

Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 2: биохимические и патоморфологические исследования)

А. В. Сорокина*, С. В. Алексева, 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. Исследования хронической токсичности представляют собой неотъемлемую часть общей токсикологической оценки потенциальных лекарственных средств. Биохимические исследования крови и мочи при этом позволяют описать общую картину состояния животного, проследить динамику изменения лабораторных показателей — маркеров повреждений органов при многократном введении препарата как для группы животных, так и индивидуально. Патоморфологические исследования органов и тканей позволяют на клеточном уровне представить характер повреждений. В ходе системного анализа полученных данных возможно однозначно выявить системы организма, наиболее подверженные токсическому действию препарата, а также оценить степень воздействия и обратимость эффектов. Учитывая высокую ценность получаемой фармакологической информации, необходимо уделять особое внимание надлежащему методологическому выполнению всех этапов подготовки и проведения упомянутых исследований, а также соответствующему анализу и интерпретации данных. Цель работы — методическое обобщение опыта проведения биохимических и патоморфологических 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; биохимические исследования; патоморфологические исследования

Для цитирования: Сорокина АВ, Алексева СВ, Еремина НВ, Дурнев АД Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 2: биохимические и патоморфологические исследования). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):272–279. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-272-279>

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

Summary of Clinical Laboratory Studies Performed During Preclinical Safety Evaluation of Medicinal Products (Part II: Biochemical and Pathomorphological 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. Chronic toxicity studies are an integral part of the overall toxicological evaluation of drug candidates. Biochemical studies of blood and urine serve to describe the general picture of the animal's condition and to trace the dynamics of laboratory markers of organ damage after repeated administration of the drug — both for a group of animals, as well as individually. Pathomorphological studies of organs and tissues make it possible to understand the nature of damage at the cellular level. A systemic analysis of the data obtained allows for accurate identification of the body systems that are most susceptible to the toxic effect of the drug, as well as for assessment of the degree of impact and the reversibility of effects. Considering the great importance of the obtained pharmacological information, it is necessary to pay special attention to proper methodological implementation of all the stages of preparation and performance of the mentioned studies, as well as to proper analysis and interpretation of the data. The aim of the paper was to summarise the methodology of biochemical and pathomorphological studies based on the experience obtained 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; pathomorphological studies; biochemical studies

For citation: Sorokina AV, Alekseeva SV, Eremina NV, Durnev AD. Summary of clinical laboratory studies performed during preclinical safety evaluation of medicinal products (part II: biochemical and pathomorphological studies). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):272–279. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-272-279>

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

Доклиническое изучение безопасности — сложная многоплановая процедура, включающая в себя комплекс исследований систем и органов на различных уровнях организации. Итоговые результаты таких исследований 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.

Данные, получаемые в ходе клинико-лабораторных исследований, в частности гематологических, биохимических и патоморфологических, представляют особую ценность при составлении полной картины токсического действия препарата при его многократном введении, поскольку позволяют идентифицировать органы-мишени воздействия препарата, оценить степень и обратимость эффектов и, соответственно, спрогнозировать возможные нежелательные явления при клинических исследованиях у людей. Поскольку совокупность полученных в вышеупомянутых исследованиях данных при корректной их интерпретации вносит существенный вклад в формирование соотношения «риск—польза» при обсуждении программы развития препарата, необходимо обеспечивать качество получаемых данных на всех этапах проведения исследования¹.

Цель работы — методическое обобщение опыта проведения биохимических и патоморфологических исследований, накопленного в лаборатории лекарственной токсикологии ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» при проведении хронических токсикологических экспериментов.

ОСОБЕННОСТИ ПРОБОПОДГОТОВКИ БИОМАТЕРИАЛА

Основные аспекты корректной процедуры забора крови у лабораторных животных отражены в статье, опубликованной авторами ранее [1]. В настоящем разделе представлены особенности надлежащего проведения биохимических и патоморфологических исследований.

Приготовление образцов для биохимического анализа

Объем исследования определяется задачами эксперимента, при анализах обязательно использование сертифицированного и поверенного оборудования².

Пробы для клинико-биохимического анализа отбирают в пробирки для отделения сыворотки/плазмы. Пробирки несколько раз переворачивают для полного контакта с клот-активатором/антикоагулянтом. Пробы выдерживают в течение 10–15 ми-

нут при комнатной температуре, после чего их центрифугируют для отделения сыворотки/плазмы в соответствии с условиями, указанными производителем пробирки. Сыворотку/плазму удаляют с помощью полипропиленовой пипетки и помещают в предварительно промаркированную полипропиленовую пробирку с завинчивающейся крышкой. Если сыворотка/плазма должна храниться для последующего анализа, то пробу следует немедленно заморозить при температуре ниже -15°C .

Сбор мочи

Минимальный объем анализов мочи в токсикологическом эксперименте предполагает определение суточного диуреза, кислотности, плотности, содержания белка, глюкозы, кетонов, мочевины и креатинина, а также микроскопическую оценку осадка.

Метод сбора и хранения образцов мочи может повлиять на результаты, поэтому свежий образец всегда более предпочтителен для анализа, если не требуется измерение суточного объема мочи. Исследование общего объема, цвета, мутности, кислотности и плотности рекомендуется проводить непосредственно после сбора мочи.

Методы сбора мочи, зачастую рутинно используемые в токсикологических исследованиях, примитивны и плохо поддаются стандартизации, поэтому анализы часто проводятся простыми качественными методами с использованием индикаторных полосок.

Для проведения более точных количественных анализов мочу собирают с помощью специальных (метаболических) клеток. В случае если необходимо собрать определенный по объему образец мочи (например, 12-, 16- или 24-часовой период), для сохранения биоматериала рекомендуется обкладывать льдом контейнеры для сбора мочи или использовать консервант.

Для получения свежей мочи используют эвтаназию или специальные манипуляции с животными, подробно описанные в специальной литературе [2, 3].

Отбор и подготовка тканей для микроскопического исследования

При выборе тканей для микроскопической оценки следует ориентироваться на нормативные документы³. Общий список органов и тканей представлен в таблице 1.

Плановое патологоанатомическое вскрытие при токсикологических исследованиях должно проводиться в течение 5–10 минут после эвтаназии животного. Необходимо тщательно осматривать

¹ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 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.

³ Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть 1. М.: Гриф и К; 2012.

Таблица 1. Перечень органов и тканей для микроскопического исследования

Table 1. Organs and tissues for microscopic examination

Наименование системы органов, тканей	Наименование органа
Органы нервной системы	Головной мозг, спинной мозг
Органы системы кровообращения	Сердце, аорта
Органы дыхательной системы	Легкие, трахея
Органы системы пищеварения	Пищевод, желудок, кишечник (тощая, толстая кишка), печень, поджелудочная железа
Органы выделительной системы	Почки, мочевой пузырь
Органы репродуктивной системы	Семенники, придатки семенников, яичники, матка
Эндокринная система органов	Надпочечники, щитовидная железа с участками паращитовидной железы, островки Лангерганса поджелудочной железы
Органы иммунной системы	Селезенка, тимус, лимфатические узлы
Опорно-двигательный аппарат	Кости, скелетные мышцы
Ткани, примыкающие к местам введения препаратов	Участки кожи с подкожной клетчаткой, скелетной мускулатуры, периферических кровеносных сосудов (при парентеральном введении), органов системы пищеварения (при пероральном введении)

каждый орган до помещения его в емкость с фиксирующим раствором. Такой алгоритм действий позволит уже на этапе патологоанатомического вскрытия выявить все макроскопические изменения органов и тканей.

Даже небольшое отклонение от стандартного протокола, будь то патологоанатомическое вскрытие, отбор и фиксация образцов, их обезвоживание, проводка, заливка и дальнейшая подготовка к микроскопии, на любом этапе может привести к порче материала и, как следствие, к ошибочным выводам⁴.

Отбор органов и тканей. В ходе проведения патологоанатомического вскрытия органы и ткани экспериментальных животных визуализируют, отделяют от тушки, взвешивают, разрезают остроконечным скальпелем и снова визуализируют по поверхности разреза, помещают в емкость с фиксирующей жидкостью⁵. Для фиксации в формалине отбирают фрагменты тканей из типичных пораженных тканей, а при наличии изменений — участки со здоровой тканью⁶.

При отборе органов дыхательной системы, как правило, проводят плавательную пробу легких (проба Галена)⁷. Иногда легкие и трахею подвергают перфузии путем введения 10 % забуференного формалина (примерно 4–8 мл для крыс) до полного заполнения легких.

При отборе органов системы выделения поверхности почек визуализируют. Затем левые почки

рассекают по сагиттальной плоскости, а правые — по фронтальной и фиксируют.

В случае, когда патологоанатомическое вскрытие проводят после перорального введения исследуемого препарата, для макроскопической оценки состояния слизистой пищевода, желудка и кишечника их рассекают ножницами по всей толщине, промывают и визуализируют. После осмотра органы желудочно-кишечного тракта фиксируют.

Если патологоанатомическое вскрытие проводят после парентерального введения исследуемого препарата, то органы желудочно-кишечного тракта подвергают перфузии 10 % нейтральным забуференным формалином, что положительно влияет на качество и скорость фиксации слизистой. Затем помещают в фиксирующий раствор.

Фиксация образцов тканей. Фрагменты органов и тканей, отобранные в ходе патологоанатомического вскрытия для дальнейшего микроскопического исследования, необходимо зафиксировать с целью закрепления тканевых структур в том состоянии, в каком они находились в момент погружения в фиксирующий раствор, а также предохранения их от разрушения⁸.

При фиксации важно соблюдать объемные соотношения ткани и фиксатора. Объем фиксирующего раствора должен как минимум в 20 раз (лучше в 40 раз) превышать объем всех фиксируемых объектов. Малый объем фиксирующего раствора может заметно снизить качество получаемых

⁴ Jacobson-Kram D, Keller KA, eds. Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Informa Healthcare USA; 2006. Haschek WM, Wallig MA, Rousseaux C, eds. Fundamentals of toxicologic pathology. Elsevier; 2010.

⁵ Пальцев МА, Коваленко ВЛ, Аничков НМ. Руководство по биопсийно-секционному курсу: Учебное пособие. М.: Медицина; 2002.

⁶ Hodgson E, ed. A textbook of modern toxicology. John Wiley & Sons; 2004.

⁷ Жаров АВ, Иванов ИВ, Стрельников АП. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных. Учебное пособие для высших учебных заведений. М.: КолосС; 2003.

⁸ Меркулов ГА. Курс патологогистологической техники. Л.: Медицина; 1969.

микропрепаратов. Для предотвращения прилипания фрагментов тканей к стенкам и дну в контейнер кладут кусок скомканной марли или вату. Прилипшие объекты плохо фиксируются и могут стать непригодными для дальнейшей работы.

Температура, при которой проводится фиксация, в большинстве случаев не должна превышать 18–20 °С. Более высокая температура, например 37–40 °С (термостат), хотя и ускоряет диффузию фиксирующей жидкости, может провоцировать процессы аутолиза в глубине объекта.

Для того чтобы обеспечить полную фиксацию, толщина образцов, иссекаемых из твердых тканей, таких как печень и селезенка, не должна превышать 0,5 см. Если фиксирующая жидкость после погружения в нее образцов тканей мутнеет или изменяет свой цвет из-за окрашивания кровью, то ее непременно заменяют свежей. Однажды использованный фиксатор не употребляют повторно.

Многие морфологи употребляют сложные фиксирующие смеси, однако вопрос о качестве и составе фиксатора решается практически каждым экспериментатором в зависимости от задач исследования. Для различных видов тканей рекомендовано выбирать различные фиксирующие растворы, такие как 10 % забуференный формалин, 4 % параформальдегид, этиловый спирт, жидкости Буэна, Карнуа, Орта и другие⁹. Фиксирующие растворы применяются в строгом соответствии со стандартными операционными процедурами, утвержденными для конкретной лаборатории.

Подготовка к микротомированию, микротомирование, окраска. Иссечение тканей, извлеченных из фиксирующих растворов, проводят в вытяжном шкафу. Во время иссечения необходимо захватывать все отмеченные при патологоанатомическом вскрытии измененные или поврежденные участки тканей, чтобы микропрепараты получились в полной мере репрезентативными. Повреждения или аномалии, обнаруженные на этапе иссечения, отражаются в соответствующем разделе протокола. Образцы тканей помещаются в предварительно промаркированные кассеты.

Для дальнейшего микротомирования фиксированные образцы необходимо уплотнить. Для этого используют заливку в парафин (парафиноподобные смеси), целлоидин или заморозку. Перед заливкой в парафин образцы тщательно обезживают, поэтапно проводят через специальные жидкости, подготавливающие ткани к пропитке парафином (хлороформ, ксилол, изопропиловый спирт и другие), затем пропитывают парафином и заливают в гистологические кассеты.

Для тканей, заливаемых парафином, в гистологических лабораториях широко используются

полностью автоматизированные приборы для обработки тканей¹⁰. В качестве реагента, подготавливающего ткани к пропитке парафином, в последнее время широкое распространение получил изопропанол. Протокол обработки образцов перед заливкой должен быть специфичным для каждого вида животных и/или размера органов и типа ткани. Температура парафина, изменение реагента, номер исследования, количество кассет и дата обработки должны быть задокументированы. Схема заливки ткани должна учитывать размер и консистенцию образца и быть направлена на максимальное восстановление тканей для последующей микроскопической оценки.

После заливки образцов парафином производится микротомирование. Микротомирование осуществляется с помощью современных микротомов с использованием одноразовых лезвий. Толщина срезов, как правило, варьирует от 4 до 6 мкм. Срезы помещают на тонкие предметные стекла с адгезивным покрытием. После просушки микропрепараты помещаются в лотки, сосуды Хеллендахаля или другие емкости для окрашивания. Окраску ведут общими методами (например, гематоксилин-эозином) или иначе в соответствии с задачами исследования [4]. Реагенты и красители, используемые во время окрашивания, должны регулярно обновляться. Окрашенные микроскопические препараты покрывают монтирующими средами (Канадский бальзам, Био Маунт, Маунт Лейка и др.), а затем покровными стеклами соответствующего размера и размещают на лотки/площадки для сушки и контроля маркировки. Готовые гистопрепараты микроскопируют в проходящем свете.

ОСОБЕННОСТИ ПРОВЕДЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ

Биохимические исследования

Сыворотка/плазма крови. Основная функция биохимического анализа сыворотки/плазмы в доклинических исследованиях лекарственных средств заключается в определении потенциальных органов-мишеней токсического действия препарата и оценке времени действия и обратимости этого повреждения без биопсии соответствующих тканей/органов или некропсии. Гистопатологические исследования подтверждают клинические и биохимические признаки патологии.

Основные показатели биохимического анализа крови, определяемые в токсикологических исследованиях: глюкоза, альбумин, общий белок, аланинаминотрансфераза, аспаргатаминотрансфераза, креатинин и мочевины¹¹. В исключительных случаях дополнительно определяют калий, натрий, кальций, хлориды, фосфор, холестерин, а также

⁹ Сапожников АГ, Доросевич АЕ, ред. Гистологическая и микроскопическая техника: Руководство. Смоленск: САУ; 2000.

¹⁰ Rolls GO. 101 steps to better histology — a practical guide to good histology practice. Leica Microsystems; 2008.

¹¹ Камышников ВС, ред. Методы клинических лабораторных исследований. М.: МЕДпресс-информ; 2016.

некоторые маркеры повреждения печени, такие как щелочная фосфатаза, желчные кислоты, гамма-глутамилтрансфераза, сорбитдегидрогеназа и 5'-нуклеотидаза (табл. 2)¹².

В некоторых случаях, когда сразу несколько органов содержат достаточно высокое количество одного и того же фермента, но в разных изоферментных формах, повышение его уровня не всегда указывает на конкретный орган-мишень, который подвергается токсическому воздействию. В качестве примеров можно привести лактатдегидрогеназу (печень, мышцы, сердце), аспартатаминотрансферазу (печень, мышцы, эритроциты) и креатинфосфокиназу (печень, мышцы)¹³.

Моча. Показатели, измеряемые при анализе мочи, — суточный диурез, кислотность, плотность, белок, глюкоза, кетоны, мочевины и креатинин, а также микроскопическая оценка осадка — в основном характеризуют почечную функцию и могут помочь при идентификации химической индуцированной нефротоксичности (табл. 3)¹⁴ [5].

Микроскопический анализ

Оценка клеточной морфологии органов и тканей является основополагающей в токсикологическом эксперименте, поскольку позволяет выявить повреждения, определить их биологическое значение и основные характеристики. Для адекватной

Таблица 2. Основные показатели биохимического анализа крови и их описание

Table 2. Key biochemistry parameters and their description

Показатель	Описание	Трактовка результатов
Глюкоза	Основной экзо- и эндогенный субстрат энергетического обмена	Содержание глюкозы в сыворотке определяется сложным взаимодействием гормонов, таких как глюкагон, инсулин, кортизол и адреналин. Забор крови для определения глюкозы следует по возможности осуществлять натощак. Причины повышенной концентрации глюкозы в сыворотке крови: забор крови после приема корма животными, сахарный диабет, гиперадренкортицизм, состояние агонии, воздействие экзогенных глюкокортикоидов и морфина, а также длительный стресс. Снижение концентрации глюкозы может быть результатом употребления этанола, печеночной недостаточности, дефицита гормона роста, глюкокортикоидов и глюкагона. В результате гипогликемии могут возникнуть тяжелые и, возможно, необратимые дисфункции центральной нервной системы. Клинические признаки гипогликемии включают нарушения поведения экспериментальных животных, атаксию и судороги, которые могут прогрессировать вплоть до терминального состояния и последующей гибели
Белки крови		В плазме идентифицируются около трехсот белков. За исключением белковых гормонов и иммуноглобулинов большинство белков плазмы синтезируется в печени с индивидуальной скоростью и выполняет функции коллестеролевых факторов, факторов свертывания, анионов в кислотно-щелочном балансе и переносчиков для витаминов, гормонов, жиров, свободного гемоглобина и свободного билирубина. Как правило, в плазме измеряют общий уровень белка и альбумин
Альбумин	Самый распространенный белок плазмы крови, основной фактор, определяющий онкотическое давление плазмы	Как правило, общая концентрация сывороточных белков находится в прямой зависимости от концентрации сывороточного альбумина. Хотя гипоальбуминемия наблюдается только при обезвоживании, гипергаммаглобулинемия, гиперфибриногенемия, гипоальбуминемия (и гипопроteinемия) широко распространены при многих болезненных состояниях и могут являться результатом нарушения синтеза (заболевания печени), увеличения катаболизма (повреждение тканей), снижения абсорбции (пониженное кормление), потери белка (гломерулонефрит, энтеропатия с потерей белка, ожог кожи) или измененный распределения (асцит)
Аминотрансферазы: аланинаминотрансфераза (АЛТ) и аспартатаминотрансфераза (АСТ)	АЛТ и АСТ катализируют перенос аминокетильной группы от аланина или аспартата к оксоглутарату с образованием L-глутамата. Присутствуют в цитозоле гепатоцитов и при изменении проницаемости плазматической мембраны попадают во внеклеточную жидкость, таким образом являясь индикаторами повреждения гепатоцитов	У лабораторных животных АЛТ является специфическим индикатором повреждения или заболевания печени, в то время как АСТ содержится в печени и мышцах, в том числе в миокарде. Эти ферменты высвобождаются из цитозоля клеток при изменении проницаемости плазматической мембраны, что может быть результатом пониженной подачи кислорода в печень, прямого воздействия токсинов, лекарственных препаратов или химических веществ, а также воспаления и/или жирового перерождения. В целом, увеличение уровня АЛТ при повреждении или заболевании печени более выражено, чем увеличение уровня АСТ, что обусловлено, в частности, присутствием некоторого количества АСТ в митохондриях гепатоцитов. Кроме того, повышенный уровень АЛТ сохраняется дольше, чем уровень АСТ (период полураспада обоих ферментов в плазме крови составляет от 2 до 4 дней). Повышение уровня АЛТ и АСТ прямо пропорционально количеству поврежденных гепатоцитов, что, однако, не дает информации об обратимости изменений. Это также верно для повышения уровня АСТ при поражении мышц или повреждении миокарда

¹² Williams PL, James RC, Roberts SM, eds. Principles of toxicology: environmental and industrial applications. John Wiley & Sons; 2000. Gad SC, ed. Animal models in toxicology. Taylor & Francis Group; 2006.

¹³ Карпищенко АИ, ред. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. М.: ГЭОТАР-Медиа; 2012.

¹⁴ Там же.

Показатель	Описание	Трактовка результатов
Мочевина	Мочевина является основным азотсодержащим метаболитическим продуктом катаболизма белков и синтезируется в печени. Небольшое количество мочевины также абсорбируется из толстого кишечника	Путем выведения мочевины является почечная экскреция. Процесс выведения мочевины активизируется, если ее концентрация в фильтрате слишком высока. В зависимости от скорости клубочковой фильтрации (прямо пропорционально) мочевина пассивно диффундирует водой из канальцевого просвета обратно в кровь. Предпочтительным методом анализа азота мочевины в сыворотке крови является метод уреазы с глутаматдегидрогеназой (парная ферментная система), с помощью которого измеряется уменьшение оптической плотности в результате реакции глутаматдегидрогеназы. Увеличение азота мочевины в крови характеризуется как преренальная, ренальная и постренальная азотемия. Причиной увеличения концентрации азота мочевины в крови при преренальной азотемии является увеличение катаболизма белков (например, повреждение тканей, лихорадка) или снижение почечной перфузии (например, обезвоживание, шок, сердечно-сосудистые нарушения), при этом уровень сывороточного креатинина остается нормальным. Ренальная азотемия возникает, когда не функционируют примерно 75 % нефронов, при этом сывороточный креатинин и азот мочевины увеличиваются. Затруднения с оттоком мочи приводят к постренальной азотемии, при которой также наблюдается увеличение обоих показателей, однако увеличение азота мочевины непропорционально выше
Креатинин	Креатинин образуется в результате спонтанного неферментативного превращения свободного креатина в мышцах	Приблизительно от 1 до 2 % мышечного креатина ежедневно превращается в креатинин, и количество эндогенного креатинина пропорционально мышечной массе. Уровень креатинина наряду с уровнем азота мочевины в крови может свидетельствовать о заболеваниях почек, непроходимости мочевыводящих путей. Он свободно фильтруется через клубочки, однако небольшое количество поглощается почечными канальцами, а также выделяется проксимальными канальцами. Повышение уровня креатинина в крови возникает при снижении клубочковой фильтрации. Уровень креатинина также повышается при пониженной почечной перфузии. Клиренс креатинина также измерим и считается точным показателем скорости клубочковой фильтрации

Таблица 3. Основные показатели, определяемые при анализе мочи, и их описание

Table 3. Key parameters of urine analysis and their description

Показатель	Трактовка результатов
pH	Значение pH в моче не отражает нормальную физиологическую ситуацию, так как растворенный диоксид углерода (CO ₂) рассеивается в период сбора, что приводит к повышению pH. Если значение pH выходит за пределы диапазона 6,0–7,0, то изменения, скорее всего, связаны с методом отбора проб
Глюкоза	Увеличение глюкозы в моче может быть связано с сахарным диабетом, обширной травмой, воздействием экзогенных стероидов, инфекциями или феохромоцитомой (опухоль надпочечников)
Кетоны	Наличие кетонов (ацетона и ацетоуксусной кислоты) определяется в моче только качественно, его связывают с сахарным диабетом, длительным голоданием, длительной рвотой или низкоуглеводной диетой
Плотность	Шерсть, перхоть, экскременты и пыль, которые иногда встречаются в моче вследствие нарушения методики отбора проб, ложно увеличивают ее плотность. Этот показатель является грубым индикатором концентрирующей способности почек (осмотическое давление) и может изменяться при некоторых типах нефротоксичности
Микроскопическое исследование	Микроскопическое исследование осадка мочи позволяет обнаруживать эпителиальные клетки, бактерии, цилиндры, эритроциты, лейкоциты и кристаллы. Необходимо учитывать, что при отсутствии консерванта наблюдается рост бактерий в моче в период ее сбора и хранения. Обнаружение цилиндров в осадке мочи свидетельствует о поражении почечных канальцев. Кристаллы служат сигналом риска возникновения камней в почках и/или мочевом пузыре. Обнаружение эритроцитов в осадке мочи свидетельствует о повреждении слизистой оболочки мочевого пузыря или уретры. Лейкоциты появляются в осадке мочи в случаях воспалительных процессов различного генеза в почках, мочевом пузыре, мочеточнике или уретре

оценки макро- и микроскопической картины следует различать изменения, вызванные исследуемым препаратом, от вторичных изменений, спонтанных заболеваний, посмертных изменений и нормальных биологических вариаций¹⁵.

В исследованиях краткосрочной токсичности микроскопический анализ используется для выявления органов-мишеней, общей токсичности препарата и внесения ясности в механизм действия исследуемого препарата. Во многих случаях эта

¹⁵ Афанасьев ЮИ, Кузнецов СЛ, Юрина НА. Гистология, цитология и эмбриология. М.: Медицина; 2012. Саркисов ДС, Перов ЮЛ, ред. Микроскопическая техника. Руководство для врачей и лаборантов. М.: Медицина; 1996. Derelanko MJ, Hollingek MA, eds. Handbook of Toxicology. CRC Press LLC; 2002.

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

Table 4. Main biochemical reference values for mice, rats and rabbits

Показатель, единицы измерения	Мыши	Крысы	Кролики
Глюкоза, мг/дл	81–165	100–175	100–160
Общий белок, г/дл	4,0–6,0	♂6,2–7,8 ♀6,5–8,5	5,4–6,6
Альбумин, г/дл	2,5–4,2	♂3,3–4,2 ♀3,5–4,7	3,8–5,0
Аланинаминотрансфераза (АЛТ), МЕ/л	25–100	10–50	25–70
Аспаратаминотрансфераза (АСТ), МЕ/л	64–180	45–100	20–25
Мочевина, мг/дл	15–35	12–20	10–20
Креатинин, мг/дл	0,2–0,8	0,3–0,9	1,0–1,6

информация используется в подборе дозы для более детальных и продолжительных исследований.

В продолжительных исследованиях гистолог должен уделить внимание реакциям тканей экспериментальных животных в сравнении с контрольными животными. Также необходимо отличать изменения, вызванные воздействием испытуемого препарата, от спонтанных изменений под влиянием окружающей среды, возрастных, половых, сезонных и других естественных колебаний¹⁶ [6].

Различия между прямыми и косвенными воздействиями должны определяться путем интеграции всей имеющейся информации, полученной с помощью гематологических, клинико-биохимических методов, а также методов морфологии и гистологии.

Референсные значения

На значения показателей биохимического исследования крови влияет ряд переменных, среди которых вид, пол, возраст, условия содержания в клетке, условия окружающей среды, рацион, тощачный статус — натощак или после приема корма, методика отбора пробы крови, использование анестезии, методика анализа, используемый анализатор и др.¹⁷ В этой связи подчеркнем важность проведения всех манипуляций с животными испытуемых и контрольных групп в одинаковых условиях эксперимента.

В таблице 4 представлены диапазоны референсных значений биохимических показателей крови для животных, наиболее часто использующихся в токсикологических экспериментах возрастов: 20 недель для мышей и крыс и 5 месяцев для кроликов¹⁸. Как правило, влияние половой принадлежности либо минимально, либо неочевидно при изучении клинической патологии лабораторных животных. Там, где существуют значительные различия, представлены значения для обоих полов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Надлежащее проведение доклинического исследования хронической токсичности потенциальных лекарственных средств является крайне важным, поскольку данные, полученные в результате таких исследований, играют определяющую роль при принятии решения о стратегии дальнейшей разработки препарата и планировании его клинических исследований. Показатели, определяющиеся в ходе гематологических, биохимических и патоморфологических исследований, при правильной их интерпретации позволяют выявить органы-мишени токсического действия препарата, оценить динамику и обратимость эффектов, а также предоставить ценную информацию для заключения о соотношении риск-польза. В этой связи особое внимание следует уделять обеспечению качества проведения клинико-лабораторных исследований.

Согласованный анализ данных, полученных с помощью клинических, гематологических и биохимических методов, а также данных патологоанатомического вскрытия и микроскопического анализа органов и тканей экспериментальных животных, описанный в стандартизированной форме, обеспечивает презентацию корректных выводов о доклинической безопасности нового лекарственного средства.

При изучении гематологических показателей и при оценке клинических биохимических параметров специалист должен быть осведомлен о соответствующих методах забора и обработки крови, времени забора, выборе методов, контроле качества выполненных работ и интерпретации результатов тестирования, а также нормальной физиологии лабораторных животных и ее влиянии на клинико-биохимические параметры. В связи с необходимостью разносторонней оценки наблюдаемых явлений

¹⁶ Haschek WM, Wallig MA, Rousseaux C, eds. Fundamentals of Toxicologic Pathology. Elsevier; 2010.

¹⁷ Макаров ВГ, Макарова МН, ред. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы экспериментальных животных. Справочник. СПб.: ЛЕМА; 2013.

¹⁸ Jacobson-Kram D, Keller KA, eds. Toxicological testing handbook: principles, applications, and data interpretation. Informa Healthcare USA; 2006.

при изучении хронической токсичности потенциальных лекарственных средств целесообразно включение в исследовательскую команду лекарственных токсикологов разных направлений: специалистов в области физиологии и патологии лабораторных животных, экспериментальных гематологов и биохимиков, патоморфологов и гистопатологов.

В ходе эксперимента лекарственный токсиколог, оценивающий клиническое состояние экспериментальных животных, а также токсиколог-патоморфолог, осуществляющий патологоанатомическое вскрытие, совместными усилиями устанавливают связь между обнаруженными прижизненными и посмертными изменениями. Анализ полученных результатов базируется на данных общей клинической картины, потреблении корма и воды, динамике массы тела, результатах гематологических, биохимических исследований, данных патологоанатомического вскрытия и микроскопического исследования внутренних органов. При этом учитываются контрольные данные, а также данные исторического контроля.

Патологоанатомическое вскрытие должно проводиться специалистом, прошедшим обучение процедуре вскрытия лабораторных животных, выявлению поражений и документированию полученных результатов. Патологоанатом, наблюдающий посмертные изменения, оценивает их биологическую значимость в зависимости от характера патологии и в сочетании с данными клинических

и лабораторных исследований. Важно отличить наблюдаемые общие и клеточные морфологические изменения, вызванные исследуемым препаратом, от вторичной патологии, спонтанной патологии, посмертных расстройств и нормальной биологической изменчивости.

Таким образом, только согласованные действия лекарственных токсикологов, владеющих широким арсеналом методов, обеспечивают сбор материала для описания картины интоксикации, вызванной лекарственным препаратом, и составления итогового заключения, подкрепленного корректными выводами и рекомендациями, для дальнейшей клинической апробации нового лекарственного средства.

В заключение отметим, что, несмотря на токсикологический контекст настоящей статьи, приведенная методология с некоторыми правками может также быть использована в качестве методических рекомендаций в лабораториях, занимающихся 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. Сорочкина 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. [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. (In Russ.)] <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-3-197-206>
2. Vap LM, Shropshire SB. Urine cytology: collection, film preparation, and evaluation. *Vet Clin North Am Small Anim Pract*. 2017;47(1):135–49. <https://doi.org/10.1016/j.cvsm.2016.07.009>
3. Kurien BT, Everds NE, Scofield RH. Experimental animal urine collection: a review. *Lab Anim*. 2004;38(4):333–61. <https://doi.org/10.1258/0023677041958945>
4. Slaoui M, Bauchet AL, Fiette L. Tissue sampling and processing for histopathology evaluation. *Methods Mol Biol*. 2017;1641:101–14. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7172-5_4
5. Wu H, Huang J. Drug-induced nephrotoxicity: pathogenic mechanisms, biomarkers and prevention strategies. *Curr Drug Metab*. 2018;19(7):559–67. <https://doi.org/10.2174/1389200218666171108154419>
6. Taqi SA, Sami SA, Sami LB, Zaki SA. A review of artifacts in histopathology. *J Oral Maxillofac Pathol*. 2018;22(2):279. https://doi.org/10.4103/jomfp.JOMFP_125_15

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 02.07.2019

После доработки 27.08.2019

Принята к печати 19.11.2019

Article was received 2 July 2019

Revised 27 August 2019

Accepted for publication 19 November 2019