

Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 1: гематологические исследования)

А. В. Сорокина*, С. В. Алексеева, Н. В. Еремина, А. Д. Дурнев

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение
«Научно-исследовательский институт фармакологии имени В. В. Закусова»,
Балтийская ул., д. 8, Москва, 125315, Российская Федерация

Резюме. Доклиническая оценка безопасности лекарств является обязательным этапом их разработки. Клинико-лабораторные исследования, в частности гематологические, биохимические и патоморфологические, являются существенной частью программы изучения хронической токсичности. Выбор методических подходов к изучению токсикологических характеристик потенциальных лекарственных средств позволяет оценить степень риска их последующего клинического применения, выявить возможные органы-мишени, установить степень повреждения, а также возможность и динамику восстановления поврежденных систем. Значительную роль в обеспечении получения адекватных результатов упомянутых исследований играет корректное методологическое выполнение всех этапов пробоподготовки и учет всевозможных факторов при интерпретации полученных данных. Так, выбор методических подходов к лабораторным исследованиям крови обуславливается информацией о видовых, возрастных и половых особенностях экспериментальных животных и о специфических особенностях исследуемого препарата. Цель работы — методическое обобщение опыта проведения гематологических исследований, накопленного в лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» при проведении хронических токсикологических экспериментов.
Ключевые слова: доклинические токсикологические исследования; хроническая токсичность; клинико-лабораторные исследования; гематологические исследования; отбор проб крови; тонкопленочный мазок крови; лейкоцитарная формула; автоматический гематологический анализатор; гемостаз

Для цитирования: Сорокина АВ, Алексеева СВ, Еремина НВ, Дурнев АД. Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 1: гематологические исследования). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(3):197–206. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-197-206>

***Контактное лицо:** Сорокина Александра Валериановна; alex-mike5475@mail.ru

Summary of Clinical Laboratory Studies Performed During Preclinical Safety Evaluation of Medicinal Products (Part I: Haematological Studies)

A. V. Sorokina*, S. V. Alekseeva, N. V. Eremina, A. D. Durnev

Zakusov Institute of Pharmacology,
8 Baltiyskaya St., Moscow 125315, Russian Federation

Abstract. Preclinical safety evaluation is an important stage in the development of medicinal products. Clinical laboratory studies, including haematological, biochemical and pathomorphological studies, are an essential part of chronic toxicity studies. A careful choice of methodological approaches to examination of toxicological characteristics of drug candidates makes it possible to assess the degree of risk associated with their subsequent clinical use, identify potential target organs, determine the extent of damage, as well as the possibility and dynamics of restoring damaged systems. Key prerequisites for obtaining adequate results of the studies are correct methodological implementation of all the stages of sample preparation and careful consideration of all factors during interpretation of the obtained data. Thus, the choice of methodological approaches to blood tests is often determined by the species, age and sex of laboratory animals, as well as by specific characteristics of the tested drug. The aim of the study was to summarise data on haematological studies performed in the Drug Toxicology Laboratory of the Federal State Budgetary Institute «Zakusov Institute of Pharmacology» when conducting chronic toxicity studies.

Key words: preclinical toxicology studies; chronic toxicity; clinical laboratory studies; haematological studies; blood sampling; thin blood film; white blood cell differential count; automated haematology analyser; haemostasis

For citation: Sorokina AV, Alekseeva SV, Eremina NV, Durnev AD. Summary of clinical laboratory studies performed during preclinical safety evaluation of medicinal products (part I: haematological studies). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya* = *The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(3):197–206. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-197-206>

***Corresponding author:** Aleksandra V. Sorokina; alex-mike5475@mail.ru

Токсикологические исследования являются обязательной и неотъемлемой составляющей программы доклинических исследований, предваряющих проведение клинических испытаний, и в каждом случае составляют самостоятельную научную задачу.

Оценка повреждающего действия препарата при его многократном повторном введении (хроническая токсичность) имеет целью выявление токсических эффектов, наиболее чувствительных к действию исследуемого препарата органов и систем организма (мишеней токсических воздействий) и исследование обратимости вызываемых повреждений¹. Сведения, полученные в ходе исследования хронической (субхронической) токсичности, создают основу для обоснованного прогноза риска проведения клинических исследований лекарств².

Исследование хронической токсичности — многоплановая процедура, включающая комплекс исследований максимального количества систем и органов на различных уровнях организации. Данные, полученные в ходе этой процедуры, подвергаются перекрестному сопоставлению и признаются значимыми только при совпадении частных заключений по каждому фрагменту исследований с обязательным учетом возможного влияния фармакологических эффектов, присущих изучаемому веществу.

Результаты гематологических исследований предоставляют важную информацию о состоянии активности костного мозга, а также о возможных внутрисосудистых эффектах, например гемолизе. Практика показывает, что причиной искажений, неопределенных или ложных результатов может оказаться недостаточная осведомленность исполнителей в многочисленных методических деталях экспериментов.

Цель работы — обобщение опыта лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В. В. Закусова» в части проведения гематологических исследований, потенциально полезное для исследователей-токсикологов и экспертов. В статье разобраны вопросы надлежащего забора крови у лабораторных животных (мыши, крысы, кролики), подготовки биоматериала и проведения гематологических исследований, а также основные показатели гематологического анализа крови и референсные значения показателей.

ОСОБЕННОСТИ ЗАБОРА БИОМАТЕРИАЛА И ПРОБОПОДГОТОВКИ

Забор цельной крови и ее исследование

Клеточный состав периферической крови зависит от особенностей содержания и кормления

животных, их видовой и половой принадлежности, времени суток, сезонности, температурного и светового режима, других составляющих и может различаться в разных экспериментах³. Снижение до минимума разбросов результатов из-за вероятных ошибок возможно лишь при строгой стандартизации всех этапов отбора материала и пробоподготовки с соблюдением стандартных операционных процедур (СОПов).

Для корректного проведения гематологических и биохимических исследований важна техника забора биологического материала. Определяющими особенностями взятия биопроб, в частности крови у лабораторных животных, являются ограниченный объем пробы, возможность загрязнения биоматериала элементами шерсти и необходимость ограничения подвижности животных за счет их жесткой фиксации.

Объем крови у здоровых млекопитающих относительно постоянен и составляет от 5 до 9 % массы тела в зависимости от вида (табл. 1). Без возникновения критических последствий, влияющих на последующие анализы, можно отобрать лишь объем крови в количестве, составляющем 1 % массы тела. Из-за стрессовых воздействий и компенсаторных реакций, связанных с отбором крови, возможны искажения лейкоцитарной формулы и биохимических параметров крови. В случае периодического отбора проб объем крови следует корректировать в меньшую сторону [1, 2]. В ходе эвтаназии возможен отбор около 50 % общего объема крови животного, что используется только в случаях, когда нетерминальные методы отбора не позволяют собрать необходимое для клинико-лабораторного метода исследования количество биоматериала. Примерные объемы крови животных, рекомендуемые для отбора, в зависимости от возраста животного и кратности отбора представлены в таблице 1. Следует учитывать, что объем полученной плазмы или сыворотки будет составлять примерно половину от взятого объема цельной крови.

Предпочтительный способ забора проб крови зависит от вида животного и может определяться необходимостью в повторном взятии материала⁴. Отбор крови у грызунов из орбитального венозного синуса для опытных исследователей не составляет труда. Одним из его существенных недостатков является тот факт, что процедура приводит к небольшому повреждению ткани и, как следствие, к высвобождению тканевого тромбопластина, результатом чего является искажение результатов коагуляционного исследования.

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Ч. 1. М.: Гриф и К; 2012.

² Руководство по экспертизе лекарственных средств. Т. 1. М.: Гриф и К; 2013.

³ Макаров ВГ, Макарова МН, ред. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. СПб.: ЛЕМА; 2013.

⁴ Там же.

Таблица 1. Объемы крови животных, рекомендуемые для отбора в токсикологических исследованиях

Table 1. Blood sample volumes for laboratory animals as recommended for toxicology studies

Вид животного	Масса тела, г	Общий объем крови, мл	Еженедельный отбор, мл	Ежемесячный отбор, мл	После эвтаназии, мл
Мышь	20–30	~ 2	0,1	0,2	1
Крыса	200–400	~ 20	1	2	10
Кролик	2500–3000	~ 200	10	20	100

Забор крови из яремной вены у крыс может выполняться с или без анестезии. Его преимуществом по сравнению с методикой отбора из орбитального синуса является отсутствие физического повреждения тканей. Однако само применение анестезии далеко не всегда желательно и/или требует постановки дополнительных контрольных экспериментов.

Образцы крови можно также получить из хвостовой вены грызунов путем ампутации кончика хвоста или венепункции. Первая процедура с очевидными последствиями может привести к несколько разбавленным образцам крови, загрязненным тканевыми жидкостями. Для предотвращения загрязнения первые две-три капли удаляются из пробы. Недостаток венепункции — травмирование эндотелия сосудов иглой и, как следствие, ускоренное тромбообразование и склеивание стенок вен⁵.

Пункция сердца успешно используется некоторыми исследователями для сбора образцов крови, однако связанные с этим риски, включающие утечку крови в перикардальный мешок, как правило, перевешивают любое потенциальное преимущество этого метода перед другими, более приемлемыми процедурами.

Эмоциональный и болевой стресс во время манипуляций с лабораторными животными может также послужить причиной искажения результатов, поэтому для минимизации беспокойства животных к работе должен быть допущен персонал, прошедший специальную подготовку по надлежащему обращению с ними.

В некоторых случаях хорошим решением может стать относительно безопасная ингаляционная анестезия смесью, состоящей из диоксида углерода (70 %) и кислорода (30 %). В случае особой необходимости допускается использование неингаляционных анестезирующих средств (кетамин, ксилазин, смесь ксилазала с золетилом и др.). Однако большинство из них являются индукторами микросомальных ферментов, что может повлиять на биофармацию изучаемого вещества с непредсказуемыми последствиями.

При должном навыке для сведения к минимуму дискомфорта животных часто используют различные способы фиксации с помощью подобранных по размеру рестрейнеров.

Популярность приобретает использование для забора крови вакуумных пробирок с антикоагулянтами, соответствующими последующим задачам. Это хорошо стандартизует процедуру, но практически неприменимо у мелких грызунов.

При использовании современного оборудования объем сыворотки/плазмы, необходимый при рутинных анализах крови, составляет не менее 5–30 мкл на один показатель, а для измерения 10 основных биохимических параметров обычно требуется около 400–500 мкл сыворотки/плазмы. Кроме того, для дифференциальной оценки лейкоцитов и количества ретикулоцитов требуется дополнительно около 50 мкл для приготовления и анализа мазков крови, окрашенных соответствующим образом. Для этого, в свою очередь, суммарно требуется 1,0–1,2 мл цельной крови, но с учетом возможного повторного анализа, плохого выхода сыворотки и т. д. обычно отбирают 1,5–1,8 мл крови для проведения типичного набора гематологических и биохимических тестов, исключая коагулологические исследования и анализ на метгемоглобин [3–5].

Цельная кровь имеет высокую вязкость и поэтому трудно перемешивается. Перед началом гематологического измерения пробирку с кровью необходимо осторожно вращать и переворачивать не менее 10 раз для равномерного распределения элементов крови, предотвращения адгезии и повреждения клеток. Анализ пробы желательно проводить в ближайшие 5–10 мин после взятия пробы. Позднее наблюдается снижение большинства показателей, что может привести к искажению результатов эксперимента. При работе на автоматических гематоанализаторах предпочтительно использовать программу «Разбавление пробы», что позволяет избежать сбоев в работе из-за повышенной свертываемости крови, например, у крыс, или в результате фармакологического эффекта.

Дополнительные гематологические анализы, которые могут потребоваться для доклинических токсикологических исследований специфических лекарственных кандидатов, включают определение метгемоглобина, карбоксигемоглобина, фибриногена, протромбинового времени (РТ) и активированного частичного тромбопластинового времени (АРТТ). Первые два показателя могут быть

⁵ Хиггинс К. Расшифровка клинических лабораторных анализов. Руководство. М.: Лаборатория знаний; 2016.

измерены с помощью кооксиметра. Поскольку метгемоглобин, окисленная форма гемоглобина, нестабилен, так как фермент метгемоглобинредуктаза крови восстанавливает его обратно до гемоглобина, эти образцы следует собирать на льду и анализировать в течение 1 ч. РТ и АРТТ следует определять из образцов крови, взятых с цитратом в качестве антикоагулянта. Поскольку отношение объема цитратного антикоагулянта к объему отобранной крови критично, для проведения коагуляционных испытаний необходимо получить 1 мл цитратной крови с использованием туберкулинового шприца, предварительно заполненного 0,1 мл раствора цитрата.

Стоит отметить, что получение максимально точных результатов возможно только при строгом соблюдении методик калибровки приборов.

Приготовление тонкопленочного мазка крови на предметном стекле

Правильная оценка и дифференциация разных форм клеток находятся в прямой зависимости от технического выполнения предварительных процедур: взятия крови, техники микроскопирования и метода окраски. Для дифференцированного подсчета лейкоцитов и ретикулоцитов делаются мазки цельной крови непосредственно в момент отбора проб без добавления антикоагулянтов⁶.

Для получения мазков высокого оптического качества необходимо использовать готовые чистые обезжиренные стекла толщиной 1 мм. Каплю исследуемой крови наносят на середину стекла на расстоянии 2 см от края. Шпатель или шлифованное стекло помещают в 1–2 мм от капли под углом 35–45°, двигают его немного назад, чтобы захватить кровь, которая растекается по ребру стекла (шпателя), и затем легким движением продвигают вперед для получения монослойного ряда клеток. Мазок должен получиться достаточно длинным (3–4 см), желтоватого цвета, располагаться на 0,5–1 см от краев и оканчиваться «метелочкой».

При приготовлении мазка не следует сильно надавливать на стекло (шпатель), так как при этом травмируются форменные элементы крови. В первую очередь страдают клетки эритроцитарного ряда, деформация которых приводит к ложным результатам, затрудняя диагностику. Для предотвращения подобных случаев и стандартизации процесса приготовления препаратов крови в современных лабораториях используют автоматические приборы для производства равномерных мазков. В этом случае данное действие контролируется ав-

томатически, что обеспечивает возможность получения стандартных мазков с обширной «рабочей поверхностью», оптимальным распределением крови и минимальным повреждением клеток. Длина и толщина мазка зависят от гематокрита и количества крови, а также определяются скоростью движения распределяющей пластины, которая выставляется при калибровке⁷.

Автоматические анализаторы практически полностью заменили мануальное осуществление фиксации, окраски (по Романовскому) и сушки препаратов крови. Лейкограмма и морфометрические параметры эритроцитов и тромбоцитов также анализируются с помощью автоматической гематологической системы анализа мазка крови. Количество ретикулоцитов (суправитальная окраска во влажной камере, краситель бриллиантовый крезиловый синий) подсчитывают автоматизировано при помощи специальных программ или визуально под микроскопом (увеличение 1000).

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Общий анализ крови

Влияние потенциальных лекарственных средств на систему крови в токсикологических исследованиях оценивается по следующим гематологическим показателям: количеству гемоглобина, эритроцитов, лейкоцитов, тромбоцитов, гематокриту, тромбокриту, среднему объему эритроцитов, среднему содержанию гемоглобина в эритроцитах, средней концентрации гемоглобина в эритроците. Обязательно проводится дифференциальный подсчет лейкоцитов (соотношение различных видов лейкоцитов), так как изменения («сдвиги») в лейкоцитарной формуле при референтном значении общего содержания лейкоцитов могут свидетельствовать о длительных хронических процессах в организме лабораторных животных, снижении активности иммунной системы и т. д.⁸

Немаловажное значение имеет изучение морфологии эритроцитов. Так, характерные изменения, касающиеся величины, формы, степени насыщения эритроцитов гемоглобином, подсчет и оценка ретикулоцитов (незрелых эритроцитов) дают представление о влиянии токсических факторов на активность эритропоэза и способствуют выявлению различных патологий⁹.

При выявлении гематологических изменений в ходе эксперимента целесообразно провести дополнительное специализированное цитологическое

⁶ Тэмл Х, Диам Х, Хаверлах Т. Атлас по гематологии. Практическое пособие по морфологической и клинической диагностике. М.: МЕДпресс-информ; 2014.

⁷ Карпищенко АИ, ред. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.

Риган В, Сандерс Т, Деникола Д. Атлас ветеринарной гематологии. М.: Аквариум; 2014.

⁸ Williams PL, James RC, Roberts SM, eds. Principles of toxicology: environmental and industrial applications. John Wiley & Sons, 2000.

⁹ Gad SC, eds. Animal models in toxicology. Taylor & Francis Group, 2006.

(цитохимическое или иммуноцитохимическое) исследование костного мозга, которое позволит оценить повреждение клеток на начальном этапе кроветворения, когда происходит образование и дифференциация стволовых клеток¹⁰.

Основные показатели крови, определяемые автоматическими гематологическими анализаторами, их описание и интерпретация результатов представлены в таблице 2.

Дифференциальный анализ лейкоцитарной формулы

Морфологическое исследование мазка крови на предметном стекле имеет решающее значение в гематологической экспертизе. Правильная оцен-

ка и дифференциация разных форм клеток зависят от способа забора крови и качества проб; техники приготовления мазка и микроскопирования; метода окраски.

Подсчет лейкоцитарной формулы заключается в регистрации всех встречающихся в поле зрения лейкоцитов отдельно по их росткам. Следует учитывать, что при мануальном приготовлении мазков распределение клеток крови по предметному стеклу происходит неравномерно. Лейкоциты различаются между собой по размерам, удельной массе, упругости и т. д., поэтому в середине мазка чаще встречаются лимфоциты, по краям препарата — нейтрофилы, эозинофилы и моноциты.

Таблица 2. Основные показатели гематологического анализа цельной крови и их описание

Table 2. Main parameters of whole blood tests and their description

Показатель	Описание	Особенности измерения и/или трактовка результатов
WBC (white blood cells)	Лейкоциты ($10^9/\text{л}$); бесцветные форменные элементы крови.	В современных гематологических анализаторах осуществляется дифференциальный подсчет лейкоцитов. В большинстве случаев разделение лейкоцитов идет на три группы: лимфоциты, гранулоциты и средние клетки. Последняя группа является интегральной и включает в себя эозинофилы, базофилы, моноциты и плазматические клетки. Такая дифференциация лейкоцитов применима лишь для динамического наблюдения за состоянием лейкоцитарной формулы здоровых животных. При наличии патологии со стороны лейкопоза анализатор не способен выдавать правильные результаты, поэтому для решения данной проблемы необходима дополнительная визуальная оценка мазка крови. Объемы различных форм лейкоцитарных клеток весьма разнообразны, благодаря чему лейкоциты возможно разделить кондуктометрическим методом. Размеры малых лимфоцитов близки к размерам эритроцитов, и при их измерении возникает необходимость разрушения эритроцитов, которые легко лизируются вследствие хрупкости их мембран. Однако даже после полного разрушения эритроцитов в пробе возможны ошибки измерения в результате агрегации тромбоцитов, грубого перемешивания крови в пробирке с антикоагулянтами, длительного хранения или неправильного температурного режима.
RBC (red blood cells)	Эритроциты ($10^{12}/\text{л}$); красные клетки крови, имеющие вид безъядерных двояковогнутых дисков.	Эритроциты подсчитывают в цельной крови, для уменьшения интерференции со стороны лейкоцитов кровь предварительно необходимо разбавить. В современных анализаторах это производится автоматически дилуентом, входящим в набор для каждого прибора. Увеличение числа лейкоцитов приводит к прогрессивному нарастанию ошибки при подсчете. Так, при лейкоцитозе свыше $50 \cdot 10^9/\text{л}$ искажается показатель объема эритроцитов (MCV). Ложнозавышенные результаты наблюдаются также при наличии в крови гигантских тромбоцитов (с объемом >30 фл) или криоглобулинов. Снижение эритроцитов в крови наблюдается при агглютинации клеток или выраженном микроцитозе эритроцитов.
HGB (haemoglobin)	Гемоглобин (г/дл или г/л); основной дыхательный пигмент, принадлежащий к хромопротеинам и обеспечивающий ткани кислородом. Является одним из основных параметров для оценки эритропоза.	Основным методом определения количества гемоглобина является цианметгемоглобиновый метод, основанный на преобразовании под действием феррицианида калия гемоглобина в цианметгемоглобин, концентрация которого определяется спектрофотометрически при длине волны 540 нм. Завышение уровня гемоглобина наблюдается при лейкоцитозах более $50 \cdot 10^9/\text{л}$ и в присутствии нестабильных гемоглобинов (сульфо- и карбогемоглобинов). Ошибку измерения гемоглобина провоцирует повышенная мутность сыворотки, которая встречается при гиперлипидемии, гипербилирубинемии, криоглобулинемии и др. Стоит обратить внимание на то, что величина результирующей ошибки не связана с методологией, а является результатом технических особенностей: оптической геометрии прибора, размера выходного отверстия из кюветы для образцов и расстояния до фотодиода.
HCT (hematocrit)	Гематокрит (% или л/л); отражает долю объема крови, занимаемую эритроцитами.	В автоматических анализаторах крови гематокрит высчитывается суммой непосредственно измеренных объемов эритроцитов в единице объема крови. Проблемы «остаточной» плазмы, которая встречается при определении данного показателя методом центрифугирования, не существует. Причины ложнозавышенных результатов те же, что и в предыдущих случаях: присутствие гигантских тромбоцитов, гиперлейкоцитоз ($>50 \cdot 10^9/\text{л}$), гипергликемия (>600 мг/кг), криоглобулинемия. Ложнозаниженные результаты встречаются при агглютинации эритроцитов и выраженном микроцитозе (<36 фл).

¹⁰ Hodgson E, ed. A textbook of modern toxicology. John Wiley & Sons, 2004.

Продолжение таблицы 2

Показатель	Описание	Особенности измерения и/или трактовка результатов
MCV (mean red cell volume)*	Средний объем эритроцита (мкм ³); вычисляется делением суммы клеточных объемов на число эритроцитов.	Средний объем эритроцита как усредненный показатель может иметь нормальное значение при одновременно выраженных микро- и макроцитозе, поэтому целесообразно оценивать распределение клеток по объему в гистограмме. Ложнозавышенные результаты бывают при агглютинации эритроцитов, когда агглютинат воспринимается анализатором как одна большая клетка, при диабетическом кетоацидозе вследствие гипермолярности плазмы и набухания эритроцитов. Ложнозаниженные результаты встречаются при механическом гемолизе, коагулопатии и ряде других причин.
MCH (mean corpuscular hemoglobin)*	Среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците, выражается в абсолютных единицах.	Данный показатель более объективен, чем цветовой, который не отражает содержание гемоглобина в эритроците. MCH используют для дифференциации анемий на нормо-, гипо- и гиперхромные.
MCHC (mean cell hemoglobin concentration)*	Средняя концентрация гемоглобина в эритроците (г/дл).	В отличие от MCH, величина которого зависит от объема клетки, MCHC показывает истинное насыщение эритроцита гемоглобином. Является наиболее стабильным из гематологических показателей, поэтому используется как индикатор ошибки прибора или пробоподготовки. В современных гематологических анализаторах, работающих по принципу проточной цитометрии, измеряют концентрацию гемоглобина в каждом отдельном эритроците, вводя в эритроцитарное звено гемограммы дополнительный показатель — HDW (hemoglobin distribution width, ширина распределения концентрации гемоглобина в эритроцитах), который характеризует гетерогенность эритроцитарного пула. Снижение уровня MCHC встречается при состояниях, связанных с нарушением синтеза гемоглобина.
RDW (red cell distribution width)*	Ширина распределения эритроцитов по объемам.	Показатель характеризует степень анизоцитоза, является важным дополнительным критерием в определении динамики развития анемических состояний у лабораторных животных. Данное значение используют в диагностике микросфероцитоза. Изолированное повышение RDW является признаком раннего развития железодефицитной анемии.
PLT (platelet)	Тромбоциты (10 ³ /мм ³); безъядерные сферические клетки — цитоплазматические фрагменты мегакариоцитов костного мозга, необходимые для поддержания гемостаза.	В отличие от мануального метода, в котором предварительно лизируются эритроциты, в анализаторах тромбоциты и эритроциты измеряются одновременно в одной камере, что создает проблему дифференциации макротромбоцитов и микроцитов, а также шизоцитов крови. Для решения данной проблемы в современных приборах существует система дискриминаторов, определяющих высоту электрического сигнала, пропорциональную размеру клетки и ширину (длительность) импульсов. Все импульсы, соответствующие размерам частиц от 1,8 до 30 фл, определяются как тромбоциты. При выходе амплитуды за диапазоны нормального распределения прибор автоматически проводит коррекцию результатов и выдает их истинное значение. Для дополнительного контроля проводят визуальную оценку тромбоцитов на микроскопическом препарате, предназначенном для дифференцировки лейкоцитов, на котором можно увидеть присутствие агрегации или агглютинации тромбоцитов, микроцитарных эритроцитов и других элементов (артефактов) крови, препятствующих правильному подсчету тромбоцитов.
MPV (mean platelet volume)	Средний объем тромбоцитов (мкм ³).	В неактивированном состоянии тромбоциты имеют дискоидную форму. При активации клетки приобретают сферическую, звездчатую форму с нитевидными отростками — псевдоподиями. «Молодые» кровяные пластинки имеют больший объем, поэтому при активации тромбоцитопоза данный показатель увеличивается. В целом, считается, что более объемные тромбоциты метаболически и функционально активнее, чем менее объемные. В течение первых двух часов после взятия крови с K ⁺ -EDTA происходит набухание тромбоцитов с изменением их объема и, соответственно, увеличением MPV. Увеличение MPV наблюдается при нарушении функций щитовидной и поджелудочной железы. Уменьшение этого показателя отмечается при спленэктомии.
PDW (width of distribution of thrombocytes)	Распределение тромбоцитов по объему (%).	Количественно показывает степень анизоцитоза тромбоцитов. В норме тромбоцитарная кривая характеризуется унимодальностью, при выявлении аномального распределения тромбоцитов необходима визуальная оценка клеток в окрашенном мазке. Наличие в крови преимущественно молодых форм сдвигает гистограмму вправо, старые клетки располагаются слева. Данный показатель меняется при пролиферативных состояниях.
PCT (plateletcrit)	Тромбокрит (%).	Показывает долю объема цельной крови, занимаемую тромбоцитами.

* Эритроцитарный индекс. В современных гематологических анализаторах помимо основных показателей RBC, HGB и HCT рассчитываются эритроцитарные индексы, которые дают дополнительную информацию по эритропозу. Все эритроцитарные индексы являются расчетными, поэтому на их значение влияют все ошибки измерения эритроцитов и гемоглобина.

Мазки крови сначала исследуют при малом увеличении 100 и 200 (окуляр 10; объективы 10 и 20 соответственно) для оценки количества клеток и обнаружения лучшего фрагмента для подсчета форменных элементов. Не следует смотреть клетки в конечном отделе препарата («метелочке»), поскольку там чаще встречаются деформированные лейкоциты, предпочтительнее отступить на 1–1,5 см от края мазка¹¹. Детальный анализ количественного и качественного состава лейкоцитов производят под иммерсией и кратностью увеличения 1000 (окуляр 10; объектив 100). Траекторию движения по мазку определяет гематолог, учитывая предварительный «сухой» просмотр при малом увеличении. При нормальном монохромном распределении используют стандартную технику просмотра: считают несколько полей зрения по краю мазка, затем возвращаются к центру по зубчатой траектории. Минимальное количество лейкоцитов, необходимое для дифференциального анализа, — 100 клеток, однако для уменьшения погрешности при дальнейшей статистической обработке желательно рассмотреть не менее 200 клеток. Параллельно с дифференцировкой белых клеток проводится морфологическая оценка эритроцитов и тромбоцитов¹².

При визуальном анализе изображения гематолог может лишь на качественном уровне оценить морфологические особенности клеток крови. С помощью систем компьютерного анализа изображения клеток возможно цитометрически оценивать эритроциты и тромбоциты, в частности определять количественные характеристики морфологии клеток: площади и периметры ядра, соотношение площадей ядра и цитоплазмы, оптическую плотность ядра и цитоплазмы и другие показатели, которые характеризуют индивидуальные структурные особенности клеток и играют определяющую роль в диагностической оценке результатов в условиях экспериментального изучения безопасности новых лекарственных средств.

Подсчет ретикулоцитов

Ретикулоциты представляют собой незрелые (молодые) эритроциты, которые образуются после исчезновения ядер из нормобластов. В ретикулоцитах содержатся остатки скоплений клеточных органелл зернисто-сетчатой структуры, не различимые после обычного окрашивания для подсчета лейкоцитарной формулы. Они выявляются после прижизненной обработки клеток бриллиантовым крезиловым синим или новым метиленовым синим. В процессе окраски рибонуклеопротейиды, содержащиеся в клетке, образуют комплекс с красителем, который позво-

ляет легко идентифицировать и подсчитать ретикулоциты. Окрашивание органелл можно проводить в пробирке с последующим приготовлением тонкопленочного мазка на предметном стекле. Возможно и окрашивание во влажной камере (37 °C), когда мазок крови наносят на предварительно окрашенное бриллиантовым крезиловым синим стекло, а затем стекло помещают в чашку Петри с влажной средой и, не давая мазку высохнуть, выдерживают в термостате 10–15 мин. В мазке ретикулоцитарные клетки подсчитывают в ‰ на 1000 эритроцитов в поле зрения.

Специализированные гематологические анализаторы позволяют по окраске митохондриальной РНК флуоресцентным красителем тиазоловым оранжевым определять относительное и абсолютное количество клеток и средний объем, а также разделять ретикулоциты на 3 группы (по содержанию РНК).

В гематологических исследованиях количество ретикулоцитов и оценка степени их зрелости являются важным показателем активности эритропоэза. Так, повышенное содержание этих клеток с высоким содержанием РНК является показателем токсического действия препаратов на систему кроветворения с развитием гемолитических анемий и острых лейкозов, а пониженное содержание — возможного развития апластического синдрома или острого миелолейкоза. Однако не стоит забывать о широте референтных значений данного показателя у лабораторных животных, поэтому при анализе результатов необходимо дифференцировать отрицательное действие препарата от антигипоксического или иного положительного эффекта.

Система свертывания крови — гемостаз

Основная задача гемостаза состоит в поддержании целостности кровеносной системы. Для выполнения этой задачи в системе гемостаза выработан сложный комплекс процессов, который реагирует на малейшие повреждения тканей кровеносных сосудов и восстанавливает их целостность. Оценка гемостаза в токсикологических исследованиях включает определение количества тромбоцитов и плазменных факторов свертывания крови¹³.

Количество тромбоцитов можно определить несколькими методами, каждый из которых обладает своими недостатками и преимуществами.

Подсчет в камере Горяева достаточно точен, не требует подсчета эритроцитов, но сам процесс трудоемок и нерационален в случае экспериментов с большим количеством животных. Анализ проводится в ближайшие часы после взятия крови.

В отличие от метода подсчета тромбоцитов камере Горяева подсчет в мазке недостаточно точен

¹¹ Карпищенко АИ, ред. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.

¹² Саркисов ДС, Перов ЮЛ, ред. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов. М.: Медицина; 1996.

¹³ Долгов ВВ, Вавилова ТВ, Свирин ПВ. Лабораторная диагностика нарушения гемостаза. Учебно-методическое пособие. М.: Триада; 2019.

и зависит от большого количества факторов. Существенный недостаток этого метода — необходимость одновременного подсчета эритроцитов и тромбоцитов в крови. Преимущество — независимость от времени забора крови, т.е. возможность проводить анализ в удобное исследователю время при надлежащем хранении биоматериала.

Преимущество работы на гематологическом анализаторе заключается в возможности дополнительно к подсчету количества клеток определить тромбоцитарные индексы: средний объем тромбоцитов, их распределение по объему и тромбокрит.

В экспериментальной гематологии для каждого вида лабораторных животных установлены пределы физиологической нормы, поэтому выявление тромбоцитопении или тромбоцитоза требует обязательной коррекции результатов с учетом видовой принадлежности. Снижение количества тромбоцитов может наблюдаться при аутоиммунной тромбо-

цитопении, диссеминированном внутрисосудистом свертывании или нарушении производства тромбоцитов из-за поражения мегакариоцитов вследствие воздействия химических веществ, излучения, вирусов или неоплазии. Повышение содержания тромбоцитов происходит вследствие вторичных причин, таких как миелопролиферативные заболевания, воспаления или новообразования, или вследствие первичных изменений костного мозга, характеризующихся заметным увеличением числа мегакариоцитов. Такие диагнозы, как тромбоцитопения и тромбоцитоз, должны быть подкреплены дополнительным исследованием мазка периферической крови.

Основу современного исследования гемостаза составляют четыре базовых показателя — протромбиновое и тромбиновое время, активированное частичное тромбопластиновое время и концентрация фибриногена (табл. 3).

Таблица 3. Основные показатели системы свертывания крови и их описание

Table 3. Key parameters of the blood coagulation system and their description

Показатель	Описание	Особенности измерения и/или трактовка результатов
PT (prothrombin time)	Протромбиновое время — мера относительной активности факторов внешнего и общего путей свертывания крови.	Показатель важен для диагностики дисфункций системы свертывания крови, исследования антикоагулянтов и оценки функции печени. Процессы, которые происходят в организме лабораторных животных при повреждении стенки сосуда и, как результат, приводят к образованию кровяного сгустка, моделируются <i>in vitro</i> путем добавления тканевого тромбопластина (фактор III) к плазме крови в присутствии ионов кальция и измерения времени коагуляции. Изменения данного показателя могут быть вызваны различными патологическими состояниями (поражением печени, ДВС-синдромом, авитаминозом) или действием антикоагулянтов.
TT (thrombin time)	Тромбиновое время — тест, характеризующий состояние конечного этапа свертывания, который оценивает количество активного фибриногена.	В тесте ТТ определяют время от момента добавления тромбина определенной активности к цитратной плазме до момента образования фибринового сгустка. Увеличение показателя тромбинового времени возможно вследствие снижения содержания функционального фибриногена (дисфибриногенемия), снижения содержания фибриногена (гипофибриногенемия), присутствия продуктов распада фибриногена, гепарина или антител к тромбину или вследствие амилоидоза. Поскольку время свертывания в тесте ТТ сильно зависит от активности используемого тромбина, то проблема стандартизации этого теста сводится к применению стабильного раствора тромбина с одной и той же активностью. Для исследования плазмы, не содержащей гепарин, используют тромбин с активностью 3 МЕ/мл, для гепаринизированной плазмы — 6 МЕ/мл и 9 МЕ/мл.
APTT (activated partial thromboplastin time)	Активированное частичное тромбопластиновое время — мера относительной активности факторов внутреннего и общего путей свертывания крови.	В тесте АРТТ определяют время свертывания плазмы после инкубирования пробы с поверхностно-активирующим агентом (активатор фактора VII) и хлоридом кальция. Показатель чувствителен к дефициту всех факторов свертывания (кроме VII), к гепарину, к специфическим и неспецифическим ингибиторам.
Fibrinogen	Фибриноген — гликопротеин, участвующий в образовании фибрина.	Уровень фибриногена в плазме может быть определен с помощью различных методик, среди которых термическая или солевая преципитация, образование сгустка при помощи тромбопластина или тромбина с последующим взвешиванием сгустка или растворением его и определением концентрации общего белка. Кроме того, могут использоваться различные иммунологические методы. В современных лабораториях применяют метод определения уровня фибриногена по Клауссу. Преимущество этого метода заключается в том, что он позволяет определить только функциональный фибриноген, который принимает непосредственное участие в процессе свертывания. Метод заключается в том, что при добавлении к разбавленной плазме избытка тромбина время свертывания не зависит от факторов свертывания и обратно пропорционально только содержанию фибриногена в исследуемом образце. Причиной повышения содержания фибриногена могут быть реакции воспаления, иммунные и деструктивные процессы.

РЕФЕРЕНТНЫЕ ЗНАЧЕНИЯ

На значения показателей гематологического исследования крови влияют многочисленные переменные (вид, пол, возраст, источник животных, условия содержания в клетке, условия окружающей среды, рацион, методика отбора пробы крови, использование анестезии, методика анализа, используемый гематологический анализатор и др.). В этой связи важно проводить любые манипуляции для животных испытуемых и контрольных групп в одинаковых условиях эксперимента.

Несмотря на то, что группы контрольных животных должны всегда включаться в токсикологический эксперимент, часто оказывается полезным при интерпретации данных наличие внутрилабораторных данных исторического контроля, поэтому лаборатории, активно занимающиеся доклиническими токсикологическими исследованиями, должны установить внутренние контрольные диапазоны.

В попытке представить «типичные» диапазоны клинической патологии у животных были использованы литературные данные в дополнение к собственным неопубликованным наблюдениям (табл. 4)¹⁴. Данные представлены для животных тех возрастов, которые чаще всего используются в исследованиях хронической токсичности: 20 недель для мышей и крыс и 5 месяцев для кроликов. Как правило, влияние половой принадлежности либо минимально, либо неочевидно при изучении клинической патологии лабораторных животных. При наличии значимых различий представлены значения для обоих полов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Доклиническое исследование хронической токсичности является обязательным этапом изуче-

ния нового лекарственного средства перед его дальнейшей клинической апробацией. Критическое значение при этом приобретают результаты клинико-лабораторных исследований, позволяющие идентифицировать органы-мишени токсического действия лекарственного препарата и оценить степень соответствующих повреждений. Качество получаемых в данных исследованиях результатов напрямую зависит от надлежащего отбора биоматериала, пробоподготовки, правильности проведения анализа.

При выявлении токсических эффектов следует проанализировать возможное влияние методов забора и обработки крови, времени забора, выбора тестов, методов контроля качества и интерпретации результатов тестирования. Следует помнить, что исследуемое вещество может повлиять на состояние, созревание, распределение и/или высвобождение стволовых клеток, функции и/или использование клеток периферической крови. Для адекватной интерпретации результатов гематологического исследования следует учитывать вариабельность нормальной и патологической физиологии животных и ее возможного влияния на определяемые параметры в конкретных условиях токсикологического эксперимента.

Кроме гематологических исследований важную роль при составлении заключения о соотношении риск-польза применения нового лекарственного препарата играют данные биохимических и патоморфологических исследований, детальное обсуждение проведения которых предполагается в следующей части работы.

В заключение отметим, что, несмотря на токсикологический контекст настоящей статьи, приведенная методология с некоторыми правками может также быть использована в лабораториях, занимаю-

Таблица 4. Основные референсные параметры гематологических показателей крови для мышей, крыс и кроликов

Table 4. Main reference values for blood test parameters for mice, rats, and rabbits

Показатель, единицы измерения	Мыши	Крысы	Кролики
Лейкоциты, 10 ⁹ /л	♂4,0–12,0 ♀3,5–9,7	♂6,0–19,0 ♀5,0–14,0	5,4–11,9
Эритроциты, 10 ¹² /л	8,0–10,0	♂7,0–9,8 ♀6,5–9,2	5,5–7,0
Гемоглобин, г/дл	13,6–16,8	14,0–17,0	12,0–14,7
Гематокрит, %	36,9–46,9	36,0–52,0	37,0–44,5
Средний объем эритроцита, фл	44,5–49,7	50,0–60,0	61,4–68,6
Среднее содержание гемоглобина в отдельном эритроците, пг	16,1–18,6	16,0–20,0	20,2–23,0
Средняя концентрация гемоглобина в эритроците, г/дл	34,8–38,2	31,0–38,0	32,3–34,9
Тромбоциты, 10 ³ /мм ³	700–1400	800–1200	175–500
Ретикулоциты, % от количества эритроцитов	1,6–3,7	0,2–0,8	0–2,0

¹⁴ Jacobson-Kram D, Keller KA., eds. Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Informa Healthcare USA, 2006.

щихся проведением доклинических исследований специфической фармакологической активности новых лекарственных препаратов.

Благодарности. Работа проведена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

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

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

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

1. Diehl K, Hull R, Morton B, Pfister R, Rabemampianina Y, Smith D, et al. A good practice guide to the administration of substances and removal of blood, including routes and volumes. *J Appl Tox.* 2001;21(1):15-23. PMID: 11180276.
2. Caron A, Lelong C, Bartels T, Dorchies O, Gury T, Chalier C, Benning V. Clinical and anatomic pathology effects of serial blood sampling in rat toxicology studies, using conventional or micro-sampling methods. *Regul Toxicol Pharmacol.* 2015;72(3):429-39. <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2015.05.022>
3. McGuill MW, Rowan AN. Biological effects of blood loss: implications for sampling volumes and techniques. *ILAR Journal.* 1989;31(4):5-20. <https://doi.org/10.1093/ilar.31.4.5>
4. Zou W, Yang Y, Gu Y, Zhu P, Zhang M, Cheng Z, et al. Repeated blood collection from tail vein of non-anesthetized rats with a vacuum blood collection system. *J Vis Exp.* 2017;(130):e55852. <https://doi.org/10.3791/55852>
5. Poitout-Belissent F, Aulbach A, Tripathi N, Ramaiah L. Reducing blood volume requirements for clinical pathology testing in toxicologic studies-points to consider. *Vet Clin Pathol.* 2016;45(4):534-51. <https://doi.org/10.1111/vcp.12429>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Сорокина Александра Валериановна, канд. биол. наук. *Aleksandra V. Sorokina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-9600-7244>

Алексеева Светлана Витальевна. *Svetlana V. Alekseeva*. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-1262-6997>

Еремина Наталья Вахитовна, канд. биол. наук. *Natalia V. Eremina*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-7226-5505>

Дурнев Андрей Дмитриевич, д-р мед. наук, проф., член-корр. РАН. *Andrey D. Durnev*, Dr. Sci. (Med.), Professor, Corresponding Member of RAS. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0218-8580>

Статья поступила 05.04.2019

После доработки 29.07.2019

Принята к печати 16.08.2019

Article was received 5 April 2019

Revised 29 July 2019

Accepted for publication 16 August 2019