометаболизма: поиск маркеров хронического воздействия низких концентраций алифатических углеводородов // Журн. эвол. биохим. и физиол. 2017. Т. 53. № 1. С. 23–32.
- Akingbemi B.T., Braden T.D., Kemppainen B.W. et al. Exposure to phytoestrogens in the perinatal period affects androgen secretion by testicular Leydig cells in the adult rat // Endocrinology. 2007. V. 148. P. 4475–4488.
- Al-Malahmeh A.J., Al-Ajlouni A.M., Wesseling S. et al. Determination and risk assessment of naturally occurring genotoxic and carcinogenic alkenylbenzenes in basil-containing sauce of pesto // Toxicol. Rep. 2016. V. 4. P. 1–8.
- Al-Malahmeh A.J., Alajlouni A.M., Ning J. et al. Determination and risk assessment of naturally occurring genotoxic and carcinogenic alkenylbenzenes in nutmeg-based plant food supplements // J. Appl. Toxicol. 2017. V. 37 (10). P. 1254–1264.
- Alzoubi K., Calabrò S., Faggio C. et al. Stimulation of suicidal erythrocyte death by sulforaphane // Basic Clin. Pharmacol. Toxicol. 2015. V. 116 (3). P. 229–235.
- Anon. <http://www.animalresearch.info/en/designing-research/why-animals-are-used/>. Accessed Jun. 2018a.
- Anon. 5th international conference of the Basel Declaration Society openness and transparency: building trust in animal research, 14th–15th Feb. 2018b. <http://www.basel-declaration.org/>.
- Augustin M.A., Sanguansri L., Lockett T. Nano- and micro-encapsulated systems for enhancing the delivery of resveratrol // Ann. N. Y. Acad. Sci. 2013. V. 1290. P. 107–112.
- Bailey J., Thew M., Balls M. An analysis of the use of animal models in predicting human toxicology and drug safety // Altern. Lab. Anim. 2014. V. 42 (3). P. 181–199.

- Bayan L., Koulivand P.H., Gorji A. Garlic: a review of potential therapeutic effects // *Avicenna J. Phytomed.* 2014. V. 4 (1). P. 1–14.
- Bunchornravakul C., Reddy K.R. Review article: herbal and dietary supplement hepatotoxicity // *Aliment Pharmacol. Ther.* 2013. V. 37 (1). P. 3–17.
- Cerella C., Dicato M., Jacob C. et al. Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds // *Anti-Cancer Agents Med. Chem.* 2011. V. 11 (3). P. 267–271.
- ChemSafetyPRO [Электронный ресурс]. URL: [http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/What\\_is\\_Point\\_of\\_Departure\\_\(POD\)\\_in\\_Toxicology\\_and\\_How\\_to\\_Use\\_It\\_to\\_Calculate\\_Reference\\_Dose\\_RfD.html](http://www.chemsafetypro.com/Topics/CRA/What_is_Point_of_Departure_(POD)_in_Toxicology_and_How_to_Use_It_to_Calculate_Reference_Dose_RfD.html) (дата обращения: июнь 2018).
- Chen L., Mulder P.P.J., Louisse J. et al. Risk assessment for pyrrolizidine alkaloids detected in (herbal) teas and plant food supplements // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2017. V. 86. P. 292–302.
- Council Directive 89/398/EEC of 3 May 1989. URL: <https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=LEGISSUM%3A121100> (дата обращения: июнь 2018).
- Das L., Bhaumik E., Raychaudhuri U. et al. Role of nutraceuticals in human health // *J. Food Sci. Technol.* 2012. V. 49 (2). P. 173–183.
- Desbrow B., McCormack J., Burke L.M. Sports dietitians Australia position statement: sports nutrition for the adolescent athlete // *Int. J. Sport Nutr. Exerc. Metab.* 2014. V. 24 (5). P. 570–584.
- Doke S.K., Dhawale S.C. Alternatives to animal testing: a review // *Saudi Pharm. J.* 2015. V. 23 (3). P. 223–229.
- Eggel M., Grimm H. Necessary, but not sufficient. The benefit concept in the project evaluation of animal research in the context of directive 2010/63/EU // *Animals (Basel)*. 2018. V. 8 (3). P. E34.
- Elgawish R.A.R., Rahman H.G.A., Abdelrazek H.M.A. Green tea extract attenuates CCl<sub>4</sub>-induced hepatic injury in male hamsters *via* inhibition of lipid peroxidation and p53-mediated apoptosis // *Toxicol. Rep.* 2015. V. 2. P. 1149–1156.
- Espín J.C., García-Conesa M.T., Tomás-Barberán F.A. Nutraceuticals: facts and fiction // *Phytochemistry*. 2007. V. 68 (22–24). P. 2986–3008.
- European Commission. Sixth report on the statistics on the number of animals used for experimental and other scientific purposes in the member states of the European Union, Brussels. URL: [https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52010DC0511R\(01\)](https://eur-lex.europa.eu/legal-content/EN/TXT/?uri=CELEX:52010DC0511R(01)) (дата обращения: июнь 2018).
- Ferdowsian H.R., Beck N. Ethical and scientific considerations regarding animal testing and research // *PLoS One*. 2011. V. 6 (9). P. e24059.
- Filippich L.J., Zhu J., Oelrichs P. et al. Hepatotoxic and nephrotoxic principles in *Terminalia oblongata* // *Res. Vet. Sci.* 1991. V. 50 (2). P. 170–177.
- Fischer K., Kettunen J., Würtz P. et al. Biomarker profiling by nuclear magnetic resonance spectroscopy for the prediction of all-cause mortality: an observational study of 17,345 persons // *PLoS Med.* 2014. V. 11 (2). P. e1001606.
- Franco N.H. Animal experiments in biomedical research: a historical perspective // *Animals (Basel)*. 2013. V. 3 (1). P. 238–273.
- Gerhauser C. Impact of dietary gut microbial metabolites on the epigenome // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B. Biol. Sci.* 2018. V. 373 (1748). P. 20170359.
- Ghezzi P., Davies K., Delaney A. et al. Theory of signs and statistical approach to big data in assessing the relevance of clinical biomarkers of inflammation and oxidative stress // *PNAS USA*. 2018. V. 115 (10). P. 2473–2477.
- Goncharov N., Maevsky E., Voitenko N. et al. Nutraceuticals in sports activities and fatigue // *Nutraceuticals: efficacy, safety and toxicity* / Ed. R.C. Gupta. Amsterdam: Acad. Press/Elsevier, 2016a. P. 177–188.
- Goncharov N., Orekhov A., Voitenko N. et al. Organosulfur compounds as nutraceuticals // *Nutraceuticals: efficacy, safety and toxicity* / Ed. R.C. Gupta. Amsterdam: Acad. Press/Elsevier, 2016b. P. 555–568.
- Goncharov N.V., Belinskaia D.A., Shmurak V.I. et al. Serum albumin binding and esterase activity: mechanistic interactions with organophosphates // *Molecules*. 2017a. V. 22 (7). P. E1201.
- Goncharov N.V., Nadeev A.D., Jenkins R.O. et al. Markers and biomarkers of endothelium: when something is rotten in the state // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2017b. V. 2017. P. 1–27.
- Greek R., Menache A. Systematic reviews of animal models: methodology *versus* epistemology // *Int. J. Med. Sci.* 2013. V. 10 (3). P. 206–221.
- Grimm H., Eggel M., Deplazes-Zemp A. et al. The road to hell is paved with good intentions: why harm-benefit analysis and its emphasis on practical benefit jeopardizes the credibility of research // *Animals (Basel)*. 2017. V. 7 (9). P. E34.
- Gupta R.C. Nutraceuticals: efficacy, safety and toxicity. Amsterdam: Acad. Press/Elsevier, 2016. 1040 p.
- Habs M., Binder K., Krauss S. et al. A balanced risk-benefit analysis to determine human risks associated with pyrrolizidine alkaloids (PA) – the case of tea and herbal infusions // *Nutrients*. 2017. V. 9 (7). P. E717.
- Hassanin L.A., Salama A.M., Essa E.A. et al. Potential role of some nutraceuticals in neurotoxicity induced by aluminum oxide in experimental animal model // *Int. J. Adv. Res. Biol. Sci.* 2017. V. 4 (11). P. 72–89.
- Hui L., Qigui L., Sashuang R. et al. Nonspecific changes in clinical laboratory indicators in unselected terminally ill patients and a model to predict survival time based on a prospective observational study // *J. Transl. Med.* 2014. V. 12. P. 78.
- Ismail T., Calcabrini C., Diaz A.R. et al. Ellagitannins in cancer chemoprevention and therapy // *Toxins (Basel)*. 2016. V. 8 (5). P. E151.
- James K.D., Kennett M.J., Lambert J.D. Potential role of the mitochondria as a target for the hepatotoxic effects of (-)-epigallo-catechin-3-gallate in mice // *Food Chem. Toxicol.* 2018. V. 111. P. 302–309.
- Jurgens T.M., Whelan A.M., Killian L. et al. Green tea for weight loss and weight maintenance in overweight or obese adults // *Cochrane Database Syst. Rev.* 2012. V. 12. P. CD008650.

- Kilkenny C., Browne W.J., Cuthill I.C. et al. Improving bio-science research reporting: the ARRIVE guidelines for reporting animal research // PLoS Biol. 2010. V. 8. P. e1000412.
- Kim K.B., Nam Y.A., Kim H.S. et al.  $\alpha$ -Linolenic acid: nu-traceutical, pharmacological and toxicological evalua-tion // Food Chem. Toxicol. 2014. V. 70. P. 163–178.
- Knight A. Systematic reviews of animal experiments demon-strate poor contributions toward human healthcare // Rev. Recent Clin. Trials. 2008. V. 3 (2). P. 89–96.
- Konar D., Devarasetty M., Yildiz D.V. et al. Lung-on-a-chip technologies for disease modeling and drug de-velopment // Biomed. Eng. Comput. Biol. 2016. V. 7 (Suppl 1). P. 17–27.
- Kruger C.L., Mann S.W. Safety evaluation of functional ingre-dients // Food Chem. Toxicol. 2003. V. 41 (6). P. 793–805.
- Mahady G., Parrot J., Lee C. et al. Botanical dietary supple-ment use in peri- and postmenopausal women // Menopause. 2003. V. 10 (1). P. 65–72.
- Manteiga R., Park D.L., Ali S.S. Risks associated with con-sumption of herbal teas // Rev. Environ. Contam. Tox-icol. 1997. V. 150. P. 1–30.
- Mason B.C., Lavallee M.E. Emerging supplements in sports // Sports Health. 2012. V. 4 (2). P. 142–146.
- Mazzanti G., Menniti-Ippolito F., Moro P.A. et al. Hepato-toxicity from green tea: a review of the literature and two unpublished cases // Eur. J. Clin. Pharmacol. 2009. V. 65 (4). P. 331–341.
- Mazzanti G., Di Sotto A., Vitalone A. Hepatotoxicity of green tea: an update // Arch. Toxicol. 2015. V. 89 (8). P. 1175–1191.
- Mazzanti G., Moro P.A., Raschi E. et al. Adverse reactions to dietary supplements containing red yeast rice: assess-ment of cases from the Italian surveillance system // Br. J. Clin. Pharmacol. 2017. V. 83. P. 894–908.
- Merz K.H., Schrenk D. Interim relative potency factors for the toxicological risk assessment of pyrrolizidine alka-loids in food and herbal medicines // Toxicol. Lett. 2016. V. 263. P. 44–57.
- Mindukshev I., Kudryavtsev I., Serebriakova M. et al. Flow cytometry and light scattering technique in evaluation of nutraceuticals // Nutraceuticals: efficacy, safety and toxicity / Ed. R.C. Gupta. Amsterdam: Acad. Press/El-sevier, 2016. P. 319–332.
- Mueller C. The regulatory status of medical foods and di-etary supplements in the United States // Nutrition. 1999. V. 15. P. 249–251.
- Munday R. Harmful and beneficial effects of organic mono-sulfides, disulfides, and polysulfides in animals and hu-mans // Chem. Res. Toxicol. 2012. V. 25 (1). P. 47–60.
- Navarro S.L., Li F., Lampe J.W. Mechanisms of action of iso-thiocyanates in cancer chemoprevention: an update // Food Funct. 2011. V. 2 (10). P. 579–587.
- Ning J., Cui X., Kong X. et al. Risk assessment of genotoxic and carcinogenic alkenylbenzenes in botanical contain-ing products present on the Chinese market // Food Chem. Toxicol. 2018. V. 115. P. 344–357.
- Oelrichs P.B., Pearce C.M., Zhu J. et al. Isolation and struc-ture determination of terminalin A toxic condensed tannin from *Terminalia oblongata* // Nat. Toxins. 1994. V. 2 (3). P. 144–150.
- Olson H., Betton G., Robinson D. et al. Concordance of the toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals // Regul. Toxicol. Pharmacol. 2000. V. 32. P. 56–67.
- Päivärinta E., Pajari A.M., Törrönen R. et al. Ellagic acid and natural sources of ellagitannins as possible chemo-preventive agents against intestinal tumorigenesis in the Min mouse // Nutr. Cancer. 2006. V. 54 (1). P. 79–83.
- Patel S. Functional food red yeast rice (RYR) for metabolic syndrome amelioration: a review on pros and cons // World J. Microbiol. Biotechnol. 2016. V. 32. P. 32–87.
- Pound P., Nicol C.J. Retrospective harm benefit analysis of pre-clinical animal research for six treatment interven-tions // PLoS One. 2018. V. 13 (3). P. e0193758.
- Pound P., Ebrahim S., Sandercock P. et al. Where is the evi-dence that animal research benefits humans? // BMJ. 2004. V. 328. P. 514–517
- Prakash M., Shetty J.K., Rao L. et al. Serum paraoxonase activity and protein thiols in chronic renal failure pa-tients // Indian J. Nephrol. 2008. V. 18 (1). P. 13–16.
- Ried K., Fakler P. Potential of garlic (*Allium sativum*) in low-ering high blood pressure: mechanisms of action and clinical relevance // Integr. Blood Press Control. 2014. V. 7. P. 71–82.
- Ronis M., Hennings L., Gomez-Acevedo H. et al. Different responses to soy and estradiol in the reproductive sys-tem of prepubertal male rats and neonatal male pigs // FASEB J. 2014. V. 28. P. 373.5.
- Ronis M.J., Gomez-Acevedo H., Blackburn M.L. et al. Uter-ine responses to feeding soy protein isolate and treat-ment with 17- $\beta$ -estradiol differ in ovariectomized fe-male rats // Toxicol. Appl. Pharmacol. 2016. V. 297. P. 68–80.
- Ronis M.J.J., Pedersen K.B., Watt J. Adverse effects of nu-traceuticals and dietary supplements // Annu. Rev. Pharmacol Toxicol. 2018. V. 58. P. 583–601.
- Santini A., Cammarata S.M., Capone G. et al. Nutraceuti-cals: opening the debate for a regulatory framework // Br. J. Clin. Pharmacol. 2018. V. 84 (4). P. 659–672.
- Sauer S., Luge T. Nutriproteomics: facts, concepts, and per-spectives // Proteomics. 2015. V. 15 (5–6). P. 997–1013.
- Sauer S., Plauth A. Health-beneficial nutraceuticals-myth or reality? // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2017. V. 101 (3). P. 951–961.
- Shimshoni J.A., Duebecke A., Mulder P.P. et al. Pyrrolizidine and tropane alkaloids in teas and the herbal teas pepper-mint, rooibos and chamomile in the Israeli market // Food Addit. Contam. Part A. Chem. Anal. Control Ex-po Risk Assess. 2015. V. 32 (12). P. 2058–2067.
- Stahl B.U., Kettrup A., Rozman K. Comparative toxicity of four chlorinated dibenzo-p-dioxins (CDDs) and their mixture. Part I: acute toxicity and toxic equivalency factors (TEFs) // Arch. Toxicol. 1992. V. 66 (7). P. 471–477.
- Stoner G.D., Chen T., Kresty L.A. et al. Protection against esophageal cancer in rodents with lyophilized berries: potential mechanisms // Nutr. Cancer. 2006. V. 54 (1). P. 33–46.

- Sugihara G., May R., Ye H. et al.* Detecting causality in complex ecosystems // *Science*. 2012. V. 338 (6106). P. 496–500.
- Tan K.A.L., Walker M., Morris K. et al.* Infant feeding with soy formula milk: effects on puberty progression, reproductive function and testicular cell numbers in marmoset monkeys in adulthood // *Hum. Reprod.* 2006. V. 21. P. 896–904.
- Terpilowski M.A., Korf E.A., Jenkins R.O. et al.* An algorithm for deriving combinatorial biomarkers based on ridge regression // *J. Bioinform. Genom.* 2018. V. 1 (6). <https://doi.org/10.18454/jbg.2018.1.6.2>
- Terry C., Rasoulopour R.J., Knowles S. et al.* Utilizing relative potency factors (RPF) and threshold of toxicological concern (TTC) concepts to assess hazard and human risk assessment profiles of environmental metabolites: a case study // *Regul. Toxicol. Pharmacol.* 2015. V. 71 (2). P. 301–317.
- Toyokuni S.* Iron and thiols as two major players in carcinogenesis: friends or foes? // *Front. Pharmacol.* 2014. V. 5. P. 200.
- Vanacloig-Pedros E., Proft M., Pascual-Ahuir A.* Different toxicity mechanisms for citrinin and ochratoxin A revealed by transcriptomic analysis in yeast // *Toxins*. 2016. V. 8. P. 273.
- Vaughan R.A., Conn C.A., Mermier C.M.* Effects of commercially available dietary supplements on resting energy expenditure: a brief report // *ISRN Nutr.* 2014. V 2014. P. 650264.
- Weinberg R.* Point: hypotheses first // *Nature*. 2010. V. 464 (7289). P. 678.
- Wiedenfeld H., Edgar J.* Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants // *Phytochem. Rev.* 2011. V. 10. P. 137–151.
- Zhang C.L., Zeng T., Zhao X.L. et al.* Garlic oil attenuated nitrosodiethylamine-induced hepatocarcinogenesis by modulating the metabolic activation and detoxification enzymes // *Int. J. Biol. Sci.* 2013. V. 9 (3). P. 237–245.

## Safety Aspects of Nutraceuticals Administration

**N. V. Goncharov<sup>a, b, \*</sup>, M. A. Terpilovskii<sup>a</sup>, V. E. Sobolev<sup>a, b</sup>, E. A. Korf<sup>a</sup>, D. A. Belinskaya<sup>a</sup>**

<sup>a</sup>*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS, Saint Petersburg, Russia*

<sup>b</sup>*Research Institute of Hygiene Occupational Pathology and Human Ecology FMBA, Leningradskaya oblast, Vsevolozhskii rayon, g. p. Kuzmolovskii, st. Kapitolovo, Russia*

\**e-mail: ngoncharov@gmail.com*

Received March 18, 2019

Revised April 9, 2019

Accepted April 9, 2019

The problem of safety in the consumption of nutraceuticals is considered. Nutraceuticals are biologically active and naturally occurring compounds derived not only from medicinal plants but also from various species of flora and fauna. Most nutraceuticals possess antioxidant and anti-inflammatory properties and are supposed to prevent many human and animal diseases if taken regularly. Toxic effects of nutraceuticals are studied to a lesser extent, but available data cannot clearly guarantee their safety. Animals are widely used in pre-clinical studies of drugs and other xenobiotics due to many genetic, anatomical and physiological similarities, despite limitations of such studies resulting from considerable phenotypic differences. Animal toxicity absence does not imply no adverse reaction in humans. Currently, active development of alternative models is carried out for use in experimental biology and medicine. Moreover, statistical algorithms of data analysis can be an effective means of revealing and interpretation of complex physiological effects of nutraceuticals. Application of various models and algorithms of data processing will create a more solid scientific basis for risk assessment of nutraceuticals use by humans.

*Keywords:* nutraceuticals, preclinical studies, biomarkers, alternative models, cytotoxicity