

*Кручинина А.Д.,*

*кандидат биологических наук, доцент*

*доцент кафедры «Общая биология и биохимия»*

*Пензенский Государственный университет*

*Россия, г. Пенза*

*Файзулина А.Н.,*

*студент*

*4 курс, факультет «Физико-математических и естественных наук»*

*Пензенский государственный университет*

*Россия, г. Пенза*

*Лобачев А.Ю.,*

*студент*

*4 курс, факультет «Физико-математических и естественных наук»*

*Пензенский государственный университет*

*Россия, г. Пенза*

**ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВНУТРЕННИХ  
ОРГАНОВ ЖИВОТНЫХ В РАМКАХ ДОКЛИНИЧЕСКИХ  
ИССЛЕДОВАНИЙ БЕЗОПАСНОСТИ ЛЕКАРСТВ**

*Аннотация:* Лабораторно-клинические исследования, в частности патоморфологические, являются значительной частью плана изучения хронической токсичности, представляющей собой общую токсикологическую оценку допустимых лекарственных препаратов. Выбор методических подходов к овладению токсикологическими описаниями потенциальных лекарственных средств дает возможность понять степень риска их предстоящего клинического использования, определить возможные органы-мишени, степень повреждения и вероятность их восстановления. Цель

*работы — рассмотреть сведения об организации и последовательности проведения патоморфологических исследований.*

**Ключевые слова:** *лабораторно-клинические исследования, хроническая токсичность, патоморфологические исследования.*

**Abstract:** *Laboratory and clinical studies, in particular pathological, are a significant part of the study program for chronic toxicity, which is a general toxicological assessment of acceptable drugs. The choice of methodological approaches to mastering toxicological descriptions of potential drugs makes it possible to understand the degree of risk of their forthcoming clinical use, to determine possible target organs, the degree of damage and the likelihood of their recovery. The purpose of the work is to consider information about the organization and sequence of pathomorphological studies.*

**Key words:** *laboratory and clinical studies, chronic toxicity, pathomorphological studies.*

Патологоанатомическое вскрытие при токсикологических исследованиях животных после эвтаназии осуществляется в течение 10 минут [1, с. 128]. Следует внимательно осмотреть органы до погружения их в емкость с фиксатором, для выявления макроскопических изменений в тканях и органах. После забора материала дальнейшая подготовка исследования включает в себя фиксацию материала, проводку (обезвоживание парафином), заливку (уплотнение биологического материала), приготовление срезов, окрашивание фиксированных гистологических объектов, а также помещение срезов в монтирующую среду. При минимальном несоответствии от стандартного протокола на любом из этапов проведения исследования может вызвать повреждение материала и вести к ложным результатам.

В процессе осуществления патологоанатомического вскрытия удаление из органов животного кусочков ткани, следует выполнять острым инструментом, для того, чтобы не деформировать материал. Кусочки стенок

полого органа удобнее сначала заранее разрезать на пласты затем вырезать кусочек таким образом, чтобы в готовом препарате были видны все слои стенки. Для фиксации в формалине отбирают фрагменты тканей из типичных участков, а при наличии изменений — участки пораженной ткани, а также участки, граничащие со здоровой тканью [2, с.279]. При отборе органов дыхательной системы, как правило, проводят плавательную пробу легких (проба Галена). Иногда легкие и трахею подвергают перфузии путем введения 10 % забуференного формалина (примерно 4–8 мл для крыс) до полного заполнения легких. Если отбор предстоит из органов системы выделения, то правые почки разделяют по фронтальной плоскости, а левые по сагиттальной.

Заложив исследуемый биологический материал в кассету, помещают ее в емкость с фиксатором для предотвращения разрушения клеток и структуры ткани. Основным фиксатором для хранения биологического материала, для гистологического исследования является 10% нейтральный формалин. Его принцип действия основан на том, что происходит гибель клеток и сгущение белков. Емкость с формалином крепко закрывают, чтобы предотвратить его испарение и высыхание биологического материала.

В процессе фиксации образцов тканей имеет значение соблюдение соотношения ткани с фиксирующим раствором. Оптимальная температура, для проведения процесса фиксации 20°C, потому что высокая температура в пределах 40°C не исключено, что сможет привести саморастворению мёртвых клеток и тканей под влиянием их собственных гидролаз, которые разрушают структурные молекулы [7, с. 275].

Следующим этапом изготовления гистологического препарата является проводка – это процесс обезвоживания кусочка ткани и пропитки его парафином. Это обеспечивает уплотнение ткани, для получения срезов без складок и разрывов. Для обезвоживания применяют батарею спиртов, состоящую из 96%-ного изопропилового спирта и ксилола. Длительность

процесса в среднем составляет 48 часов в зависимости от размера, количества материала и качества.

Далее идет заливка материала – процесс создания твердого блока, чтобы быть пригодным для получения срезов нужной толщины. Суть процесса заключается в заливке куска ткани жидким парафином – предельным высокомолекулярным углеводородом. Для начала биологический материал кладут в тару с парафином на ночь, затем во вторую тару на 1,5 часа и в третью тару с парафином тоже на 1,5 часа. После берут кассету и в нее заливают расплавленный в термостате парафин, кладут материал на него и сверху накладывают кассету, также еще раз капают парафин. Готовый материал кладут в холодильник на 2 часа (можно на ночь).

Приготовление гистологических срезов - следующий этап изготовления гистологического препарата. Микротомирование – это изготовление тонких срезов на микротоме. Толщина срезов должна быть примерно 5-6 мкм. Суть процесса заключается в том что, парафиновый блок зажимают в объектодержатель. Нужный угол наклона ножа устанавливают опираясь на плотность ткани. Сначала устанавливают микрометрическую шкалу, на получение толстых срезов с толщиной 20 мкм, затем переводят шкалу на 8 мкм и начинают резать материал. С помощью кисточки снимают срезы с блока и расправляют их на предметном стекле путем аппарата для сушки и расправления гистологических срезов. На стекло наносят пипеткой каплю воды и опускают туда срез. На столике для сушки срезов заранее выбирают температуру равную 40,1° С.

Депарафинирование срезов – это процесс, который направлен на удаление парафина. Препараты помещают в раствор ксилола и спирта, однако ксилол является опасным растворителем, поэтому его заменяют на минеральное масло. Наводнив, образец помещают сначала в минеральное масло на 10 минут. Далее в 96%-ный изопропиловый спирт на 5 минут.

Переносят штатив для промывания в дистиллированную воду на 5 минут, после этого депарафинированные препараты готовы к окрашиванию.

Далее идет окрашивание фиксированных гистологических объектов. Гистологическая окраска красителями позволяет выявить структуру ткани за счет разного химического сродства ее элементов. Широко используемым методом окрашивания является гематоксилин Майера и эозин, так как сочетает основной и кислый красители. Выявляет не только клетки, но и многие внеклеточные структуры. Гематоксилин окрашивает клеточные ядра в ярко синий цвет, а эозин другие клеточные детали, цитоплазму и межклеточное вещество в желтовато-розовый цвет. Окрашивание: погружают срез в гематоксилин на 5 минут, далее держат в проточной воде три раза по 5 минут. Обмакнув в салфетке срез помещают в эозин на 30 секунд. Далее идет обработка среза спиртами, в каждом по 5 минут, сначала 70%-ным изопропиловым затем 96%-ным. После погружаем в минеральное масло на 5 минут и оставляем на 3 часа в салфетке.

Окрашивание соединительной и мышечной ткани проводят по методу Ван Гизона, где используется смесь пикриновой кислоты и кислого фуксина. Этот метод позволяет дифференцировать коллагеновые волокна от других частей соединительной и гладкомышечной ткани. Единственным недостатком метода является выцветание препаратов, поэтому их невозможно сохранить на длительный срок [5]. При применении этого метода ядра клеток окрашиваются в черный цвет, коллагеновые волокна в красный, а клетки гладкомышечной и поперечнополосатой ткани в желтый, но могут и вплоть до коричневого цвета. Техника окрашивания происходит таким образом: срезы погружают в гематоксилин Вейгерта (1:1) на 10 минут. Ополаскивают в проточной воде 10 минут по три раза. Помещают срезы на 5 минут в пикрофуксин и после истечения времени быстро споласкивают в течение 10 секунд в дистиллированной воде. Обрабатывают срез 70%-ным и 96%-ным

изопропиловым спиртом по 5 минут в каждой и переносят в минеральное масло на 5 минут, по окончании времени оставляют в салфетке на 3 часа.

Заключение препаратов в среды - это помещение окрашенного среза под покровное стекло с применением среды для заключения, оно обеспечивает сохранение окраски биологического объекта и его структуры. На этом этапе заканчивается изготовление гистологических препаратов. Для заключения срезов под покровное стекло используют специальную жидкость (мантирующую среду), количество которой рассчитывают таким образом, чтобы хватило на покрытие всей площади под покровным стеклом [4]. Препарат помещают на специальный планшет, кладут на покровное стекло груз для расплавления, в горизонтальном состоянии объект должен находиться 24 часа. В случае если нужно сильно прижать из-за значительной неровности поверхности препарата, то используют бельевые зажимы. Готовые гистологические препараты микроскопируют в проходящем свете.

Анализ клеточной морфологии органов, а также тканей в токсикологическом опыте дает возможность обнаружить повреждения и определить их биологическую функцию и особенности свойств. Для того, что разумно оценить результаты микроскопического анализа нужно видеть различия между изменениями, которые вызвал изучаемый препарат от неожиданных заболеваний, также от возрастных, половых изменений состояния. В длительных исследованиях стоит уделить внимание реакциям тканей экспериментальных животных по сравнению с контрольными животными [3]. А при проведении коротких исследований токсичности микроскопический анализ определяет органы, подверженные морфологическим изменениям и вносит точность в механизм влияния исследуемого лекарственного препарата [6].

Получение результатов при проведении доклинических исследований хронической токсичности возможных лекарственных препаратов имеют огромное значение для дальнейшей разработки лекарственных средств,

планировании его клинических исследований. Определяющие в процессе патоморфологических изучений результаты способствуют определить органы с морфологическими изменениями токсичного действия препарата, посмотреть динамику и дать необходимый материал для вывода о соотношении риска с пользой. Необходимо уметь различать клеточные и общие морфологические изменения в клетках и тканях, вызванные препаратом, которым было проведено исследование от неожиданного заболевания, вторичных отклонений. На качество результатов полученных в исследованиях влияет точность и чистота выполнения анализа, отбор биологического материала и пробоподготовка. Для соответствующего объяснения результатов, полученных в процессе исследования необходимо принимать во внимание неустойчивость нормальной и патологической физиологии животных и возможного воздействия на основные параметры в определенных условиях токсикологического эксперимента.

#### **Использованные источники:**

1. Вахрушева Т.И. Патоморфологические методы исследования: учеб. пособие / Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2019. – 266 с.
2. Жаров А.В., Иванов И.В., Стрельников А.П.; Под ред. А.В. Жарова. Вскрытие и патоморфологическая диагностика болезней животных: Учеб. для студентов вузов, обучающихся по специальности "Ветеринария" / - М.: КолосС, 2003. - 397,с.
3. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике: в 2 т. / [В.В. Алексеев и др.]; под ред. А.И. Карпищенко. — 3-е изд., перераб. и доп. — Т. 1. — М. : ГЭОТАР-Медиа, 2012. — 472 с.
4. Меркулов Г.А. Курс патологогистологической техники. - 5-е изд., 1969. - 423 с.

5. Пальцев М.А., Коваленко В.Л., Аничков Н.М. Руководство по биопсийно-секционному курсу: Учебное пособие. — М.: Медицина, 2002. — 256 с.
6. Руководство по экспертизе лекарственных средств. Том I. — М.: Гриф и К, 2014 —328 с.
7. Сорокина А.В., Алексеева С.В., Еремина Н.В., Дурнев А.Д. Опыт проведения клинико-лабораторных исследований в доклинической оценке безопасности лекарств (часть 2: биохимические и патоморфологические исследования)/ А.В. Сорокина, С.В. Алексеева, Н.В. Еремина, А.Д. Дурнев. //Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2019;9(4): 272–279.