Baština Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

RADOVI LXXXVIII, knj. 25.

Rezaković, Džemal

1991

Akademija nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/items/3bff7ae5-1a58-4336-9010-7be80dd2e58a

Preuzeto s Baštine Akademije nauka i umjetnosti Bosne i Hercegovine

https://bastina.anubih.ba/

AKADEMIJA NAUKA I UMJETNOSTI
BOSNE I HERCEGOVINE

RADOVI

KNJIGA LXXXVIII

Odjeljenje medicinskih nauka
Knjiga 25

Redakcioni odbor
Jela Grujić-Vasić, Džemal Rezaković,
Dragomir Stanković

Urednik
Džemal Rezaković,
redovni član Akademije nauka i umjetnosti
Bosne i Hercegovine

UDC 615/.617:502(082) YU ISSN 0350-0071

SARAJEVO 1991

ALTERNATIVNE METODE ZA ISTRAŽIVANJE NA ŽIVOTINJAMA U ISPITIVANJU KSENOBIOTIKA I EKOTOKSINA SA POSEBNIM OSVRTOM NA IZOLIRANE ORGANE

SEID HUKOVIĆ i NEDIM HUKOVIĆ
Institut za farmakologiju i toksikologiju Medicinskog fakulteta u Sarajevu

UDC 615.017:502

Apstrakt. Alternativne metode istraživanja na životinjama se u zadnje vrijeme sve više praktikuju iz dva osnovna razloga. Prvi je razlog brzina, efikasnost i jednostavnost da se dobiju rezultati efekta djelovanja ksenobiotika i ekotoksina. Drugi razlog je snažan antivivisekcionistički pokret, koji eksperimente na životinjama stavlja pod rigoroznu kontrolu. Alternativne metode imaju svoje prednosti i svoje nedostatke. Nedostaci su težak transfer sa rezultata in vitro na događaje in vivo i još teži transfer sa životinjskog materijala na čovjeka. Posebne i preporučene alternativne metode su ispitivanja na izoliranim organima životinja i to na taj način da se nervi izoliranih organa stimulišu konstantnim električnim stimulusima u konstantnim intervalima. U ambijent u kojem su izolirani organi dodaju se ksenobiotici ili ekotoksini i brzo se ustanovi jedan dio djelovanja ksenobiotika. Na ovakav način je moguće izvršiti više ispitivanja samo na jednoj životinji i na taj način steći orijentacioni uvid u djelovanje ksenobiotika. Izvršena je analiza preko pedeset ksenobiotika na opisani način. Preporučuje se za početne analize uzeti tri ili četiri organa i to ezofagus, mokraćni mjehur, i duktus deferens sa njihovim vanjskim nervima. Ukoliko se uzimaju četiri organa, onda se uzima želudac ili ileum. Ako se uzima ileum, onda se transmuralno stimulira, a uzima se od zamoraca. U prosuđivanju djelovanja ksenobiotika uzima se promjena visine izazvanih kontrakcija ili relaksacija, promjena tonusa i kombinacija obiju promjena.

Ključne riječi: alternativne metode, ksenobiotici, ekotoksini, izolirani organi, promjena efekta stimulacije.

Brojni su ksenobiotici i potencijalni toksini u našoj najbližoj okolini o kojima se vrlo malo zna. Ksenobiotici, kao potencijalni toksini, mogu biti opasni po ljude, životinje i ostala živa bića, a da se priroda njihove opasnosti vrlo malo poznaje i, naravno, vrlo malo ispituje. Sve je više novostvorenih, ekstrahiranih ili novosintetiziranih supstanci čije su molekule strane organizmima, tzv. ksenobiotika za koje treba ustanoviti u kojoj mjeri su toksični za živi organizam.

Toksikolog, posebno ekotoksikolog imao bi dva glavna zadatka. Prvi je da oslobodi sredinu od otrova ili ksenobiotika, kao potencijalnog otrova, i drugi je zadatak da sazna vrstu, tip ili spektar toksi-

Izradu ovog rada je sufinansirao je SIZ nauke BiH.

čnosti neke supstance. Prvi i sigurno važniji zadatak će ekotoksikolog teško ispuniti, jer su za to potrebna velika sredstva, snage koje on nema. Za tu svrhu potrebno je mijenjati ljudsku prirodu, preinvestirati industriju, smirivati ekonomske krize itd. Drugi zadatak je saznavati u kojoj mjeri je neka sustanca toksična, koliko oštećuje pojedinca ili grupu, koja opasnost prijeti kao akutna, a koja kao hronična, te na što ksenobiotik ili ekotoksin najviše djeluju, kako djeluju, način djelovanja i mnogo drugih podataka.

Ovaj drugi zadatak o spoznaji toksičnog djelovanja ksenobiotika i svih drugih supstaci se vrši na dva načina. Klasičan način upotrebljava kao predmet istraživanja cijele životinje i tzv. metod vivisekcije, dok novi način upotrebljava alternativne metode istraživanja (L e m b e c k, 1988). Od pomenutih alternativnih metoda je najčešći metod in vitro, kada se upotrebljavaju još živi dijelovi organizma. Da se vrše klasične metode istraživanja na koja smo navikli, potrebno je dosta sredstava, životinja, vremena i kadrova. Da se vrše alternativne metode istraživanja, in vitro, potrebno je manje sredstava, postupak je brži i pristupačniji, ali i alternativne metode imaju svoja ograničenja.

Kao i kod drugih istraživanja u medicini mogu se upotrebljavati epidemiološko-analitičke metode i eksperimentalne metode. Epidemiološko-analitičke metode su korisne ako se žele spoznati kauzalno-posljedični odnosi, ali je epidemiološki metod dugotrajan, ne omogućava da se istražuje bezbroj novih supstanci, ukratko, ograničen je na manji broj ciljeva. Epidemiološko-analitički metod se upotrebljava uglavnom na ljudima na dva načina: jedan je kada se kreće od uzroka ka posljedici, a drugi je kada se kreće od posljedica ka uzroku, a uzrok je u ovom slučaju ksenobiotik. Uglavnom se upotrebljava ovaj drugi put, tj. ide se od bolesti i bolesnika ka uzroku. To međutim ne može poslužiti da se otkrije priroda ekotoksikoloških djelovanja bezbroj supstanci koje se pojavljuju u okolini.

Sve je veća potreba da se istražuje toksično djelovanje, jer postoje brojne a priori toksične supstance i ksenobiotici, zatim postoji potreba da se ustanovi stepen i priroda toksičnog djelovanja lijekova, aditiva u hrani, dakle onih supstanci čiji je toksični efekt nusprodukt njihovom pozitivnom djelovanju (Z b i n d e n and G r o s s, 1979). U oba slučaja je potrebno mnogo eksperimentilnih životinja podvrgnutih vivisekciji, određivanju akutnog toksiciteta, potrebno je mnogo sredstava, opreme, kadrova i drugih snaga. Paradoks je da je sve veći broj ksenobiotika, a sve manji broj kadrova koji će ih istraživati, pa se moraju tražiti alternativni putevi. Takvom radu se isprječuju brojne teškoće, a te teškoće nisu samo materijalne, nego i etičke prirode.

Potrebno je riješiti više problema ukoliko se želi pristupiti masovnom ispitivanju biološkog djelovanja ksenobiotika, a jedan je da se ostvare materijalni uslovi i steknu snage za ispitivanje velikog broja ksenobiotika. Drugi problem koji treba riješiti je prevazilaženje etičkih prepreka, i treći ne manje težak problem je da se riješi kako uraditi što više ispitivanja.

Jedan od puteva rješavanja navedenih problema su tzv. alternativne metode od kojih su najviše upotrebljavana ispitivanja in vitro.

Alternativne metode životinjskim i ljudskim toksikološkim ispitivanjima mogu omogućiti i ubrzati sticanje najvažnijih spoznaja o djelovanju ksenobiotika. Alternativne metode, posebno one in vitro, na manjim nivoima organizacije sistema, kao što su stanice, tkiva i izolirani organi imaju svoja ograničenja. Izolirani organi su dio cjeline, pa se rezultati dobiveni na njima mogu uzeti kao dio za cjelinu, »pars pro toto«. To isto važi, još i više, za tkiva in vitro i za stanice in vitro.

Alternativne metode, koje su zamjena životinjskim eksperimentima, su neophodne za ispitivanje ksenobiotika. Cilj ovog rada je da se opišu mogućnosti istraživanja, prvenstveno sa izolovanim organima in vitro, izolovanim stanicama ili drugim izolovanim strukturama. Zadatak je da se pronađu, ispitaju i opišu najpogodniji izolirani organi koji mogu poslužiti da se odredi djelovanje ekotoksikona, ksenobiotika. Zadatak je zatim da se na tako pripremljene strukture apliciraju neki ekotoksini i da se ustanovi djelovanje i eventualno mehanizam djelovanja. Kada se identifikuju najpogodniji organi za određeni ksenobiotik, onda će se stimulisati pripadajući nervi, organ će se nagoniti na motornu funkciju, registrovat će se kontrakcije, aplicirati ksenobiotici i pratiti promjene.

MATERIJAL I METODA

Alternativne metode ispitivanja, kao alternative vivisekcije, mogu biti na živom ili neživom materijalu. Ako se radi o živom materijalu, onda se radi o strukturama, dijelovima organizma koje su prirodno ispod organizacione cjeline čitavog organizma. Ako se radi o neživom materijalu, modeli na kojima se ispituje mogu biti raznih nivoa organizacije, čak molekularnog ili submolekularnog nivoa. Kao alternativni model mogu biti kompjutorski sistemi, molekule, receptorske molekule, polimolekularni sistemi, a što se tiče živih struktura, to mogu biti subcelularne strukture, stanice kao model nekog organskog sistema, razna tkiva, organi i više spojeni organski sistemi. Posebna vrsta modela za istraživanja su model-sistemi izolirani organi, izolirani skupa sa vanjskim motornim nervima, koji se još nazivaju izolirani inervirani organi (IIO).

Kada se radi o tome da li se žrtvuje životinja, onda modeli istraživanja mogu biti bez ponovnog žrtvovanja ili sa ponovljenim žrtvovanjem. Bez ponovnog žrtvovanja životinja mogu se dobiti razni enzimi, permanentne stanične linije, mikroorganizmi; takvi modeli obično služe da se dobiju neki fundamentalni podaci. Pomenuti materijali za modele na kojim se ispituje mogu se dobiti i od humanog materijala (Kapić et al., 1990). Ukoliko se radi o ponovnom žrtvovanju životinja, onda se dobiju IIO, dakle radi se model-sistemima kada se za svako ispitivanje treba žrtvovati životinja, ali za razliku od vivisekcije na jednoj žrtvovanoj životinji, uradi se preko 20 eksperimenata, a ne da se žrtvuje 20 životinja za jedan eksperiment (Guenzel et al., 1988).

Izolirani organi, izolirani skupa sa svojim vanjskim nervima ili uzeti sa svojim unutrašnjim motornim nervima se mogu uzimati od domaćih životinja iz klaonica, zatim žrtvovanjem eksperimentalnih životinja, te od odbačenih komada ljudskih glatkomišićnih organa, odbačenih za vrijeme operacija. Povremeno se mogu dobiti komadići izoliranih organa zdravih ljudi kada se radi o transplataciji organa sa zdravog davaoca. Rjeđe se uzima IIO od mrtvih ljudi; izuzetak su fetusi koji se nasilno rađaju, kada se vrši ekaspulzija fetusa pod uticajem raznih ginekološko-akušerskih intervencija. U svakom slučaju se maksimalno pazi da ne dođe do etičkih prekršaja, jer se uzimaju samo odbačeni komadi tkiva.

Obično se preparira komadić od 2—4 cm, po mogućnosti longitudinalno nepresječen, tako da postoji očuvana cijev. Takav organ se veže koncima za dvije strane i ostavlja da se relaksira i adaptira. Preparat se stavlja u jednu od otopina, na pr. Tyrode otopinu koja se zagrijava na 32 stepena C. Otopina se aerira sa kiseonikom ili, još bolje, karbogenom. Neki IIO, vjerovatno zbog posebnog metabolizma, mogu se kontrahirati in vitro unatoč hipoksije, dok je drugima IIO potrebno mnogo više aeracije. Jedan kraj jedne strane organa se veže za transducer koji može biti izometrijski, izotonični ili auksotonični. Organe koji se skraćuju i koji prave veće pomake je bolje vezati za izotonični, dok organe koji razvijaju silu je bolje vezati za iziometrijske transducere. Auksotonični transduceri mjere skupa silu i pokret, oni su obično za početna istraživanja.

Ukoliko se želi raditi sa vanjskim motornim nervom, onda se takav nerv uvlači u elektrodu. Ukoliko nije moguće ispreparirati vanjski nerv i njega koristiti za električnu stimulaciju, onda se mogu koristiti unutrašnji motorni nervi, odnosno ganglije koje se nalaze intramuralno. Nakon perioda adaptacije počinje električna stimulacija motornih nerava i to najčešće sa slijedećim parametrima: 20 mA, 10 Hz, 1 mSek. u serijama od svake minute u trajanju od jedne sekunde. Jačina i ostala svojstva električne stimulacije se mijenjaju prema prilikama. Prilikom stimulacije motornih nerava dolazi prije do kontrakcije iako se događa da stimulacija može dovesti do relaksacije. Ovisno od organa, može se dogoditi bifazna reakcija, kontrakcija nakon koje uslijedi relaksacija ili obratno, što je rjeđe da prvo uslijedi relaksacija iza koje će biti kontrakcija.

Prepracije koje su se najviše upotrebljavale za analizu djelovanja ksenobiotika su bile iz probavnog trakta i to: ezofagus sa vanjskim holinergičnim somatskim nervom, želudac, zapravo njegov fundus sa gastričkim autonomnim holinergičkim nervima, kolon sa hipogastričkim pretežno adrenegičkim nervom ili sa ograncima pelvičkog nerva. Iz genitourinarnog trakta su se najviše upotrebljavale preparacije i to: duktus deferens sa pretežno adrenegičkim nervom i mokraćni mjehur sa holinergičkim autonomnim atropin rezistetnim nervom. Rjeđe se upotrebljavaju preparacije iz kardiovaskularnog sistema, kao što je srce, odnosno atrija sa parasimpatičkim ili simpatičkim nervima. Od preparacija koje se upotrebljavaju sa unutrašnjim nervima su najčešće preparacije tankog crijeva, pretežno ileuma.

Izolirani organi kojima se stimulišu vanjski ili unutrašnji nervi mogu biti posebno pripremljeni in vitro. Priprema može biti senzibilizacija (H u k o v i ć, 1989), zatim poseban tretman sa nekim supstancama još in vivo da preparacija bude ex vivo; zatim kada se izvadi organ i dobije preparacija IIO, onda se organ može tretirati in vitro da bude osjetljiviji, ili se može šuplji organ izvrnuti kao prst na rukavici, pa kao takav upotrijebiti in vitro, tada aplicirana supstanca, odnosno ksenobiotik prvo dolazi na sluznicu, a inače prvo dođe na serozu. Posebna mogućnost, koju treba navesti je uzimanje organa u raznim periodima fetalnog ili postfetalnog razvoja (M u l a b e g o v i ć, 1987).

Dodavanje ksenobiotika se obično vrši u 0,2—0,4 ml volumena, tako da je ksenobiotik otopljen u vodenoj otopini. Ksenobiotici mogu biti liposolubilni i netopivi, onda se prave suspenzije, pa se kao takve injiciraju u posudu za izolirane organe. Obično se izračunava finalna koncentracija, tako da se dobiju najčešće djelotvorne koncentracije, obično su to višekratne mikromolarne koncentracije. Ksenobiotici, koji se ispituju, ostavljaju se u posudi za izolirane organe neko vrijeme, do deset minuta, a onda se ispiru.

Zaključuje se o djelovanju ksenobiotika na osnovu komparacija prije i poslije dodate supstance. Postoje promjene tonusa, odnosno promjena visine bazalne linije, pa promjene visine izazvanih kontrakcija. Promjene mogu biti u apsolutnom ili relativnom smislu, što znači da se promjena prosuđuje na taj način da li su od kontrolne bazalne linije, ili je od nove bazalne linije. Ovisno od toga šta se mijenja i mjeri, može se izmjeriti sila, pokret ili neki drugi parametar, te na osnovu njega donositi kvantitativne procjene.

REZULTATI

Stimulacija pripadajućih egzogenih ili endogenih motornih nerava dovodi do kontrakcije organa. Kontrakcija se događa ukoliko se stimulira nerv koji izaziva kontrakcije. Postoje motorni nervi čija će stimulacija dovesti do relaksacije mada se relaksacija rjeđe registruje. Mnogo je učestaliji rezultat da se dobije dvofazna reakcija, umjesto da se dobije relaksacija; prvo uslijedi kontrakcija, iza čega uslijedi relaksacija organa.

Ako su stimulusi konstantni i u konstantnim odgovarajućim intervalima, onda su reakcije organa ravnomjerne. Ako se tada dodaju ksenobiotici, može se vrlo uočljivo registrovati promjena efekta stimulacije. Izolirani organi sa njima pripadajućim nervima tada su model-sistemi pojedinih organskih sistema, ili su model-sistemi pojedinih mišića, ili su model-sistemi neuromišićne transmisije. Kao model-sistemi mišića mogu biti modeli glatkih, odnosno poprečno-prugastih mišića, a ako su model-sistemi nervnomišićne transmisije, mogu biti model holinergične, adrenergične, NANC ili neke druge neurotransmisije.

U pojedinim eksperimentima, kada se ispituju ksenobiotici, stimulišu se endogeni motorni nervi ili endogene ganglije. U tim slučajevima nije uvijek moguće odvojiti uticaj direktne u odnosu na indirektnu stimulaciju. Transmuralna stimulacija, koja služi za stimulaciju endogenih nerava, se primjenjuje onda kada postoje intramuralni nervi. Promjenom električnih parametara, a posebno frekvencije, može se donekle pokušati pretežno stimulisati holinergične ili adrenergične nerve. Obično su stimulusi niže frekvencije djelotvorniji za holinergične, a visoke frekvencije za oba tipa nerava, ali se bolje registruju efekti za adrenergične nerve.

Efekti dodatih ksenobiotika, ovisno od supstance, mogu djelovati na više načina. Nekada ksenobiotici ne djeluju na organ koji je prividno mehanički miran, nego se njegov efekt vidi tek kada je organ stimulisan na pokret, sekreciju ili neku drugu funkciju. U tome je prednost izoliranih organa sa njima pripadajućim nervima koji se električki stimuliraju, jer se može na osnovu promjene efekta stimulacije pod uticajem ksenobiotika naslućivati na djelovanje ksenobiotika. Djelovanje ispitivane supstance, potencijalnog ekotoksina, može biti povećanje efekta stimulacije, tj. povećanje visine kontrakcija. Djelovanje također može biti povećanje tonusa, kombinacija povećanja tonusa i visine izazvanih kontrakcija. Također se može desiti da se pojačava relaksacija, pa čak i relaksacija izazvana stimulacijom nerava.

Na osnovu promjena mehaničke reakcije izoliranih organa zaključuje se o djelovanju ispitivane supstance i mehanizma njenog djelovanja. Reakcije izoliranih organa su brže, rezultati su kvantitativni i relevantni da se nasluti priroda djelovanja ekotoksina. Doze koje treba aplicirati obično se kreću oko mikromolarnih koncentracija. Vrlo često će se ustanoviti odnos između doze i reakcije.

Do sada je na opisan način analizirano više desetina ksenobiotika i od ranije poznatih i potvrđenih ekotoksina. Rezultati ukazuju da reakcija nije ovisna od veličine molekule niti od kompliciranosti građe molekule. Registruje se efekt nekog kationa, ili aniona, kao i efekt komplikovanih molekula. Vrlo je teško prognozirati efekt ksenobiotika samo na osnovu njegove molekularne strukture. Jednostavne molekule ili njihovi ioni u malim koncentracijama mogu djelovati kao molekule koje su slične vlastitim neurotransmitorima. Pravac djelovanja je također teško prognozirati, a on ne mora biti isti na raznim preparacijama.

DISKUSIJA

Alternativne metode za eksperimente na životinjama za ispitivanje ksenobiotika i ekotoksina se mnogo manje koriste nego to po svojim mogućnostima zaslužuju. Moguće je dobiti takve reagirajuće strukture koje će ukazati na pravac, jačinu i tip djelovanja ksenobiotika. Najbolje je započeti istraživanje ksenobiotika na tri ili četiri izolirana organa i to: ezofagus sa vanjskim nervom, mokraćni mjehur sa ograncima pelvičkog nerva i duktus deferens sa hipogastričkim nervi-

ma. Ukoliko se rade eksperimenti na miševima, onda se postojećim trima izoliranim organima može pridodati želudac, a ukoliko se rade na zamorcima, onda se može kao četvrti organ pridodati ileum.

Ezofagus sa pripadajućim motornim nervom je model-sistem poprečnoprugaste muskulature, somatske holinergičke transmisije, a spada među preparacije koje su vrlo robusne i izdržive. Preparacije mokraćnog mjehura je model-sistem autonomne holinergične, atropin-rezistetne neurotransmisije. Treći organ koji bi uz pomenuta dva bio korišten za ispitivanje ksenobiotika je duktus deferens sa adrenergičkim autonomnim hipogastričkim nervom. Ukoliko se još koristi četvrta preparacija, želudac sa holinergičkom autonomnom invercijom, onda postoji model-sistem koji je veoma osjetljiv. To isto važi za ileum zamorca, ali se tada stimulišu intrinzički nervi. Koji će se organi uzeti za analizu ksenobiotika ovisi od eksperimentalne životinje ili od organizma od kojega se vrši preparacija.

Upotreba izoliranih organa uzetih od životinja ili od čovjeka ima svoje prednosti, ali i nedostatke. Jedan od nedostataka je transfer dobivenih rezultata, prvo sa dijela izoliranog organa na cijeli organizam, dakle transfer rezultata sa in vitro na in vivo, a zatim sa životinje na čovjeka (Kobinger, 1988; Ruelius, 1987). To posebno važi za toksikološka istraživanja (Czok, 1988; Henschler, 1988; Markwardt, 1988).

Osim izoliranih organa, danas se za in vitro ispitivanja kako ksenobiotika tako i drugih aktivnih supstanci upotrebljavaju izolirane stanice ili subcelularne strukture (Borenfreund and Puerner, 1985; Gotti et al., 1987; Sher et al., 1990; Huković, 1987; Huković, 1990. i brojni drugi). Više je posebnih metoda za alternativna ispitivanja na životinjama. Interesantno je mišljenje Goodforda (1987), koji navodi da se alternativne metode mogu spuštati sve do kompjutora. On misli da spoznajom receptora za dalja ispitivanja nisu potrebni organi ili stanice, nego samo fizikalno-hemijske nežive strukture, a sa spoznajom fizikalno-hemijskih zakonitosti preostat će samo matematika i kompjutori.

ALTERNATIVES TO ANIMAL EXPERIMENTS IN RISK ASSESSMENT OF XENOBIOTICS AND ECOTOXINS USING ISOLATED ORGANS

Summary

Xenobiotics and ecotoxins should be toxicologicaly defined in spite of their great number in enviorment, industry and labqratories. There are two obstacles for the toxicological examinations of xenobiotics and ecotoxins. The first one is expensiveness, animals and time consuming. The second obstacle is antiviosectionist movement. The use of isolated organs with theire motor nerve stimulations could be alternative to the whole animal experiments in ecotoxicological risk assessments. The isolated innervated organs described were with extrinsic and intrinsic motory nerve stimulation. It was recommended to use four preparatons with extrinsic nerves, ana they were: oesophagus, stomach, urinary bladder and ductus deferens taken out from the mice. If the guinea-pigs were used fourth organ could be ileum instead of stomach. More then 50 xenobiotics were analysed in order to improve the method for toxicological investigation.

LITERATURA

Borenfreund, E. and Puerner, J. (1985): *Toxicity Determined in Vitro by Morpholigical Alternations and Neutral Red Absorbtion,* Toxicology Letters, 24, 119—124.

Czok, R. (1988): *Abhaengig vom Tierversuch, Arzneimitel Sichercheit,* s. 45—51. U Lembeck, F.: Alternativen zum Tierversuch, Thieme Verlag Stuttgart.

Goodford, P. (1987): *Receptor-Based Drug Design,* s. 607—614. U Rand, M. J. and Raper, C.: *Pharmacology.* Proc. Exerpta Medica, Amsterdam.

Gotti, C., Cabrini, D., Sher, E. and Clementi, F. (1987): *Effects of Long-Term in Vitro Exposure to Alminium, Cadmium or Lead on Differentiation and Cholinergic Receptor Expression in a Human Neuroblastoma Cell Line,* Cell Biol. and Toxicol., 3, 431—440.

Guenzel, P., Reinhardt, C. and Schiffmann, D. (1988): *Proc. Symposium Alternatives to Animal Experiments in Risk Assessments.* Schering AG West Germany, Berlin.

Henschler, D. (1988): *Sichercheit von Industriechemikalien,* s. 55—61. U Lembeck, F.: *Alternativen zum Tierversuch,* Thieme, Stuttgart.

Huković, S. (1987): *In vitro ispitivanje lijekova i ksenobiotika sa posebnim osvrtom na izolirane inervirane organe.* s. 9—11. Zbornik radova. Peti susreti farmakologa, Zagreb 24. 06. 1987.

Huković, N. (1990): *Farmakološka karakterizacija nikotinskih receptora ćelijskih linija humanog mikrocelularnog karcinoma pluća.* Magistarski rad. Medicinski fakultet, Sarajevo.

Huković, S. (1990): *Vizualizacija alergijske reakcije na izoliranim i inerviranim organima.* Saopštenja SANU, Beograd.

Kobinger, W. (1988): *Uebertragbarkeit von tierexperimentallen Ergebnissen auf den Menschen,* s. 35—43. Lembeck, F.: *Alternativen zum Tierversuch,* Thieme, Stuttgart.

Kapić, E., Mulabegović, N., Rajman, I., Potkonjak, D., Bošković, S. and Huković, S. (1990): *The Isolated Human Ureter as a Model-System in Pharmacology.* Iugoslav. Physiol. Pharmacol. Acta. 26, 123—127.

Kramer, M. S. (1988): *Clinical Epidemiology and Biostatistics.* Springer-Verlag, Berlin.

Lembeck, F. (1988): *Alternativen zum Tierversuch.* Thieme, Stuttgart.

Marquardt, H. (1988): *Neue Wege der Toxikologie: die Zellkultur,* s. 62—70. U Lembeck, F.: *Alternativen zum Tierversuch,* Thieme, Stuttgart.

Mulabegović, N. (1986): *Neuronalna i neuroefektorna transmisija u raznim periodima razvoja.* Doktorska disertacija, Medicinski fakultet, Sarajevo.

Ruellius, H. (1987): *Extrapolation from Animals to Man: Predictions, Pitfalls and Perspectives.* Xenobiotica, 17, 255—265.

Sher, E., Pratesi, G., Raggi, G., Ciceri, E., Leone, G., Huković, N. and Clementi, F. (1990): *Expression of DNA Topoisomerase Genes in Correlated with Multidrug Resistence in Human Lung Cancer Cell Lines.* s. 119—121. Proc. of Second intern. conference on small lung cancer, Ravenna, Italia, May 11—12, 1990.

Zbinden, G. and Gross, F. (1979): *Pharmacological Methods in Toxicology,* Pergamon press, Oxford.