

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РФ
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего образования

ПЕНЗЕНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ

Факультет
физико-математических и
естественных наук

Кафедра
«Общая биология и биохимия»

Направление подготовки 06.03.01 Биология
Профиль подготовки Биохимия
Форма обучения очная

ВЫПУСКНАЯ КВАЛИФИКАЦИОННАЯ РАБОТА

на тему:

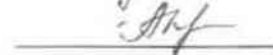
**«ИЗУЧЕНИЕ БИОХИМИЧЕСКИХ ПОКАЗАТЕЛЕЙ КРОВИ И
ПАТОМОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА ВНУТРЕННИХ ОРГАНОВ
ЛАБОРАТОРНЫХ ЖИВОТНЫХ В РАМКАХ ДОКЛИНИЧЕСКИХ
ИСПЫТАНИЙ ПЕПТИДНЫХ ПРЕПАРАТОВ»**

Студент



Файзулина Айсылу Наилевна

Руководитель



Кручинина А.Д.

Нормоконтролер



Клыченков С.В.

Работа допущена к защите (протокол заседания кафедры от 16.06.22 № 14)

Заведующий кафедрой



Карпова Г.А.

Работа защищена с отметкой отлично

(протокол заседания ГЭК от 23.06.22 № 7)

Секретарь ГЭК



Клыченков С.В.

Пенза, 2022

Содержание

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	7
1.1 Пептидные препараты и их применение	7
1.1.1 Пептидная фармакокинетика.....	8
2.1 Доклинические исследования пептидных препаратов	10
2.1.1 Возможные пути введения.....	14
2.1.2 Физиологические эффекты	15
2.1.3 Патоморфологическая оценка в доклинических исследованиях.....	17
3.1 Гематологические и биохимические показатели крови, применяемые для исследований в доклинической оценке безопасности лекарств	19
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	23
2.1 Методы гистологического исследования	23
2.1.1 Окраска гематоксилин-эозином	24
2.1.2 Окраска по методу Вейгер-Ван-Гизона.....	24
2.1.3 Трихромное окрашивание по Массону	25
2.1.4 Окрашивание кислым орсеином	26
2.2 Гематологические методы исследования	26
2.2.1 Окраска по Романоскому-Гимзе.....	26
2.2.2 Подсчет количества форменных элементов крови (лейкоцитов, эритроцитов) в камере Горяева	27
2.3 Биохимические методы исследования.....	28
2.3.1 Определение активности аминотрансфераз (АЛТ и АСТ) в сыворотке крови (метод Райтмана-Френкеля).....	28
2.3.2 Количественное определение содержания мочевины в сыворотке крови.....	29
2.3.3 Количественное определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови.....	29
2.3.4 Определение содержания общего белка в сыворотке крови биуретовым методом	29
2.3.5 Определение содержания альбумина в сыворотке крови колориметрическим методом с бромкрезоловым зелёным	30

2.3.6 Количественное определение активности гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови методом по конечной точке ...	30
2.3.7 Количественное определение содержания креатинина в сыворотке крови на основе реакции Яффе с депротеинизацией	30
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ	32
3.1 Результаты проведения массометрии внутренних органов экспериментальных животных и расчет их массовых коэффициентов	32
3.2 Результаты патоморфологической оценки внутренних органов животных опытной и контрольной групп	34
3.3. Результаты исследования основных показателей биохимического анализа крови лабораторных животных	45
3.4 Результаты исследования гематологических показателей опытной и контрольной групп	47
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	51
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ	53

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность исследования. Основная задача доклинического исследования — достоверный прогноз безопасности использования лекарственных препаратов. Проблема обнаружения токсических эффектов фармакологических средств в экспериментах остается актуальной, даже не смотря на то, что происходит постоянное развитие методических подходов, которые дают возможность понять степень риска их предстоящего клинического использования, определить возможные органы-мишени, степень повреждения и вероятность их восстановления. Нынешние нормы морали резко ограничивают проведение токсикологических исследований на высших животных, но тем не менее, на сегодняшнее время при выявлении безопасности новых лекарственных средств опыты на животных выбора других возможных решений не имеют. Огромная затрата времени, продолжительность, высокая стоимость исследований на животных делает существенно важным для нашего времени возрастание степени их информативности.

Нынешняя фармакология стремительно развивается и занимается производством действенных лекарственных средств, в основе которых имеются малотоксичные вещества, производством наноразмерных готовых лекарственных форм, которые гарантируют увеличение фармакологического действия и совершенствуют способность препарата усваиваться. С развитием вышеперечисленных направлений стали возникать проблемы в лекарственной токсикологии. К примеру, малотоксичные лекарственные вещества проявляют слабый токсический эффект, который посредством лабораторной диагностики выявить не удастся. Большие сложности появляются при определении различий в токсических эффектах схожих по строению фармакологических средств.

Лабораторно-клинические исследования, в частности патоморфологические, являются значительной частью плана изучения хронической токсичности, представляющей собой общую

токсикологическую оценку допустимых лекарственных средств. Но их возможности применяются не полностью. Следует отметить, что патоморфологические исследования оказывают содействие при обнаружении взаимосвязи между строением и способностью фармакологического вещества изменять состояния и функции живого организма. Также на их основе возможно предсказание токсических эффектов организма на введение препаратов, которые по классификации токсичности принадлежат к малотоксичным веществам.

В лекарственной токсикологии исследования структуры тканей нацелены на обнаружение биологических деструктивных процессов. Приспособительные реакции организма на повреждение тканей и органов на введение фармакологического вещества не учитываются. Проводя анализ компенсаторно-приспособительных процессов можно понять возможный механизм фармакологического действия препарата и на этапе доклинического исследования предсказать другие формы его фармакологической деятельности.

Все вышеупомянутое позволило выявить объект исследования, его цель и задачи.

Объектом исследования являются биохимические и гематологические показатели крови, морфологическое исследование внутренних органов.

Предмет исследования: возможное изменение биохимических, гематологических и морфологических показателей под воздействием пептидного препарата.

Цель работы — изучение биохимических показателей крови и патоморфологическая оценка внутренних органов лабораторных животных в рамках доклинических испытаний пептидных препаратов.

Для реализации поставленной цели выдвинуты следующие задачи:

1. Провести массометрию внутренних органов экспериментальных животных и рассчитать их массовые коэффициенты;

2. Изучить и провести сравнительное патоморфологическое исследование изменений внутренних органов экспериментальных животных под воздействием пептидного препарата;

3. Изучить методы определения биохимических показателей крови и провести их исследование, имеющее значение для оценки функционального состояния органов и тканей;

4. Исследовать и оценить тип проникающей способности токсического действия по гематологическим показателям экспериментальных животных при введении пептидного препарата.

Выпускная квалификационная работа написана на 60 листах, содержит 24 рисунка, 3 таблицы и список литературы на русском и английском языках из 65 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 Пептидные препараты и их применение

Пептиды – это многофункциональные биорегуляторы, которые контролируют большое количество биохимических процессов в любом живом организме [1].

Пептиды обладают очень широким спектром биологической активности. Есть гормоны, нейромедиаторы, соединения, регулирующие рост, нейропротекторы, модуляторы биохимических процессов, а также есть пептиды, контролирующие метаболизм, клеточные процессы и т.д. Кроме того, пептиды обеспечивают специфическую устойчивость живого организма к вмешательству болезней, что кажется действительно уникальным свойством по сравнению с другими соединениями. Химические, физические и, как следствие, биологические свойства пептидов можно легко модулировать практически неограниченными вариациями их первичных структур. Эти изменения привели к изменениям в таких свойствах, как токсичность, биораспределение, проницаемость клеточных мембран, устойчивость к ферментам и т.д., что позволяет разрабатывать лекарственные средства, обеспечивающие как желаемую биологическую активность, так и особенности их транспортировки к органам-мишеням.

Пептиды могут быть использованы при лечении различных заболеваний, включая эндокринные дисфункции, инфекционные заболевания, рак, расстройства центральной нервной системы и гастроэнтерологические заболевания. Пептиды часто лучше переносятся и могут обеспечить эффективное заместительное лечение; побочные эффекты связаны с их чрезмерной фармакодинамикой [43]. Кроме использования пептидов в роли лекарственных веществ, допустимо их использование в качестве биологических маркеров с диагностической целью и вакцин.

В настоящее время известно множество тысяч биологически активных пептидов, каждый из которых может стать основой для разработки новых

лекарственных средств. Терапевтические препараты на основе синтетических пептидов относятся к наиболее быстро развивающемуся классу лекарственных средств [59]. Стабильность, биологическая эффективность, фармакокинетический профиль и иммуногенность являются наиболее важными параметрами для разработки пептида в качестве терапевтического средства. Обычно считается, что пептиды являются плохими кандидатами на лекарственное средство из-за их более высокой склонности к быстрому метаболизму, а также низкой пероральной биодоступности. Концепция того, что эти препараты недоступны для приема внутрь, всегда подталкивает эти компании к разработке новых разнообразных производственных стратегий. Эти стратегии были направлены на снижение метаболизма этих пептидов вместе с разработкой различных альтернативных путей введения с целью увеличения количества препаратов на основе пептидов на рынке [33].

1.1.1 Пептидная фармакокинетика

Фармакокинетические свойства пептидов создают серьезную проблему для клинического применения многих пептидов. Рассмотрим общие аспекты фармакокинетики пептидов.

1. Абсорбция. Транспорт пептидов через биологические мембраны сильно ограничен их большим молекулярным размером (500Да) и гидрофильностью. Стадии абсорбции избегают только при внутривенном введении, но при других путях введения пептидам необходимо преодолевать несколько биологических барьеров, таких как эпителий или слой слизистой оболочки. Структурные и метаболические различия в биологических барьерах приводят к существенным различиям в поглощении пептидов. Подкожный путь введения является наиболее часто используемым способом доставки пептидов [44] и более удобен для введения, чем внутривенный путь, в первую очередь по соображениям безопасности, однако местный кровоток, глубина и объем инъекции, деградация пептида в подкожной ткани и молекулярная масса пептида все может влиять на абсорбцию пептида [50]. При других парентеральных, но неинвазивных путях введения пептиды

должны преодолевать физические барьеры, представленные клетками эпителия, динамические и стерические барьеры, создаваемые слизью, или метаболизирующие ферменты на поверхности эпителия. Доступны три пути абсорбции пептида через эпителий, аналогичные другим лекарственным средствам или ксенобиотикам, а именно: 1) через клетки (трансклеточный), 2) через межклеточные соединения (парацеллюлярный) 3) посредством активного транспорта или опосредованных рецепторами механизмов. Обычно предполагается, что большинство пептидов всасывается парацеллюлярным путем [47]. Наиболее важными факторами, ограничивающими проницаемость пептидов через эпителий, являются увеличенное количество водородных связей, гидрофильность и молекулярный размер более 700 Да [30]. Трансклеточный транспорт через липофильные клеточные мембраны ограничен полярностью пептида, а парацеллюлярное проникновение ограничено их большим размером. Усилители абсорбции обычно необходимы для эффективного поглощения пептида, когда размер пептида превышает 0,5–1 кДа, однако интраназальный путь может позволить поглощение более крупных пептидов (0,2 кДа) без усилителей поглощения [58], а легочный путь через эндотелиальные соединения может позволить поглощение молекул размером 4-6 нм [52]. Помимо размера, форма пептида влияет на его способность проникать через барьеры. Проницаемость жестких циклических пептидов через биологические мембраны ниже, чем у более гибких линейных пептидов. Эпителий является значительным абсорбционным барьером для абсорбции пептидов, но существуют значительные различия между путями введения. Барьерная функция наиболее слаба в альвеолах легких, где эпителий имеет толщину всего 0,2 мм. Большая площадь поверхности (100 м²), эффективная васкуляризация легких, а также обход кишечного эпителия и метаболизм в печени обеспечивают хорошую легочную биодоступность пептидов. Напротив, верхний слой кожи, роговой слой (толщина 10-20 мм) ограничивает трансдермальную абсорбцию полярных и крупных пептидов. В

носовых полостях и бронхах легких слизистые слои представляют собой физический барьер с электростатическими взаимодействиями между отрицательно заряженной слизью и положительно заряженными пептидами [63], тогда как неабсорбированные пептиды могут быть удалены из места всасывания путем мукоцилиарного клиренса.

2. Распределение. Распределение пептидов определяется молекулярной массой, зарядом, связыванием с белками и зависимостью активного транспорта. Малые молекулы и пептиды (500 Да) распределяются в основном путем диффузии, которая также может иметь место для более крупных белков (5–10 кДа), только более медленно, через нанопоры стенок капилляров. Более крупные пептиды могут быть совместно транспортированы с водой.

3. Выведение. Пептиды метаболизируются в течение нескольких минут, что объясняет их короткий период полураспада элиминации и терапевтические эффекты. Протеолитические ферменты в основном отвечают за метаболизм пептидов, и их можно найти во всей системе, но наиболее важными органами являются печень, почки и кровь [44]. Растворимые ферменты, которые содержатся в крови, или связанные с мембраной ферменты часто ответственны за метаболизм пептидов. Напротив, цитоплазматические ферменты часто играют второстепенную роль в метаболизме пептидов. Пептиды свободно фильтруются почечными клубочками, но это имеет незначительное значение в общей элиминации нескольких пептидов по сравнению с метаболической деградацией [65]. Только когда путь ферментативной деградации заблокирован, почечный клиренс является важным путем выведения пептидов [44].

2.1 Доклинические исследования пептидными препаратами

Доклинические исследования направлены на предоставление информации о безопасности и эффективности препарата-кандидата до его тестирования на людях [36]. Документы, регламентирующие проведение

доклинических исследований: Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств под ред. Миронова А.Н. и Лекарственные средства для медицинского применения – Доклинические токсикологические и фармакокинетические исследования безопасности (ГОСТ 56702 2015).

Главными целями в доклинической оценки безопасности лекарственных средств являются: обнаружение органов-мишеней для токсичности и для того, чтобы изучить является ли эта токсичность обратимой; определение и установление начальной безопасной дозы введения лекарств и дальнейшей схемы увеличения дозы у людей [62].

Доклинические испытания на безопасность должны учитывать: (1) выбор соответствующих видов животных; (2) возраст; (3) физиологическое состояние; (4) способ доставки, включая дозу, способ введения и режим лечения; и (5) стабильность тестируемого материала в условиях использования.

Информация о дозировке и уровнях токсичности соединения имеет важное значение для определения того, оправдано ли и достаточно безопасно ли продолжать клинические исследования и обеспечиваются исследованиями по фармакокинетике, фармакодинамике и токсикологии [31]. Фармакодинамика описывает взаимосвязь между концентрацией лекарственного средства в организме и его биологическим эффектом (дозозависимостью). Это включает в себя решение вопроса о том, насколько мощным и эффективным является препарат с точки зрения его желаемого фармакологического эффекта, включая аспекты безопасности.

Фармакокинетика – что организм делает с лекарством? Действие лекарственного средства определяется количеством активного лекарственного средства, присутствующего в организме, особенно в целевом участке. Это, в свою очередь, зависит от абсорбции, распределения, метаболизма и выведения соединения. Большинство лекарств вводятся перорально и должны всасываться в желудочно-кишечном тракте, чтобы

попасть в кровоток, что позволяет им транспортироваться к месту их действия. На своем пути к месту назначения препарат достигает печени, где происходит метаболизм первого прохождения. Следовательно, концентрация препарата – и, следовательно, его биодоступность – снижается перед поступлением в системный кровоток. Внутривенное введение препарата позволяет обойти эффект первого прохождения, что приводит к большей биодоступности. Попад в кровоток, препарат транспортируется в различные ткани.

Токсикология – это мощное средство, но безопасно ли оно? Чтобы определить, безопасен ли препарат для тестирования на людях, проводятся доклинические токсикологические исследования для определения схемы лечения ассоциируется с наименьшей степенью токсичности и, таким образом, определяет подходящую и безопасную начальную дозу для клинических испытаний. Начиная с исследований с однократной дозой для выявления органов, которые могут быть подвержены токсичности препарата, доклинические исследования *in vivo* продолжаются с использованием подходов с повторными дозами [34].

Исследования при однократной дозе могут дать полезные данные для описания взаимосвязи дозы с системной и/или местной токсичностью. Эти данные могут быть использованы для выбора доз для повторных исследований токсичности доз. Информация о зависимости доза-реакция может быть собрана путем проведения исследования токсичности однократной дозы или в качестве компонента фармакологических исследований или исследований эффективности на животных моделях.

Для биофармацевтических препаратов, которые вызывают длительные фармакологические/токсикологические эффекты, за животными из группы восстановления следует наблюдать до тех пор, пока не будет продемонстрирована обратимость. Продолжительность исследований повторных доз должна основываться на предполагаемой продолжительности клинического воздействия и показаниях к заболеванию. Эта

продолжительность введения препарата животным обычно составляет 1-3 месяца для большинства фармацевтических препаратов биотехнологического происхождения. Для биофармацевтических препаратов, предназначенных для краткосрочного применения (например, < 7 дней) и для лечения острых угрожающих жизни заболеваний, повторные исследования доз продолжительностью до 2 недель были сочтены достаточными для поддержки клинических исследований, а также получения разрешения на продажу. Для тех биофармацевтических препаратов, которые предназначены для хронических показаний, исследования продолжительностью 6 месяцев, как правило, были подходящими [37].

Важно исследовать потенциальную нежелательную фармакологическую активность на соответствующих моделях на животных и, при необходимости, включить особый мониторинг этих активностей в исследования токсичности и/или клинические исследования. Фармакологические исследования безопасности измеряют функциональные показатели потенциальной токсичности. Эти функциональные показатели могут быть исследованы в отдельных исследованиях или включены в план исследований токсичности [56].

Целью фармакологических исследований безопасности должно быть выявление любых функциональных эффектов на основные физиологические системы (например, сердечно-сосудистую, дыхательную, почечную и центральную нервную системы). Исследования могут также включать использование изолированных органов или других тест-систем, не связанных с интактными животными. Все эти исследования могут позволить обосновать объяснение специфической токсичности для органов, которое следует тщательно учитывать в отношении использования человеком и показаний. Все животные подвергаются обычному клиническому обследованию, и периодически проводятся анализы, например, крови и мочи. В конце исследования проводится тщательное патологоанатомическое обследование всех животных [31].

2.1.1 Возможные пути введения

Пептиды являются важным классом лекарств, которые обычно вводятся парентеральным путем [54]. Но тем не менее, в последние годы разработали альтернативные формы введения, включая пероральный, легочный, интраназальный и трансдермальный пути, в соответствии с развитием технологий.

Внутривенная инъекция является обычно используемым способом введения пептидной терапии. Преимущества включают в себя 100% биодоступность, поскольку в месте инъекции не происходит потери препарата, а также быстрое начало действия. Недостатком является то, что это инвазивно и требует медицинских работников для его введения.

Другими многообещающими путями неинвазивной доставки лекарств являются легочный, интраназальный и трансдермальный [38].

В последние годы интраназальный путь введения является актуальным, за счет доставки лекарственных веществ в системный кровоток, а также в центральную нервную систему. Слизистая оболочка носа характеризуется высокой проницаемостью и вращением кровеносных сосудов в ткань (васкуляризация) в сочетании с предотвращением эффекта первого прохождения действующего вещества через печеночный барьер или разрушения его в желудочно-кишечном тракте обеспечивают высокое системное всасывание лекарственных веществ, чем при пероральной доставке. Пептидные препараты являются крупными молекулами и не происходит их абсорбция при пероральном введении, поэтому использование интраназального пути введения стало доступным, даже несмотря на то, что назальная абсорбция пептидов уменьшается с увеличением их молекулярной массы. Преградой для пептидных препаратов, превышающих молекулярную массу 1000 Да, является эпителиальный барьер слизистой носовых путей [6].

Легочный путь введения. Легкие являются привлекательным путем введения пептидов из-за их высокой площади поверхности, высокой васкуляризации и более низкой ферментативной активности. Альвеолы также

имеют тонкий слой эпителия (0,1– 0,5 мм) и не имеют дополнительного слоя слизистой оболочки, что может обеспечить быструю абсорбцию и высокую биодоступность вводимых в легкие пептидов [48]. Однако жидкость, выстилающая эпителий, слой эпителиальных клеток и эндотелиальная мембрана все еще образуют значительные абсорбционные барьеры. Пептиды могут вводиться либо в виде жидкости (распылитель), либо в виде сухого порошка, но в обоих случаях для эффективной доставки пептидов в легкие необходимы устройства-ингаляторы.

Трансдермальный. Легкая доступность кожи делает его желаемым путем для введения пептида, но кожный барьер необходимо преодолевать различными химическими и физическими средствами. Недавние подходы были сосредоточены в основном на методах ионофореза и микроигл или их комбинации. Микроиглы представляют собой иглообразные структуры микронного размера, которые достаточно длинные, чтобы проникать в роговой слой, но достаточно короткие, чтобы не вызывать болевых ощущений [61]. Микроиглы предлагают четыре различных подхода, все из которых были применены к пептидам: 1) предварительная обработка микроиглами с последующим нанесением состава 2) растворяющие микроиглы, которые высвобождают пептид быстро и одновременно с растворением микроиглы; 3) микроиглы с покрытием, высвобождающие их пептидное покрытие; 4) полые микроиглы, позволяющие проводить микроинъекции [42].

2.1.2 Физиологические эффекты

В настоящее время знания о физиологически активных пептидах быстро растут, выступая в качестве потенциальных модификаторов многих регуляторных процессов в организме. В настоящее время проводятся исследования, и было собрано значительное количество научных данных для проверки биологической активности пептидов. Эти функции связаны с

общим состоянием здоровья или снижением риска некоторых хронических заболеваний. В организме человека пептиды оказывают ряд полезных для здоровья эффектов, включая антиоксидантное, антитромботическое, противомикробное, противоопухолевое и иммуномодулирующее действие. Благодаря этим свойствам, способствующим укреплению здоровья, эти биоактивные молекулы могут быть добавлены в функциональные продукты питания [27].

Антигипертензивные пептиды — это пептиды, которые после высвобождения из исходного белка обладают способностью модулировать ренин-ангиотензиновую систему и регулировать кровяное давление в организме. Этот гипертензивный эффект уже использовался при применении коммерческих лекарств, и теперь также известно, что этот эффект демонстрируют ингибирующие АПФ пептиды, которые были выделены из ячменя, чеснока, подсолнечника, желатина и т.д. с использованием β -лактоглобулина, α -лактальбумина, γ -зеина, подобных ферментов.

Антимикробные пептиды - это пептиды, которые действуют непосредственно для защиты животных от широкого спектра бактерий, грибов, вирусов и простейших, т.е. обладают антимикробной активностью. Антимикробные пептиды обладают селективной токсичностью по отношению к бактериальным патогенам, не повреждая ткани хозяина. Микробная клеточная стенка состоит из липопротеинов, которые выступают в качестве основной мишени для распада с учетом антимикробной активности пептидов [53]. Антимикробные пептиды в основном и в основном содержат α -спиральную структуру, которые являются катионными и амфипатическими по своей природе, в то время как меньшее количество представляют собой гидрофобные гелевые пептиды. Эта катионная часть пептидов отвечает за электростатическое взаимодействие с анионными фосфолипидами, приводящее к образованию пор в цитоплазматической мембране.

Различные антиоксидантные пептиды были выделены из гороха, сои, льняного семени, рыбы, молочного казеина, молочной сыворотки, яиц и т.д. Пептиды, участвующие в антиоксидантной активности, должны быть способны индуцировать или принимать участие в реакциях переноса одиночных электронов [35]. Следовательно, считается, что аминокислоты, которые могут переносить электроны при физиологическом pH, способны участвовать в антиоксидантной активности.

Противоопухолевое лечение подразумевает лечение или использование пептидов для профилактики рака или злокачественных опухолей (неконтролируемого размножения клеток). Максимальное количество исследований противоопухолевых свойств пептидов было проведено на луназине, т.е. пептиде, выделенном из сои или злаковых зерен [64]. Он в основном эффективен против рака, вызванного химическими и вирусными онкогенами, и работает путем ингибирования гистонацетилтрансферазы, которая дополнительно ингибирует ацетилирование H3 и H4, что приводит к подавлению размножения клеточного цикла и апоптозу раковых клеток.

Цитомодулирующие и иммуномодулирующие пептиды. Цитомодулирующие пептиды являются подходящими биологически активными макромолекулами для модуляции иммунных клеток организма. Они модулируют жизнеспособность (например, пролиферацию, дифференцировку и апоптоз) различных типов клеток и вместе с иммуномодулирующими пептидами могут помочь в контроле развития опухоли. Иммуномодулирующие пептиды, с другой стороны, усиливают функции иммунных клеток, улучшают синтез антител и регуляцию цитохрома, а также повышают иммунитет слизистой оболочки желудочно-кишечного тракта [28].

2.1.3 Патоморфологическая оценка в доклинических исследованиях

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. А при проведении коротких исследований токсичности микроскопический анализ определяет органы, подверженные морфологическим изменениям и вносит точность в механизм влияния исследуемого лекарственного препарата.

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.

3.1 Гематологические и биохимические показатели крови, применяемые для исследований в доклинической оценке безопасности лекарств

Гематологический и биохимический анализ крови предоставляет важную информацию о состоянии здоровья животного, метаболических изменениях в его организме и часто помогает выявить нарушения здоровья уже на доклинической стадии [29]. В биохимическом анализе крови главным образом определяют такие показатели как: альбумин, общий белок, глюкоза, аминотрансферазы (аланинаминотрансфераза и аспартатаминотрансфераза), креатинин и мочевины. Активность аминотрансфераз сыворотки крови является чувствительным показателем повреждения клеток печени, вызванного гепатотоксическими веществами, а также при сердечной недостаточности и различных инфекциях. В настоящее время для диагностики заболеваний печени наиболее широко используется определение каталитической активности аланинаминотрансферазы (АЛТ) и аспартатаминотрансферазы (АСТ). АЛТ содержится в основном в гепатоцитах и в меньшей степени в мышечных клетках. Повышение активности АЛТ наблюдается при разрушении клеток печени, причем является стойким и выраженным. АСТ содержится в клетках различных тканей, причем наибольшая активность АСТ наблюдается в печени, в сердечной и скелетных мышцах, в почках. Это в основном митохондриальный фермент. Увеличение концентрации АСТ свидетельствует о повреждении печени [60].

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, гипердренокортицизм, 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.

Альбумин - одна из основных белковых фракций крови. Концентрация альбумина в сыворотке крови выше, чем концентрация других белков. Снижение уровня альбумина, увеличение концентрации фибриногена, снижение в плазме крови концентрации общего белка могут свидетельствовать о нарушении синтеза, увеличении катаболизма, уменьшении абсорбции.

Мочевина выводится из организма в основном вместе с мочой. В зависимости от скорости такого удаления и от концентрации вещества можно предварительно оценить по крови, насколько эффективно почки справляются с секреторной функцией. Снижение концентрации мочевины встречается сравнительно редко. Состояние может объясняться причинами: физиологическими; патологическими. Значительное падение уровня мочевины фиксируется при развитии тяжелых заболеваний и состояний, опасных для жизни, например, при токсическом поражении печени [60].

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. Повышение уровня креатинина в крови возникает при снижении клубочковой фильтрации. Уровень креатинина также повышается при пониженной почечной перфузии [19].

Гематологические параметры являются хорошими показателями физиологического статуса животных. Полученные результаты гематологических исследований позволяют сделать вывод о том, в каком состоянии находится активность костного мозга, а также о возможных

внутрисосудистых дефектах, например гемолизе [18]. Исследование крови дает возможность исследовать наличие нескольких метаболитов и других компонентов в организме животных, и это играет жизненно важную роль в физиологическом, питательном и патологическом состоянии организма.

Основными функциями эритроцитов являются транспорт кислорода и углекислого газа, а также они служат переносчиками гемоглобина. Таким образом, снижение количества эритроцитов подразумевает снижение уровня кислорода, который будет переноситься в ткани, а также уровня углекислого газа, возвращаемого в легкие [55].

Основными функциями лейкоцитов и их дифференциалов являются борьба с инфекциями, защита организма путем фагоцитоза от вторжения чужеродных организмов и выработка или, по крайней мере, транспортировка и распределение антител в иммунном ответе. Таким образом, животные с низким содержанием лейкоцитов подвергаются высокому риску заражения болезнью, в то время как животные с высоким содержанием способны вырабатывать антитела в процессе фагоцитоза и обладают высокой степенью устойчивости к болезням и повысить адаптивность к местным условиям окружающей среды и распространенным заболеваниям [39]. Тромбоциты крови участвуют в свертывании крови. Низкая концентрация тромбоцитов предполагает, что процесс образования тромбов (свертывания крови) будет длительным, что приведет к чрезмерной потере крови в случае травмы. Объем упакованных клеток (PCV), который также известен как гематокрит (Ht или Hct), представляет собой процент эритроцитов в крови. Объем упакованной клетки участвует в транспортировке кислорода и поглощенных питательных веществ. Увеличенный объем упакованных клеток показывает лучшую транспортировку и, таким образом, приводит к увеличению первичной и вторичной полицитемии.

Гемоглобин переносит кислород и является железосодержащим металлопротеином. Гемоглобин, средний корпускулярный гемоглобин, а также объем упакованных клеток являются показателями, которые

характеризуют оценку циркулирующих эритроцитов, также немаловажны для того, чтобы диагностировать анемию. Кроме того, показатель высокого объема упакованных клеток (PCV) указывает либо на увеличение количества эритроцитов (эритроцитов), либо на уменьшение объема циркулирующей плазмы [26].

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили на 12 самцах белых беспородных крыс в возрасте 3-х месяцев массой 200-250 грамм в соответствии с методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств [16], которые содержались на естественном лабораторном рационе в стандартных условиях вивария. Животных акклиматизировали к лабораторным условиям в течение двух недель перед началом эксперимента. Затем их разделили на 2 группы (по 6 крыс в каждой группе). Животных контрольной и экспериментальной групп содержали в разных отсеках. Содержание животных и условия проведения экспериментов *in vivo* соответствовали ГОСТ Р ИСО 10993-2-2015 «Требования к обращению с животными» [5]. Опытным крысам вводили пептидный препарат, на основе маточного молочка, выделенный и очищенный на базе кафедры «Общая биология и биохимия» (группа Опыт). Вводили по 10 мкл/животное в дозе 300 мкг/кг массы тела 1 раз в сутки между 8:00 и 10:00 часами в течение 14 дней (с 1-го по 14-й день эксперимента включительно). Контрольные животные получали в эти же сроки и подобным образом вместо пептида 0,9%-ный раствор NaCl (группа Контроль).

2.1 Методы гистологического исследования

Для гистологического исследования брали сердце, легкое, почку, селезенку, печень, надпочечники, головной мозг. Промывали органы в 0,9% NaCl. Извлеченные органы взвешивали и рассчитывали массовый коэффициент по формуле: $МК = \frac{\text{Масса органа (г)}}{\text{масса тела (г)}} \cdot 100\%$.

Далее фиксировали исследуемый биологический материал в 10% формалине для предотвращения разрушения клеток и структуры ткани. Далее приступали к процессу обезвоживания кусочка ткани, для этого применяли батарею спиртов, состоящую из 96%-ного изопропилового спирта и минерального масла [3].

Далее идет заливка материала – процесс создания твердого блока, чтобы быть пригодным для получения срезов нужной толщины. Для заливки использовали парафин. Уплотнение материала проводили при температуре 56° (температура плавления парафина) [8].

Далее приступали к приготовлению гистологических срезов. Для изготовления срезов парафиновых блоков использовали санный микротом [10]. Толщина срезов должна быть примерно 5-6 мкм. С помощью кисточки снимали срезы с блока и расправляли их на предметном стекле путем аппарата для сушки и расправления гистологических срезов.

Депарафинирование срезов – это процесс, который направлен на удаление парафина. Препараты помещали в раствор ксилола и 96% изопропилового спирта [12], однако ксилол является опасным растворителем, поэтому его заменили на минеральное масло.

2.1.1 Окраска гематоксилин-эозином

Окрашивание: погружали срез в гематоксилин и выдерживали в течение 5 минут. После чего держали срез в трёх тарах с проточной водой в течение 5 минут (в каждой). Обмакнув в салфетке срез помещали в спиртовой раствор эозина на 30 секунд. Чтобы удалить избыток красителя срезы промывали в дистиллированной воде. После этого срезы в течение 5 минут обрабатывали 70%-ным и 96%-ным изопропиловым спиртом для обезвоживания. По истечению времени погрузили образцы в минеральное масло на 5 минут и оставили на 3 часа в салфетке для дальнейшего заключения в среды гистологических препаратов и покрытия их покровным стеклом.

2.1.2 Окраска по методу Вейгерт-Ван-Гизона

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 [7].

Технику окрашивания выполняли таким образом: срезы погружали в гематоксилин Вейгерта (1:1) на 10 минут. Ополаскивали в проточной воде 10 минут по три раза. Помещали срезы на 5 минут в пикрофуксин и по истечению времени, чтобы удалить избыток красителя срезы быстро споласкивали в течение 10 секунд в дистиллированной воде. Обработывали срезы 70%-ным и 96%-ным изопропиловым спиртом по 5 минут в каждой и переносили в минеральное масло на 5 минут, по окончании времени оставляли в салфетке на 3 часа для дальнейшего заключения в среды гистологических препаратов и покрытия их покровным стеклом.

2.1.3 Трихромное окрашивание по Массону

Трихромное пятно Массона – это метод гистологического окрашивания, который чувствителен к соединительной ткани и позволяет дифференцировать её фиброзное состояние, а также даёт возможным увидеть и другие патологические патологические состояния. При применении метода Массона (окраска анилиновым синим) цитоплазма окрашивается в малиновый цвет, соединительная ткань – ярко-синий, ядра клеток – в коричневый цвет [20].

Технику окрашивания проводили таким образом: срезы погружали в железный гематоксилин Вейгерта (раствор А+раствор Б 1:1) на 1-2 минуты. Далее на протяжении 10 минут промывали препараты в проточной воде и сразу опускали их в кислый фуксин (реактив В) на 5 минут. Затем ополаскивали дистиллированной водой для удаления избытка красителя и помещали срезы в 1% фосфорномолибденовую кислоту (реактив Г) на 15 минут, по истечению времени переносили их в анилиновый синий (реактив Д) на 1-2 минуты. Далее ополоснули препараты в проточной воде и погрузили их в 1% уксусную кислоту на 10 минут. По окончании времени провели срезы через 96% и 100 % спирты, минеральное масло. После этого оставляли в салфетке на 3 часа для дальнейшего заключения в среды гистологических препаратов и покрытия их покровным стеклом [11,24].

2.1.4 Окрашивание кислым орсеином

Техника окрашивания: мазок помещали в 15% смесь растворов: перманганата калия (9,5 мл), активирующего кислого буфера (5 мл) на 10 минут. Затем поместили в щавелевую кислоту на 10 минут. Промыли в проточной воде 5 минут, затем в двух порциях дистиллированной воды и двух порциях спиртового раствора. В реагенте Орсеин до Шиката держали 4 часа, затем промывали в проточной воде на протяжении 10 минут. Далее дифференцировали специальным дифференцирующим раствором.

2.2 Гематологические методы исследования

Образцы отбирали из яремной вены крыс в пластиковые пробирки для гематологического анализа с добавлением ЭДТА в качестве антикоагулянта.

Лейкограмму определяли по морфологическим показателям количества лейкоцитов с дифференциальным подсчетом различных форм лейкоцитов [51]. Изготавливали не менее двух препаратов от каждого животного. На каждом препарате подсчитывали 100 клеток (200 клеток в мазке каждого животного). Анализировали индекс сдвига лейкоцитов (ИСЛ) крови по И.И. Яблучанскому [21, 22], используя следующую формулу: $ИСЛ = (\text{Э} + \text{Б} + \text{Н}) / (\text{М} + \text{Л})$, где Э — эозинофилы; Б — базофилы; Н — нейтрофилы; М — моноциты; Л — лимфоциты.

2.2.1 Окраска по Романоскому-Гимзе

Для выведения лейкоцитарной формулы готовили тонкий мазок крови на предметном стекле, обрабатывали его фиксатором Май-Грюнвальда (эозин метиленовый синий) и окрашивали азур-эозином по Романовскому [17].

Фиксация мазка: высушенные препараты фиксировали раствором Май-Грюнвальда (эозин метиленовый синий) в течение 2-3 минут, затем промывали водой и высушивали. Для окраски мазка крови готовили раствор, содержащий 360 мкл фосфатного буфера + 720 мл дистиллированной воды + 80 мл красителя азур-эозина по Романовскому.

Окрашивание мазка: фиксированный и слегка высушенный мазок крови помещали в чашку Петри, в которую был налит полученный раствор красителя. Продолжительность окрашивания занимала 30 минут. По истечению времени мазки промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Готовые препараты крови микроскопировали с использованием масляной иммерсии [9].

2.2.2 Подсчет количества форменных элементов крови (лейкоцитов, эритроцитов) в камере Горяева

Для осуществления подсчета эритроцитов в камере Горяева 200-кратно разводили кровь путём добавления 0,9 % NaCl [15]. С помощью пипетки вносили 4 мл хлорида натрия в чистую пробирку. Затем капиллярной пипеткой отбирали 20 мкл исследуемой крови и переносили на дно пробирки. С помощью стеклянной палочки из этой пробирки отбирали 1-2 капли жидкости и заполняли камеру Горяева раствором, затем накрывали притертым покровным стеклом. Подсчет эритроцитов осуществляли при малом увеличении в 5 больших квадратах, которые имеют деление на 16 малых (общее количество 80).

Расчет числа эритроцитов осуществляли, исходя из разведения крови (200) и числа малых квадратов (80), по формуле: $X = (a \times 4000 \times 200) / 80$, где X – число эритроцитов в 1 мкл крови; а – число эритроцитов, посчитанных в 80 малых квадратах камеры Горяева [14].

Подсчет лейкоцитов в камере Горяева выполняли следующим образом: заполняли пробирку объемом 380 мкл 3-5% уксусной кислоты. Микропипеткой набирали 20 мкл исследуемой крови. Содержимое пробирки перемешивали и с помощью пипетки брали 1-2 капли жидкости и вносили в счетную камеру Горяева. Лейкоциты считали под малым увеличением в 100 больших нерасчерченных квадратах. Расчет числа лейкоцитов осуществляли, исходя из разведения крови (20) и числа больших квадратов (100), по формуле: $X = (a \times 250 \times 20) / 100$, где X – число лейкоцитов в 1 мкл крови; а –

число лейкоцитов, посчитанных в 100 больших квадратах камеры Горяева [17].

2.3 Биохимические методы исследования

Образцы крови экспериментальных животных брали из яремной вены в центрифужные пробирки. Для получения сыворотки, кровь центрифугировали при 3000 об/мин в течение 10 минут. Для сравнения результатов в полученной сыворотке определяли активность ферментов и концентрацию веществ, рекомендованных к анализу ГОСТ Р ИСО 10993-11-2015."Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследование общетоксического действия" [4]: аспартатаминотрансфераза (АСТ), щелочная фосфатаза (ЩФ), аланинаминотрансфераза (АЛТ), гамма-глутамилтрансфераза (ГГТ), мочевины, креатинина, общий белок, альбумин. Количественное определение активности всех биохимических показателей проводили с использованием стандартных наборов реактивов для клинической лабораторной диагностики («Ольвексдиагностикум», Россия).

2.3.1 Определение активности аминотрансфераз (АЛТ и АСТ) в сыворотке крови (метод Райтмана-Френкеля)

АСТ в щелочной среде катализирует перенос аминогруппы из L-аспартата в 2-оксоглутарат с образованием оксалоацетата и L-глутамата. Оксалоацетат самопроизвольно декарбоксилируется с образованием пирувата в сильно кислых условиях [32].

АЛТ катализирует равновесную реакцию переноса аминогруппы из L-аланина в 2-оксоглутарат в аланиновом цикле с образованием L-глутамата и пирувата. АЛТ требует пиридоксальфосфата в качестве кофермента, который действует как аминоноситель.

Пируват и оксалоацетат реагирует с 2,4-динитрофенилгидразином в присутствии КОН с образованием окрашенных продуктов (коричнево-красного цвета) реакции гидразонов пирувата и оксалоацетата.

Интенсивность цвета определяли фотометрически при длине волны 537 нм [23].

2.3.2 Количественное определение содержания мочевины в сыворотке крови

Концентрация мочевины в крови является маркером заболеваний печени и почек. Количественно определяли содержание мочевины в сыворотке крови колориметрическим методом при длине волны 540 нм. Этот метод основан на том, что в кислой среде в присутствии тиосемикарбазида и ионов трехвалентного железа мочевины реагирует с диацетилмоноксимом. В результате образуются продукты реакции, образующие комплекс красного цвета.

2.3.3 Количественное определение активности щелочной фосфатазы в сыворотке крови

Количественно определяли активность щелочной фосфатазы в сыворотке крови методом по конечной точке. Щелочная фосфатаза катализирует реакцию гидролиза бесцветного субстрата п-нитрофенилфосфата, который является органическим моноэфиром ортофосфорной кислоты. Эта реакция происходит в щелочной среде (рН 10,3) и в результате освобождается п-нитрофенол, который окрашен в желтый цвет [2].

Количество образовавшегося окрашенного продукта определяли на спектрофотометре при длине волны 405 нм.

2.3.4 Определение содержания общего белка в сыворотке крови биуретовым методом

Пептидные связи белков реагируют с ионами меди в щелочном растворе с образованием окрашенного комплекса сине-фиолетового цвета. Интенсивность получаемого цвета пропорциональна концентрации белка, присутствующего в реакционной системе и определяется фотометрически при длине волны 550 нм [13]. Биуретовый реагент содержит калий-натрий

виннокислый для образования комплексных ионов меди и поддерживает их растворимость в щелочном растворе [57].

2.3.5 Определение содержания альбумина в сыворотке крови колориметрическим методом с бромкрезоловым зелёным

Концентрацию альбумина в сыворотке крови определяли с помощью колориметрического метода, который основан на специфическом связывании бромкрезола зеленого с белком, присутствии детергента при слабокислом рН, что приводит к изменению цвета с желто-зеленого на зелено-синий с результирующим сдвигом длины волны поглощения комплекса. Опыт ставили в трёх повторностях. Поглощение комплекса краситель-альбумин определяли спектрофотометрически при длине волны 640 нм [46].

2.3.6 Количественное определение активности гамма-

глутамилтрансферазы в сыворотке крови методом по конечной точке

Одним из ферментов, специфичных для почечной ткани, является гаммаглутамилтранспептидаза. Его активность определяли стандартным методом “конечной точки” с учетом скорости формирования 5-амино-2-нитробензоата при длине волны 405 нм [45].

Для того чтобы рассчитать коэффициент для расчета активности фермента, приготовили калибровочные растворы с заданной активностью гамма-ГТ по методике. Затем из них приготовили калибровочные пробы, перемешали их и измеряли оптическую плотность против контрольной пробы, при длине волны 405 нм.

2.3.7 Количественное определение содержания креатинина в сыворотке крови на основе реакции Яффе с депротеинизацией

Креатинин - это катаболический продукт, образующийся из креатинфосфата. Сывороточный креатинин используется в качестве скринингового теста при клинической оценке функции почек. Количественное определение содержания креатинина в сыворотке крови проводили на основе реакции Яффе с депротеинизацией. В этой реакции креатинин вступает в реакцию с пикриновой кислотой в щелочном растворе с

образованием красно-оранжевого комплекса, который поглощается при 510 нм [49]. Скорость образования цвета пропорциональна концентрации креатинина в образце.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выделение пептидных фракций из раствора гомогената маточного молочка проводилось на базе кафедры «Общая биология и биохимия». Общая схема выделения, очистки и разделения пептидного препарата, на основе маточного молочка представлена на рисунке 1.

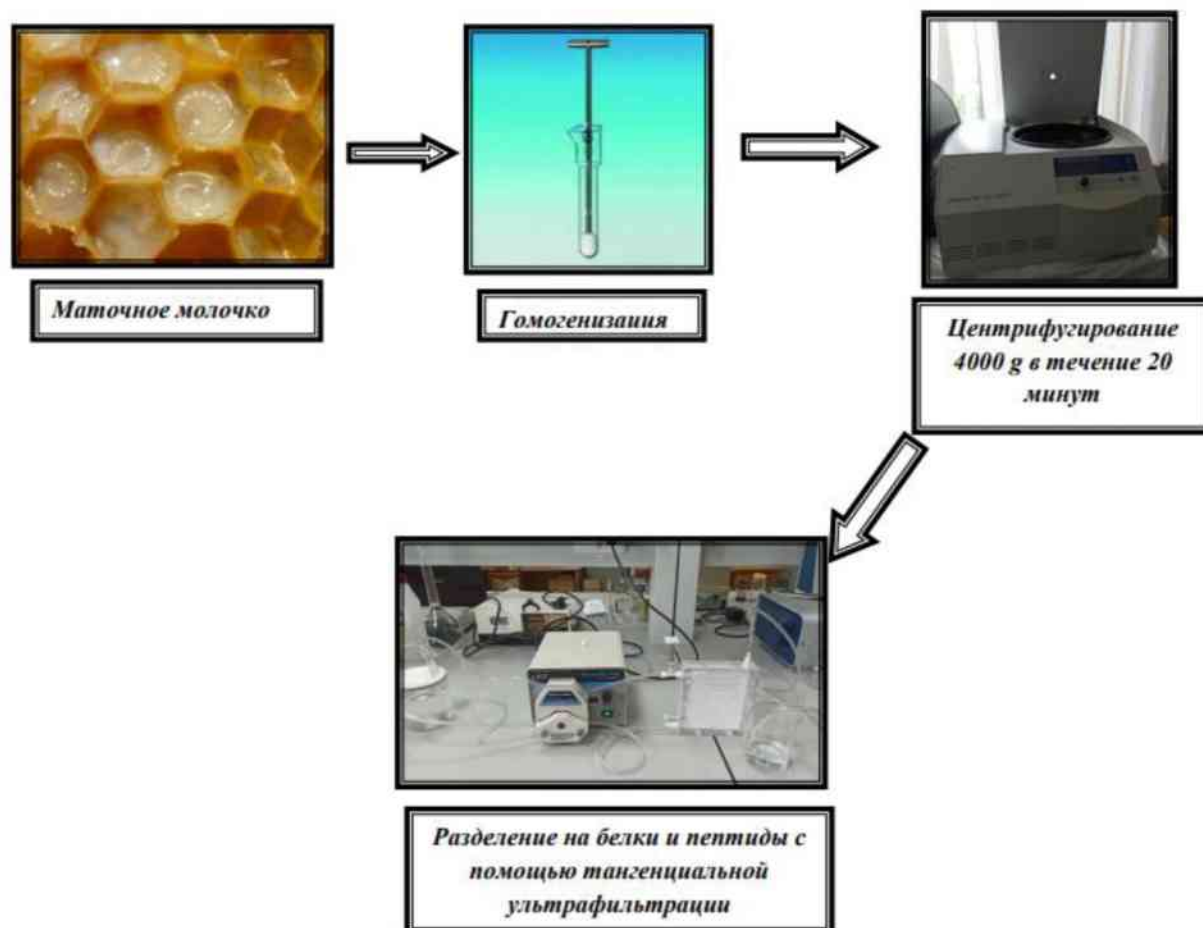


Рисунок 1. Общая схема выделения, очистки и разделения пептидного препарата, на основе маточного молочка.

3.1 Результаты проведения массометрии внутренних органов экспериментальных животных и расчет их массовых коэффициентов

Анализ массовых коэффициентов органов при токсикологических исследованиях дает возможность обнаружить органы-мишени, а также выявить признаки эндокринно-связанных эффектов.

В таблице приведены данные в отношении влияния пептидного препарата на печень, сердце, легкие, селезенку, почки, надпочечники,

головной мозг (табл.1). Из полученных данных можно сделать вывод о том, что в опытной и в контрольной группах экспериментальных животных массовые коэффициенты органов не менялись.

Таблица 1 – Расчет массовых коэффициентов органов контрольной и опытной групп

Показатель	Группа контроль, n=6		Группа опыт, n=6	
	Масса органа, г	Массовый коэффициент, %	Масса органа, г	Массовый коэффициент, %
Масса тела	224±4	-	205±4	-
Сердце	0,94±0,09	0,42±0,04	0,89±0,06	0,44±0,03
Легкие	1,98±0,13	0,88±0,05	1,90±0,10	0,90±0,04
Печень	11,6±0,3	5,18±0,14	10,6±0,4	5,17±0,16
Селезенка	1,39±0,09	0,62±0,04	1,27±0,08	0,62±0,04
Почки	1,79±0,09	0,80±0,04	1,61±0,096	0,79±0,05
Надпочечники	0,094±0,002	0,041±0,002	0,086±0,007	0,042±0,003
Головной мозг	1,8±0,1	0,81±0,05	1,6±0,1	0,79±0,05

При макроскопическом исследовании органов опытной и контрольной групп не было выявлено каких-либо аномальных изменений текстуры, отека, размера или цвета, атрофии или гипертрофии (рис.3). Во всех обработанных группах не было признаков некроза или поражения.

Различия в массе органов между контрольной и опытной группами наблюдалось лишь незначительное, это можно объяснить тем, что контрольная группа имела большую массу тела, чем опытная.

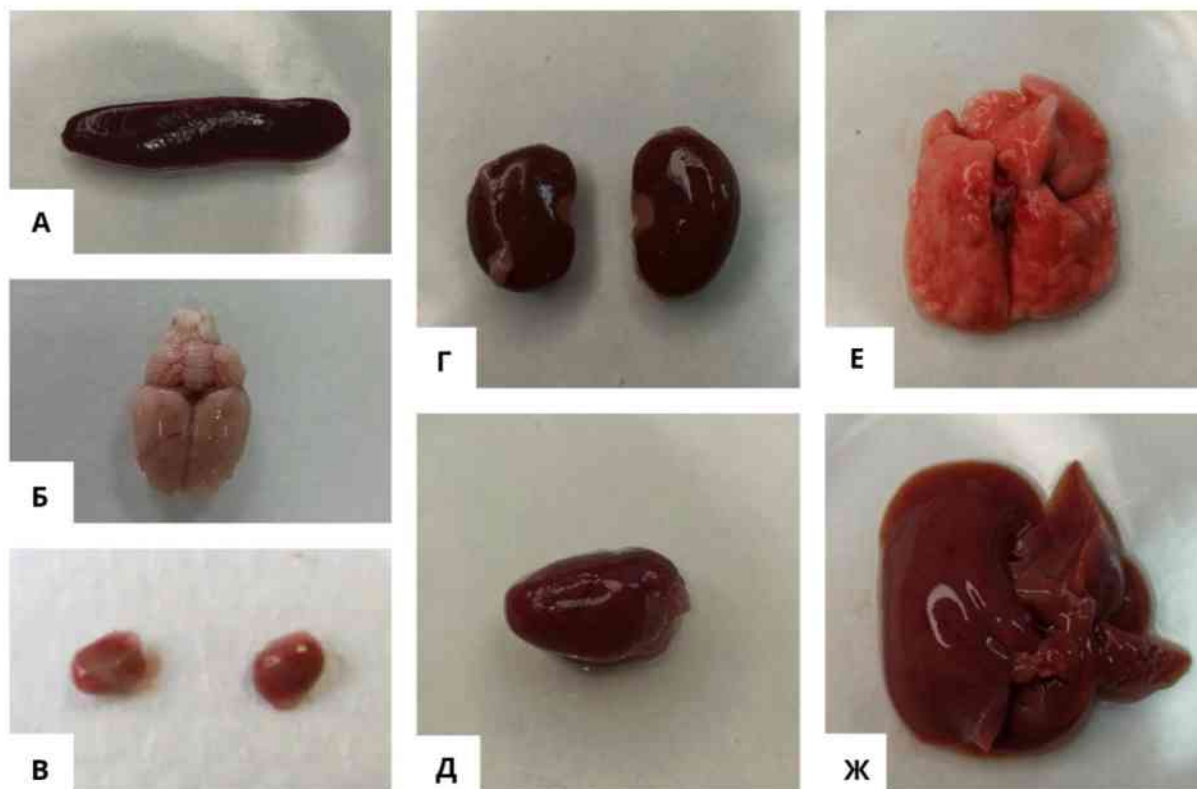


Рисунок 3. Извлеченные органы для патоморфологического исследования: А – селезенка; Б – головной мозг; В – надпочечники; Г – почки; Д – сердце; Е – легкие; Ж – печень.

3.2 Результаты патоморфологической оценки внутренних органов животных опытной и контрольной групп

Гистопатологический анализ включил макроскопическое и микроскопическое исследование обработанных и фиксированных органов для визуализации различных компонентов и структурных изменений в них.

Макроскопический анализ печени у крыс, получавших пептидный препарат, на основе маточного молочка, не выявил изменений цвета или текстуры, никаких изменений в гепатоцитах, печеночных синусоидах, центральной вене и портальной триаде не наблюдалось по сравнению с контрольной группой.

Анализ морфологической картины печени у крыс контрольной и опытной групп показал, что структура печеночных долек, тяжи гепатоцитов не были изменены, ядра находились в центре клеток, с четко очерченной

плазматической мембраной и большим количеством цитоплазмы. Печеночные балки хорошо выражены. Лобулярное воспаление не отмечалось, перипортальный и центролобулярный фиброз отсутствовали. Структура печени сохранена, строма представлена соединительнотканными слоями стромы, расположенными в четко очерченных междольковых артериях, венах и желчных протоках. Междольковые желчные протоки выстланы одним слоем кубовидного эпителия, признаков воспаления или застоя желчи не выявлено (рис.4). Паренхима печени имела нормальную структуру и была представлена хорошо различимыми печеночными долями. Гепатоциты расположены в двухслойных пластинках, причем клетки отделены друг от друга желчными канальцами на внутренних поверхностях пластинок (рис.5). Мембрана гепатоцитов, образующая желчные канальцы, имела простые микроворсинки. Наружные поверхности гепатоцитов ограничены кровеносными синусоидами, а гепатоцит отделен от сосудистого пространства синусоиды слоем специализированных синусоидальных эндотелиальных клеток. Пространство Диссе образовано между эндотелиальными клетками и гепатоцитами.



*Рисунок 4. Триада печени.
Окраска гематоксилин-эозином,
x400*

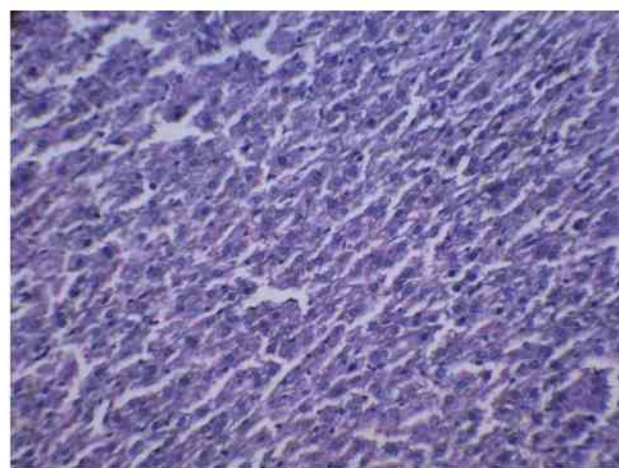


*Рисунок 5. Гепатоциты печени.
Окраска гематоксилин-эозином,
x400*

Почка не показала структурной дегенерации и изменений цвета в коре почек и канальцах, без какого-либо канальцевого некроза и воспаления у крыс, получавших интраназально пептидный препарат, по сравнению с контрольной группой. Микроскопическое исследование среза почки крыс показало нормальную структуру почечной коры, проксимальных и дистальных извитых канальцев. Почечная кора указывала на множественные клубочки, каждый из которых состоял из пучков капилляров, окруженных капсулой Боумена (рис.6). Капсула состояла из двух эпителиальных листков с небольшим пространством между ними. Строма органа представлена тонкими слоями рыхлой соединительной ткани, которая расположена между канальцами и окружает сосуды. Наружный листок капсулы почечного тельца образован плоскими клетками с удлинёнными ядрами и узкими участками цитоплазмы. Внутренняя створка капсулы плотно охватывала клубочковые капилляры со всех сторон. Она образована эпителиоцитами неправильной формы — подоцитами. Из их тел исходило несколько длинных широких отростков — цитотрабекул. Последние контактировали с базальной мембраной, а на противоположной стороне этой мембраны находились эндотелиальные клетки клубочковых гемокапилляров, которые имели узкую цитоплазму. В то время как проксимальные извитые канальцы были выстланы несколько темными кубовидными клетками, дистальные извитые канальцы выстланы бледными кубовидными клетками. Эти клетки имели сферические ядра.

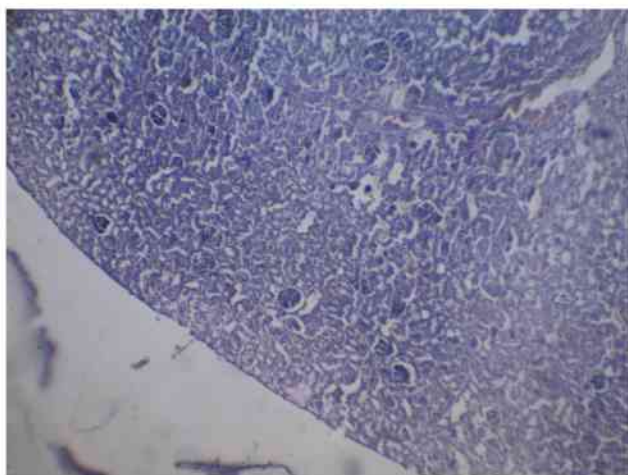


*Рисунок 6. Почечная кора.
Окраска гематоксилин-эозином,
x100*

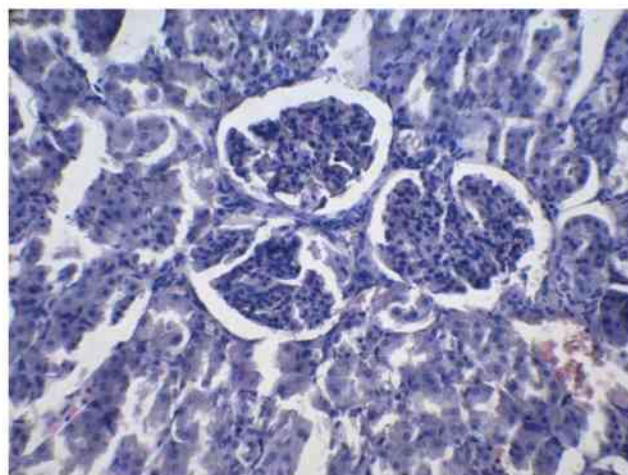


*Рисунок 7. Почечное тельце. Окраска
гематоксилин-эозином, x400*

При макроскопическом исследовании селезенки крыс контрольной и опытной групп видимых изменений не обнаружено. При микроскопическом исследовании не было выявлено изменений площади красной пульпы и количества ядросодержащих клеток, гиперплазии лимфоидных фолликулов. Снаружи селезенка была покрыта равномерной по всему периметру капсулой, состоящей из плотной волокнистой соединительной ткани, эластических волокон и гладкомышечных клеток (рис.8). От капсулы внутрь селезенки, перпендикулярно, отходили трабекулы, представленные волокнистой соединительной и гладкой мышечной тканями (рис.9). Паренхима селезенки была образована лимфоидной тканью в виде лимфоидных узелков и периартериальными лимфоидными муфтами, составляющими белую пульпу (рис. 11). Структурные компоненты красной и белой пульпы хорошо определялись благодаря разной плотности расположения в них клеточных элементов. Белая пульпа включала лимфоидную ткань в виде первичных и вторичных лимфоидных узелков (В-зона), периартериальные лимфоидные влагалища, окружающие пульпарные артерии и маргинальную зону. Среди лимфоидных узелков преобладали узелки с центрами размножения (герминативные центры). Красная пульпа селезенки крыс также была образована ретикулярной тканью с

расположенными в ней форменными элементами крови, которые придавали ей такой цвет, макрофагами и содержала большое количество кровеносных сосудов (рис.10).

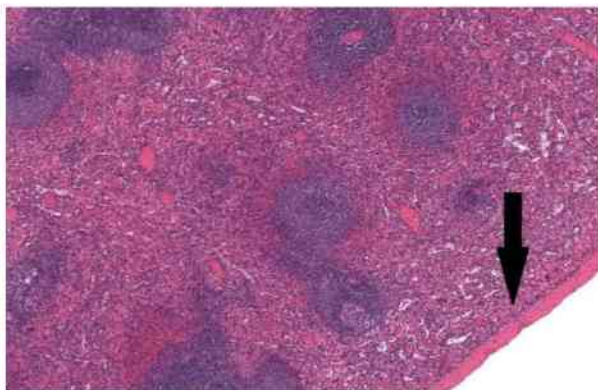


*Рисунок 8. Капсула селезенки.
Окраска гематоксилин-эозином,
x100*

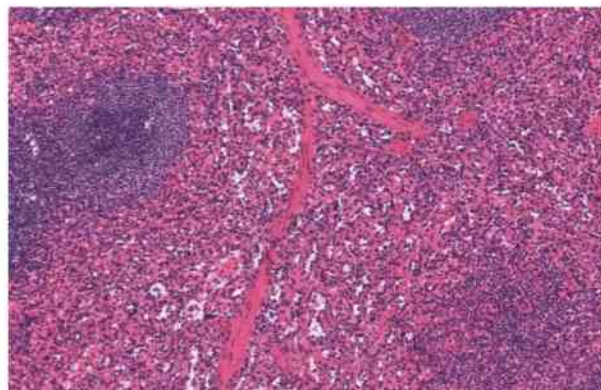


*Рисунок 9. Трабекула селезенки.
Окраска гематоксилин-эозином,
x100*

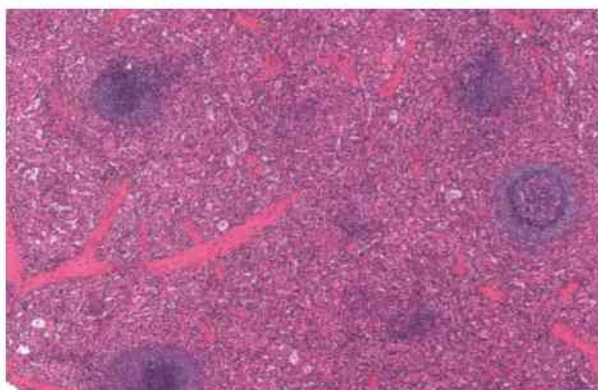


*Рисунок 10. Красная пульпа
селезенки. Окраска гематоксилин-
эозином, x100*

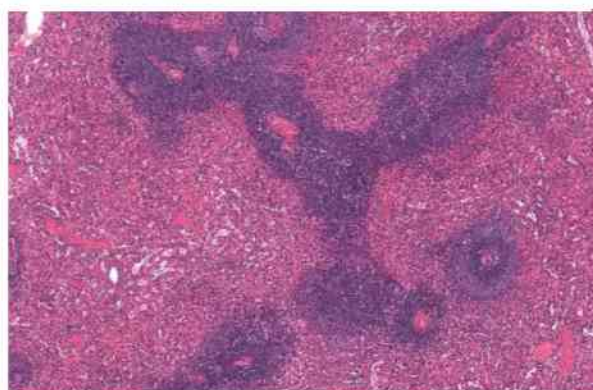


*Рисунок 11. Белая пульпа. Окраска
гематоксилин-эозином, x100*

При визуальном исследовании надпочечников не было выявлено каких либо изменений. При микроскопическом исследовании не было установлено выраженных сосудисто-стромальных изменений, гемодинамических нарушений в виде застойной гиперемии, активной пролиферации соединительнотканых компонентов стромы. При анализе результатов гистологических исследований надпочечников у крыс контрольной и

опытной групп установлено, что граница коркового и мозгового плато хорошо визуализируется, соединительнотканная капсула выражена. Кортикальный слой надпочечных желез имеет четкое деление на клубочковую, пучковую и сетчатую зоны. Клубочковая зона представлена небольшими клетками с равномерно окрашенной цитоплазмой, которые формируют гроздевидные, концентрические фигуры (рис.12). Клетки этого слоя преимущественно мономорфны, округлой формы с эксцентрично расположенным округло-овальным ядром. Визуализируются единичные клетки, более крупные с полиморфным ядром. Пучковая зона более объемна, преимущественно формирует корковое плато, которое представлено разнонаправленно ветвящимися синусоидами, между которыми расположены тяжи эозинофильных, более крупных клеток округлой, призматической и многогранной форм (рис. 13). Большая часть клеток вакуолизирована, ядра чаще однородные гиперхромные. Граница пучковой и сетчатой зон визуализируется. Сетчатая зона коркового плато отделена от мозгового выраженной соединительнотканной прослойкой. Сетчатая зона представлена переплетающимися в разных направлениях мелкими кровеносными сосудами, умеренного наполнения – капиллярами, между которыми располагаются выраженные эпителиальные волокна и интенсивно окрашенные округлые и угловатые клетки с более мелким гиперхромным ядром (рис. 14). Мозговое вещество сформировано обширной сосудистой сетью интенсивного кровенаполнения, паренхиматозные клетки крупные, преимущественно округлые и многогранные, образуют плотные клеточные тяжи, ядро крупное и светлое, цитоплазма большей части клеток вакуолизированная, выявляется мелкоточечная гранулярность.

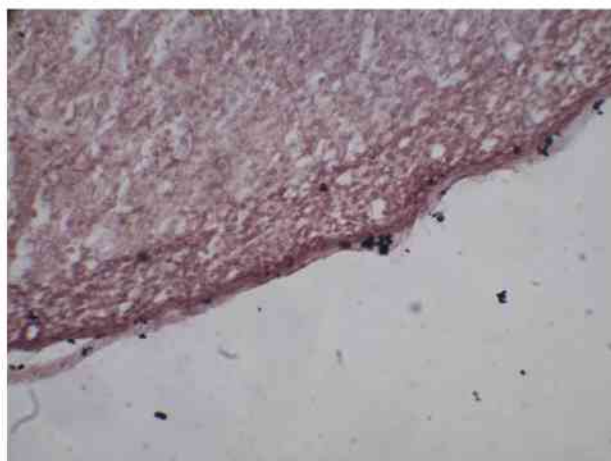


*Рисунок 12. Клубочковая зона.
Окраска кислым орсеином, х400*

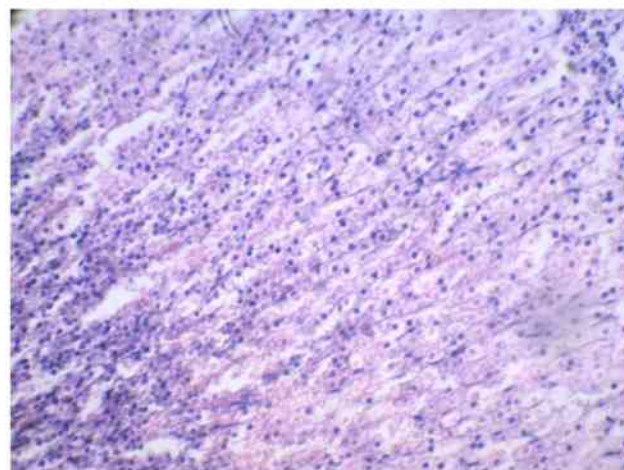


*Рисунок 13. Пучковая зона.
Окраска гематоксилин-эозином,
х400*

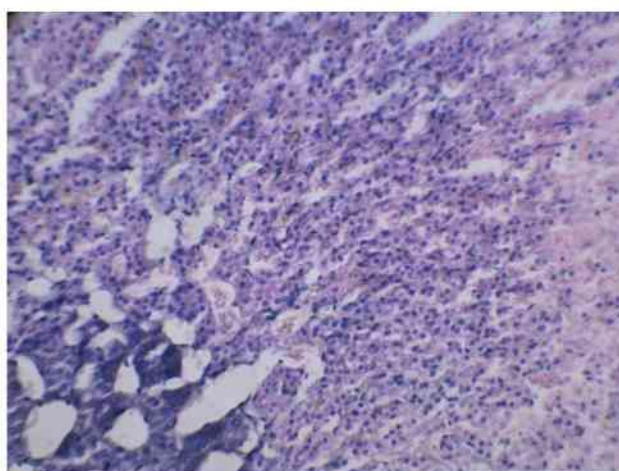


Рисунок 15. Сетчатая зона. Окраска гематоксилин-эозином, х400.

Легочная ткань оказалась нормальной, без аномальных изменений цвета. Не было выявлено очаговых ателектаз, чередующихся с очагами расширения альвеолярной ткани, эмфизематозно расширенных альвеол с разрывами межалвеолярных перегородок, альвеолярных и периваскулярных отеков. Микроскопически в исследуемых препаратах легких животных контрольной и опытной групп просветы бронхов хорошо выражены, содержат небольшое количество эозинофильной слизи с примесью слущенных клеток бронхиального эпителия (рис.15). Слизистая оболочка складчатая, выстлана реснитчатым эпителием. В бронхах крупного и среднего калибра эпителий многорядный, в мелких бронхах двухрядный и одnorядный (рис.16). Ядра клеток мелкие округлые, базофильные,

цитоплазма эозинофильная. В собственной пластинке слизистой оболочки при окраске по Ван Гизону определяются продольно расположенные тонкие фуксинофильные волокна, между которыми визуализируются немногочисленные лимфоциты, фибробласты, единичные макрофаги. Подлежащая мышечная оболочка слизистой оболочки бронхов представлена несколькими рядами гладкомышечных клеток с несколько вытянутыми слабо базофильными ядрами и эозинофильной цитоплазмой. В мелких бронхах соединительнотканые волокна собственной пластинки переплетаются с гладкомышечными клетками мышечной пластинки.

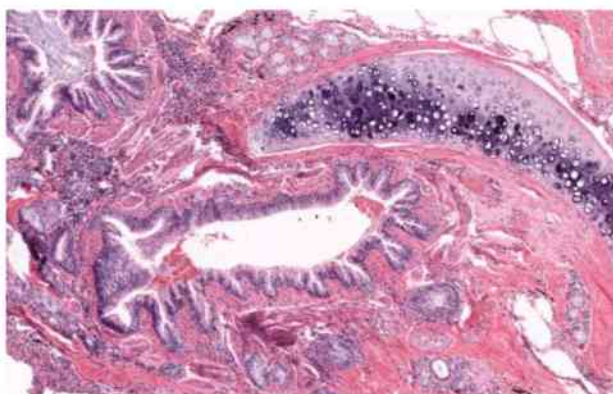


Рисунок 15. Бронхи. Окраска гематоксилин-эозином, x100

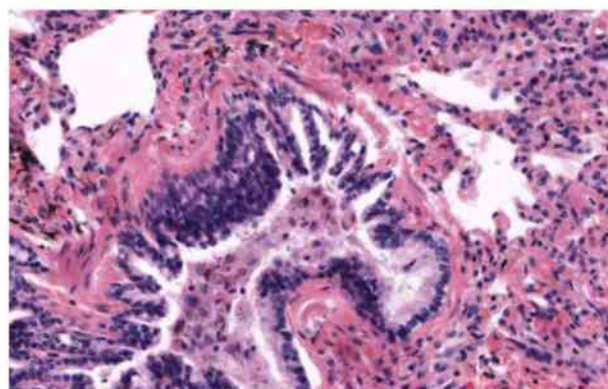


Рисунок 16. Бронхиальный эпителий. Окраска гематоксилин-эозином, x100

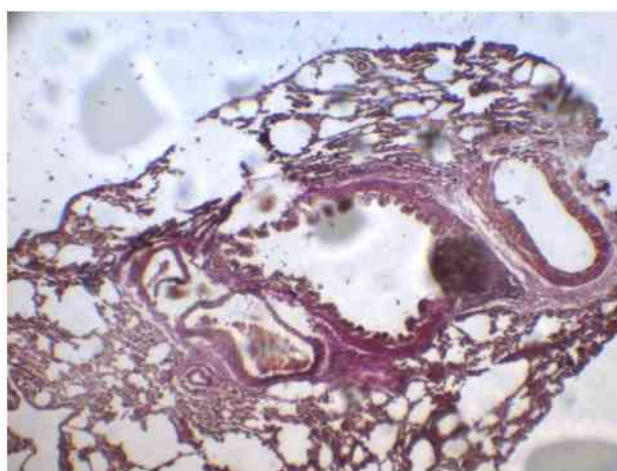


Рисунок 17. Бронхиолы. Окраска по Ван-Гизону, x100

При макроскопическом исследовании признаков изменений не было, гипертрофия сердца не выявлена. При морфологическом исследовании сердца значительных изменений не выявлено, имелась развитая морфологическая организация слоев миокарда в обоих желудочках. Не было выявлено патоморфологических изменений сердца таких как: апоптоз и некроз кардиомиоцитов, а также воспалительная клеточная инфильтрация. Отчетливо наблюдались пучки продольно выровненных кардиомиоцитов, а также субэпикардиальный и субэндокардиальный слои поперечно срезанных клеток сердечной мышцы (рис. 18 и 19). На продольном срезе кардиомиоциты из левого и правого желудочка оказались эозинофильными, с поперечной исчерченностью и имели одно или два центрально расположенных базофильных ядра. Миофибриллы, по-видимому, окружали ядро и довольно часто отмечались исчерченности в перинуклеарной зоне. Кардиомиоциты разветвлялись и образовывали анастомозы, участвуя таким образом в сложной сети. Каждое отдельное мышечное волокно было окутано эндомизией, состоящим из тонкой соединительной ткани, и перимизием с обильной капиллярной сетью. Отдельные волокна визуализировались не всегда, но ядра фибробластов и фиброцитов идентифицировались среди клеток сердечной мышцы. Ядра фибробластов и фиброцитов были плоскими и окрашивались более интенсивно, чем ядра кардиомиоцитов.

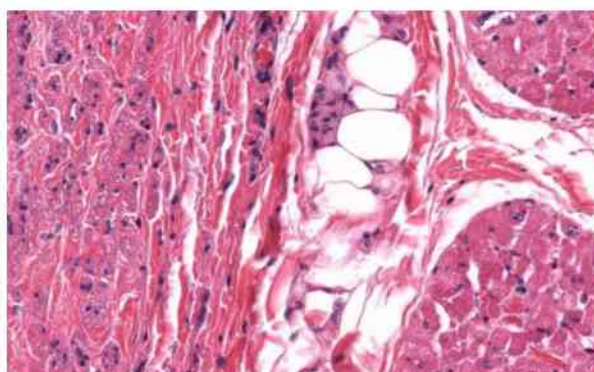


Рисунок 18. Субэндокардиальная соединительная ткань левого предсердия. Окраска гематоксилин-эозином, x100

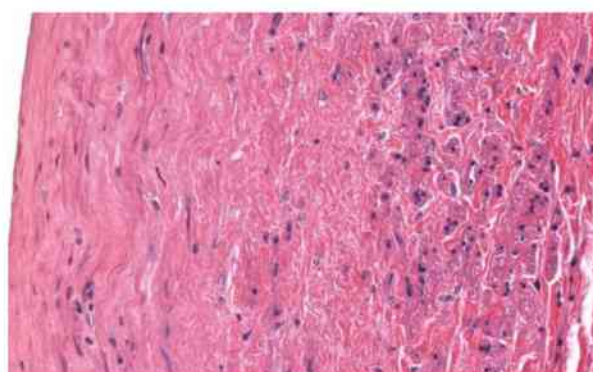


Рисунок 19. Субэндотелиальная соединительная ткань левого предсердия, Окраска гематоксилин-эозином, x100

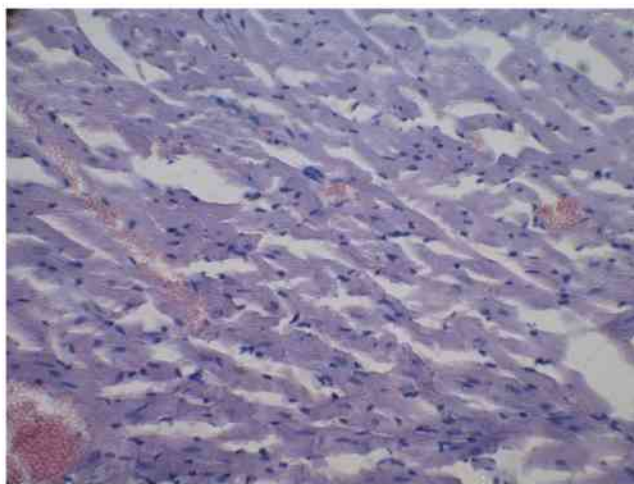


Рисунок 20. Миокард. Окраска гематоксилин-эозином, х400

Макроскопическое исследование не выявило аномальных изменений головного мозга опытной и контрольной групп экспериментальных животных. При гистологическом исследовании было обнаружено 6 слоев нервных клеток, снаружи внутрь располагающиеся в следующем порядке: 1) молекулярный слой; 2) наружный зернистый слой; 3) наружный пирамидный слой; 4) внутренний зернистый слой; 5) внутренний пирамидный слой; 6) полиморфный слой (рис. 21, 22). Исследования показали, что молекулярный слой содержит редкие нейроны слегка вытянутой или овальной формы. Нейроны содержат мелкие ядра. Цитоплазма клетки имеет мелкозернистую структуру. Основной объем молекулярного слоя составляют отростки — аксоны и дендриты. Наружный зернистый слой образован крупными нейронами, имеющими округлую и пирамидальную форму. Нейроны содержат ядра слегка вытянутой или овальной формы. Цитоплазма клетки имеет крупнозернистую структуру. Клетки расположены плотно, образуя четко отделяющийся слой. Наружный пирамидный слой представлен немногочисленными пирамидными нейронами конической формы. Нейроны содержат мелкие ядра, имеющие округлую форму. Цитоплазма клеток имеет гладкую, незернистую структуру. Внутренний зернистый слой содержит мелкие звездчатые клетки. Ядра перикарионов округлой формы, имеют четко выраженную структуру. Цитоплазма в клетке распределена равномерно, без крупных белковых включений. Внутренний пирамидный слой представлен

крупными нейронами (клетки Беца, клетки Мейнерта) и небольшим количеством звездчатых клеток. Клетки Беца самые крупные нейроны коры, которые дают начало миелиновым волокнам пирамидного тракта. Цитоплазма не содержит включений, ядра крупные. Клетки Беца имеют длинный апикальный дендрит, выходящий из вершины пирамиды в вышележащие слои, и другие дендриты, отходящие сбоку и от основания перикариона. От основания пирамиды отходит аксон, уходящий в белое вещество. Клетки Мейнерта – достаточно крупные нейроны, локализованные на протяжении всего V слоя коры полушарий. Клетки имеют пирамидную форму, однако по сравнению с клетками Беца лишены крупных апикальных и боковых дендритов, их ядра относительно крупные. Перикарионы звездчатых нейронов имеют округлую, полигональную. Полиморфный слой образован множеством нейронов различной величины и формы, а также некоторым количеством пирамидных и зернистых нейронов. Клетки располагаются цепочками. Пирамидные нейроны имеют слегка вытянутую форму с заметными удлинениями (рис.21). Ядра небольшие с ровной структурой. Зернистые нейроны имеют округло-угловатую форму. Цитоплазма с крупными белковыми включениями, придающими зернистость внутреннему содержанию клетки. В полиморфном слое также встречались нейроны овальной формы с небольшим апикальным отростком. Контуров клеток ровные, цитоплазма имеет пористую структуру, ядра мелкие.

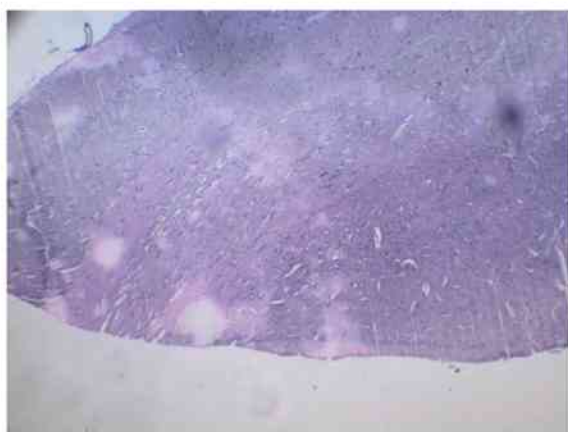


Рисунок 21. Кора больших полушарий. Окраска гематоксилин-эозином, x100

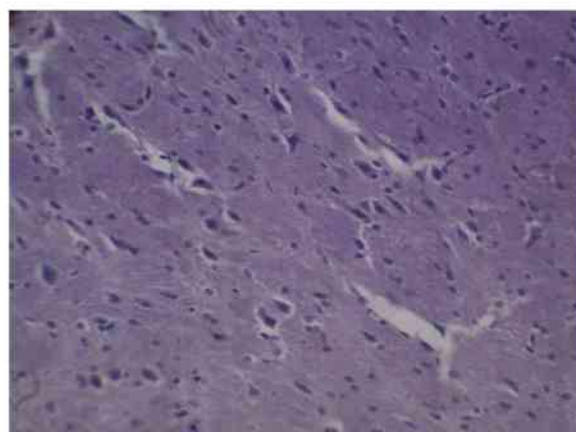


Рисунок 22. Пирамидный слой. Окраска гематоксилин-эозином, x400

3.3. Результаты исследования основных показателей биохимического анализа крови лабораторных животных

Основными внутриклеточными ферментами печени является аспартатаминотрансфераза и аланинаминотрансфераза. Повышение сывороточных уровней как АСТ, так и АЛТ может происходить при состояниях измененной проницаемости гепатоцеллюлярной мембраны. АЛТ обеспечивает интеграцию белкового и углеводного обменов. Аспартатаминотрансфераза, в свою очередь, определен как биохимический маркер повреждения ткани, например сердечной мышцы. Также является маркером интенсивности энергетического обмена и степени его катаболической выраженности. Уровень гамма-глутамилтрансферазы в сыворотке крови является важным параметром для оценки гепатобилиарного пути.

В результате исследования не было выявлено влияния на уровни АСТ и АЛТ, которые считаются чувствительными показателями гепатоцеллюлярного повреждения и в определенных пределах могут дать количественную оценку степени поражения печени. Незначительное изменение ферментов АЛТ, АСТ, ГГТ между контрольными и опытными группами экспериментальных после 14-дневного введения указывает на то, что пептидный препарат не вызывал неблагоприятного токсического эффекта, повреждения печени, сердца, селезенки.

Оценка возможного повреждения почек пептидным препаратом, на основе маточного молочка в данном исследовании проводилась путем определения уровня мочевины и креатинина в плазме крови. Результат показывает отсутствие нарушений работы органа. Согласно полученным данным содержание мочевины у крыс находится в норме, что соответствует правильной работе почек и отсутствию патологий. Креатинин в меньшей степени, чем мочевина зависит от уровня катаболизма. Он в большей степени отражает фильтрационную и выделительную функцию почек. Уровень

креатинина не имел статистически значимых различий у крыс опытной и контрольной группы.

Главной функцией сывороточного альбумина является защита организма от токсических воздействий. При недостатке и уменьшении связывающей его способности увеличивается индекс токсичности, который отражает степень накопления токсического вещества. В свою очередь, общий белок крови характеризует обменные процессы в организме и функции печени. Его уменьшение и увеличение приводит к обезвоживаю, а также серьезным нарушениям организма: заболеванию почек, печени, отравлению токсическими веществами. Биохимический анализ крови крыс показал, что альбумин и общий белок находятся в пределах нормы и у животных отсутствуют вышеперечисленные патологии.

Щелочная фосфатаза содержится почти во всех тканях организма, но преимущественно локализуется в гепатоцитах, в эпителии тонкой кишки, остеобластах. Незначительное изменение содержания щелочной фосфатазы в опытной группе по сравнению с контрольной указывает на то, что пептидный препарат не вызывал неблагоприятного токсического эффекта, так как значения оставались в пределах нормы.

Значения биохимических показателей сыворотки крови у животных опытной и контрольной групп представлены в таблице № 2.

Таблица 2 – Биохимические показатели сыворотки крови у животных опытной и контрольной групп

Показатели	Норма	Значения показателей в группах	
		контроль, n=6	опыт, n=6
Общий белок, г/л	98,0-108,0	100,5±1,2	92±0,5
Мочевина, ммоль/л	8,0-14,0	6,3±0,32	5,9±0,31
АсАТ, ммоль/л	0,8–2,22	1,56±1,33	1,52±1,22
АлАТ, ммоль/л	2,5–3,12	3,0±0,28	2,89±0,77
Креатинин, мкмоль/л	68,0-104,0	94,2±3,3	89,5±1,9
Альбумин, г/л	25–37	29,4±2,4	32,0±0,25

Таблица 2 – Продолжение

Щелочная фосфатаза, Е/л	79–287	113±0,5	119,6±0,88
γ-Глутамилтрансфераза	0-7,5	3,5±0,33	3,8±0,2

3.4 Результаты исследования гематологических показателей опытной и контрольной групп

В ходе исследования были изучены гематологические показатели крови беспородных крыс после введения пептидного препарата, на основе маточного молочка опытной группе и физраствора контрольной группе. Гематологические параметры оценивались для получения дополнительной информации, связанной с токсичностью. Исследования гематологических параметров позволяют легко выявить нарушения обменных процессов организма, а профиль крови обычно дает важную информацию о реакции организма на травму или поражение.

Получены показатели количества лейкоцитов с дифференциальным подсчетом различных форм лейкоцитов, а также эритроцитов и тромбоцитов (табл. 3). В ходе эксперимента не было выявлено отклонений значений гематологических показателей, параметры находятся в пределах физиологической нормы. Индекс сдвига лейкоцитов крови по И.И. Яблучанскому соответствовал норме во всех опытных и контрольных группах.

Таблица 3 – Гематологические показатели у животных опытной и контрольной групп

Показатели, единицы измерения	Значения показателей в группах	
	Контроль, n=6	Опыт, n=6
WBC, $n \times 10^9/\text{л}$	8,8±0,1	8,4±0,2
PLT, $n \times 10^9/\text{л}$	562±18	512±29
RBC, $n \times 10^{12}/\text{л}$	8,3±0,4	9,2±0,2
MON, %	4,5±0,3	3,5±0,1
EOS, %	2,0±0,1	2,5±0,1
N-Segm	26,8±0,4	33,9±0,2

Таблица 3 – Продолжение

N-Stab, %	1,0±0,1	1,5±0,3
BAS, %	0,7±0,1	0,6±0,4
LYM, %	65±0,5	58±0,7

Фотография крыс контрольной и опытной групп выявила нормальную архитектуру с регулярной морфологией различных клеток крови, а именно эритроциты, лимфоциты, полиморфноядерные клетки и тромбоциты распределены и окрашены равномерно. Нейтрофилы сегментоядерные имели округлую форму, с розоватым цветом цитоплазмы, в которой имелись мелкие азурофильные гранулы (рис.23 Г). Ядра разделены на сегменты (3-5), представляли собой переплетение нитей хроматина, окрашены в сине-фиолетовый цвет. Палочкоядерных нейтрофилов было найдено мало. Они имели розовую цитоплазму, вытянутые ядра в виде палочек.

Лимфоциты распознавали по их большому темно-фиолетовому ядру и тонкому кольцу окружающей цитоплазмы (рис.23 Б). Эозинофилы имели сегментированное ядро в виде двух грушевидных сегментов, которые соединены тонким мостиком (рис.23 Д). Цитоплазма ярко-розового цвета, заполненная гранулами желто-оранжевого цвета.

Моноциты представляли собой клетку округлой формы, цитоплазма нежно-голубая с единичной пикнотической зернистостью (рис.23 А). Ядро крупное, с неровными контурами, с ширококиточной хроматиновой сетью.

Базофилы имели бледно-розового цвета цитоплазму, которая содержит крупные зерна (рис.23 В). Ядро неправильной формы, которые содержат гранулы темно-фиолетового цвета.

Тромбоциты представляли собой клетки округлой формы, цитоплазма светло-голубая, ядро овальной формы светло-розового цвета с темно-розовыми краплениями (рис. 23 Е). Агрегированных тромбоцитов найдено не было.

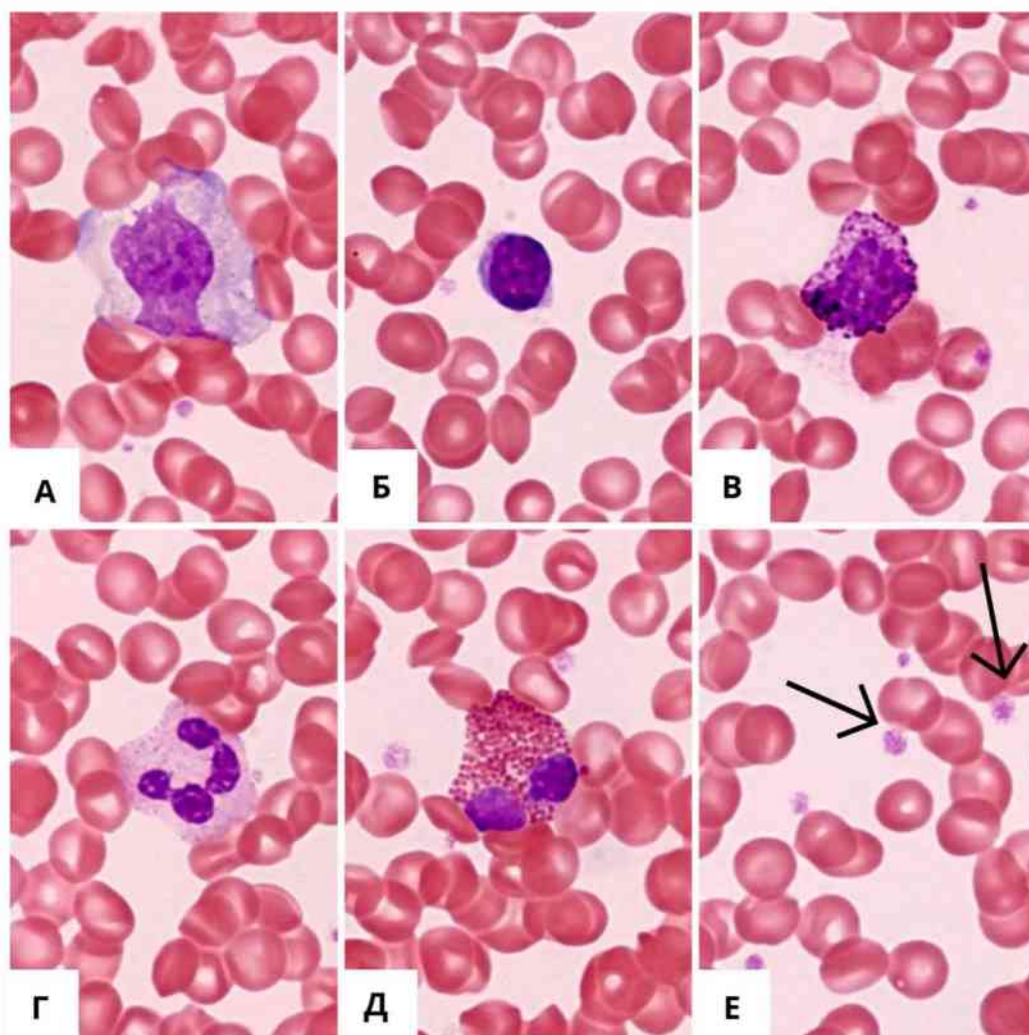


Рисунок 23. Клетки крови: А – моноцит, Б – лимфоцит, В – базофил, Г – нейтрофил сегментоядерный, Д – эозинофил, Е – тромбоциты (показаны стрелкой).

Эритроциты имели розовый цвет цитоплазмы со светлым участком, безъядерные. Большинство из них были округлой формы, но найдены также аномальные формы в опытной и контрольной группе: акантоциты (рис.24). Исходя из литературных данных, в норме незначительная часть клеток также может иметь форму, которая отличается от дисковидной [14], а также аномальные эритроциты часто наблюдаются как артефакты, например вызванные повышенным рН, контактом со стеклом или хранением крови [41].

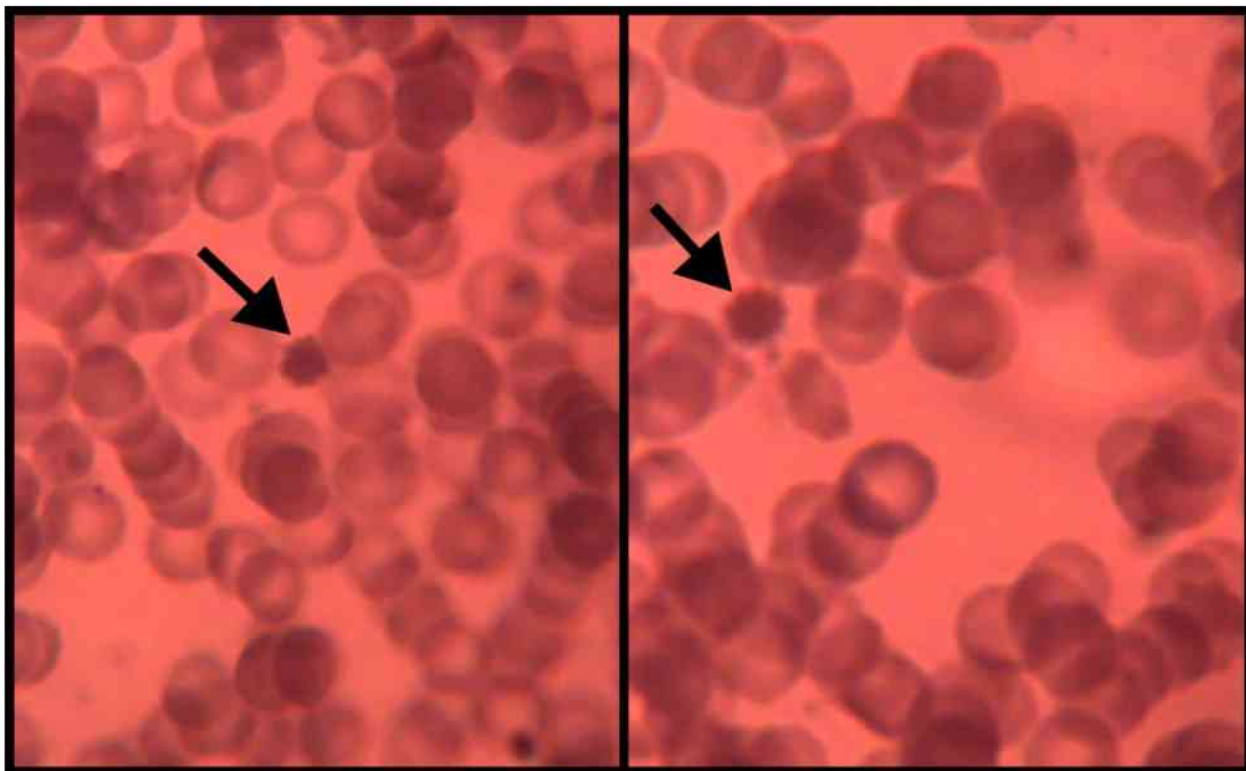


Рисунок 24. Клетки крови – эритроциты. Акантоциты (звездчатые) показаны стрелкой.

В гематологическом анализе выполняли подсчет количества лейкоцитов и эритроцитов в камере Горяева. Гематологический анализ в этом исследовании показал, что оцененное общее количество лейкоцитов и эритроцитов после введения пептидного препарата оставалось в пределах физиологической нормы. Этот результат может указывать на то, что пептидный препарат на основе маточного молочка, в данном исследовании не обладает веществами, способными индуцировать лейкоцитоз и эритроцитоз, которые заключаются в аномально высоком количестве лейкоцитов и эритроцитов в кровообращении или в подавлении их нормальной продукции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в ходе выполнения бакалаврской работы были изучены биохимические показатели крови и проведена патоморфологическая оценка внутренних органов лабораторных животных в рамках доклинических испытаний пептидных препаратов.

Исходя из полученных результатов, можно сделать следующие выводы:

1. Проведена массометрия и расчет массовых коэффициентов в отношении влияния пептидного препарата на печень, сердце, легкие, селезенку, почки, надпочечники, головной мозг. Выполнено макроскопическое исследование органов опытной и контрольной групп, которое не выявило каких-либо аномальных изменений текстуры.

2. Проведено сравнительное патоморфологическое исследование изменений внутренних органов экспериментальных животных под воздействием пептидных препаратов. В результате проведенного патологоанатомического вскрытия, последующих макроскопических и микроскопических исследований установлено, что пептидный препарат, не вызывал каких-либо существенных изменений строения внутренних органов крыс, включая печень, почки, сердце, легкие, головной мозг, селезенку и надпочечники. Признаков токсичности отмечено не было.

3. Изучено и проведено исследование основных показателей биохимического анализа крови лабораторных животных опытной и контрольной групп. В результате, не было выявлено значительных изменений по сравнению с контролем биохимических показателей крови таких как: АСТ, АЛТ, ГГТ, мочевины, креатинина, щелочная фосфатаза, альбумин, общий белок. Это указывает на то, что пептидный препарат при интраназальном введении по 10 мкл/животное в дозе 300 мкг/кг не вызывал неблагоприятного токсического эффекта, так как значения оставались в пределах физиологической нормы.

4. Исследованы гематологические показатели экспериментальных животных. Гематологические параметры оценивались для получения дополнительной информации, связанной с токсичностью. Получены показатели количества лейкоцитов с дифференциальным подсчетом различных форм лейкоцитов, а также эритроцитов и тромбоцитов, а также выполнен анализ подсчета количества лейкоцитов и эритроцитов в камере Горяева. В ходе эксперимента не было выявлено отклонений значений гематологических показателей, результаты оставались в пределах физиологической нормы.

Исследование безопасности пептидного препарата осуществлялось путем проведения общих доклинических экспериментов для выявления потенциальных токсических эффектов. Исходя из результатов, можно сделать вывод о том, что пептидный препарат на основе маточного молочка не обладает токсическими эффектами, и он может быть использован при разработке новых биологически активных добавок и лекарственных средств.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Бабина С.А., Желтышева А.Ю., Шуклин Г.О., Шуклина А.А., Япаров А.Э.. Лекарственные средства на основе пептидов: применение, технологии получения./ С.А. Бабина, А.Ю.Желтышева, Г.О. Шуклин, А.А. Шуклина, А.Э. Япаров // Международный студенческий вестник. 2019. № 3. с. 21.
2. Биохимический практикум: пособие для самостоятельной аудиторной работы студентов, обучающихся по специальности 20400.62 –Биология, профиль Микробиология. Ч. 1 / Ф.Х. Камилов, Ш.Н. Галимов,Э.Ф. Аглетдинов, О.А. Князева, Г.М. Абдуллина, Н.Т. Карягина, А.А. Байгильдина, А.Г. Валиев, Ф.А. Сагидуллин, И.Г. Кулагина, Р.С. Кидрасова, И.А. Меньшикова, Э.Р. Бикметова. – Уфа: Изд-во ГБОУ ВПО БГМУ Минздрава России, 2014. 50-51 с.
3. Вахрушева, Т.И. Патоморфологические методы исследования: учеб. пособие [Электронный ресурс] / Т.И. Вахрушева; Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2019. 144-147 с.
4. ГОСТ Р ИСО 10993-11-2009 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 11. Исследования общетоксического действия. Москва: Стандартинформ. 2009.21 с.
5. ГОСТ Р ИСО 10993-2-2011 Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2 Требования к обращению с животными. Москва: Стандартинформ. 2011. 11-12 с.
6. Кательникова А.Е., Крышень К.Л., Зуева А.А., Макарова М.Н. Интраназальное введение лекарственных средств лабораторным животным./ А.Е. Кательникова, К.Л. Крышень, А.А. Зуева, М.Н. Макарова.// Лабораторные животные для научных исследований. 2019. № 2. с. 1-2.
7. Коржевский Д.Э., Гиляров А.В. Основы гистологической техники / Д.Э.Коржевский, А.В. Гитляров. – СПб: СпецЛит, 2010. 53 с.
8. Корьяк, В. А. Основы гистологической техники : учебное пособие / В. А. Корьяк, Л. А. Николаева; ФГБОУ ВО ИГМУ Минздрава России, Институт сестринского образования. – Иркутск : ИГМУ, 2020. 32-38 с.

9. Лабораторная диагностика малярии и бабезиозов: Методические указания.—М.: ФБУЗ «Федеральный центр гигиены и эпидемиологии» Роспотребнадзора. С. 11-12.
10. Мавликеев М.О. Краткий курс гистологической техники. Учебно-методическое пособие / М.О. Мавликеев, Архипова С.С., Чернова О.Н., Титова А.А., Певнев Г.О., Шафигуллина А.К., Киясов А.П. – Казань: Казан. ун-т, 2020. 17-18 с.
11. Методы гистологической окраски. Каталог ООО «Биовитрум». М., Биовитрум, 2009. С. 31-32.
12. Микротехника: практикум / сост. И. П. Комарова; Яросл. гос. ун-т им. П. Г. Демидова. — Ярославль :ЯрГУ, 2013. 27-28 с.
13. Петушок, Н. Э. Биологическая химия : практикум для студентов факультета иностранных учащихся (специальность 1-79 01 01 «Лечебное дело») [на англ. яз.]. – 6-е изд. = Biochemistry : workbook for the faculty of foreign students (in English) / Н. Э. Петушок, М. Н. Курбат, А. А. Масловская; под общ. ред. проф. В. В. Лелевича. – Гродно : ГрГМУ, 2018. 6-11 с.
14. Полозюк, О.Н. Гематология : учебное пособие / О.Н. Полозюк, Т.М. Ушакова ; Донской ГАУ. - Персиановский : Донской ГАУ, 2019. 159 с.
15. Практикум по нормальной физиологии: Учебно-методическое пособие. Часть II / Н.Н. Хаертдинов, А.С. Блохина, И.Ф. Шайдуллов, К.С. Королёва, Г.Ф. Ситдикова – Казань: КФУ, 2020. 80 с.
16. Руководство по проведению клинических исследований лекарственных средств. Часть первая. – М.: Гриф и К, 2012. 245 с.
17. Смолин, С.Г. Физиология системы крови: метод. указания / С.Г. Смолин, Краснояр. гос. аграр. ун-т. – Красноярск, 2014. 35-38 с.
18. Сорокина А.В., Алексеева С.В., Еремина Н.В., Дурнев А.Д. 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. // Ведомости

Научного центра экспертизы средств медицинского применения. 2019. № 9 (3). с.199-201.

19. 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). с.276-277.

20. Тахмазян В.Г., Полийчук Т.П., Амбарцумян Л.Л., Варюшина Е.А., Александров Г.В., Сазонова Т.А. , Бабич О.С., Матыцин В.О., Королькова Т.Н., Колесова Л.Ю. Изучение воздействия на кожу биodeградируемого филлера./ В.Г. Тахмазян, Т.П. Полийчук , Л.Л. Амбарцумян , Е.А. Варюшина , Г.В. Александров, Т.А. Сазонова, О.С. Бабич, В.О. Матыцин, Т.Н. Королькова, Л.Ю. Колесова. // Экспериментальная и клиническая дерматокосметология, 2012. №3. С. 29-32.

21. Шалагинова И.Г., Шеремет В.В., Хлебаева Д.А., и др. Влияние длительного эмоционально-болевого стрессорного воздействия на лейкоцитарный состав крови крыс с различным уровнем возбудимости нервной системы // Медицинский академический журнал. 2019. Т. 19. № 4. С. 69.

22. Яблучанский Н.И., Пилипенко В.А., Кондратенко П.Г. Индекс сдвига лейкоцитов крови как маркер реактивности организма при остром воспалении // Лабораторное дело. 1983. № 1. С. 60–61.

23. Adeyemi, O.T., et al. Alkaline Phosphatase (ALP), Aspartate Aminotransferase (AST) and Alanine Aminotransferase (ALT) Activities in Selected Tissues of Rats Fed on Processed Atlantic Horse Mackerel (*Trachurus trachurus*)/ O.T. Adeyemi, et al.// Advances in Bioscience and Biotechnology, – 2015. № 6. pp. 143-144.

24. Bancroft, J. D., Gamble, M. Theory and practice of histological techniques/ J. D.Bancroft, M. Gamble. // London: Churchill Livingstone, 2002. 5th ed., pp. 150–152.
25. Burlikowska K., Boguslawska-tryk M., Szymeczko R., Piotrowska A. Haematological and biochemical blood parameters in horses used for sport and recreation./ K. Burlikowska, M. Boguslawska-tryk, R. Szymeczko, A. Piotrowska. // Journal of Central European Agriculture. 2015. № 16 (4). pp.373-374.
26. Chineke, C. A., Ologun, A. G., Ikeobi, C. O. N. Ikeobi. Haematological parameters in rabbit breeds and crosses in humid tropics./ C.A.Chineke, A.G. Ologun, C.O.N.// Pakistan Journal of Biological Sciences. 2006. № 9 (11). –c. 2102-2106.
27. Chughtai M. F. J., Mehmood T., Liaqat A., Khaliq A. Bioactive Peptides; Physiological Benefits and Commercial Applications./ M. F. J. Chughtai, T. Mehmood, A. Liaqat, A. Khaliq. // Dairy and Vet Sci J. 2019. № 12 (2). pp.1-2.
28. Danquah M.K, Agyei D. M.K. Danquah, D. Agyei. Pharmaceutical applications of bioactive peptides./ M.K. Danquah, D. Agyei. // Medical Biotechnology, 2012. № 1 (2). p.5.
29. Debelo N, Afework M, Debella A, Makonnen E, Ergete W. Assessment of Hematological, Biochemical and Histopathological Effects of Acute and Sub-chronic Administration of the Aqueous Leaves Extract of *Thymus schimperi* in Rats./ N.Debelo, M. Afework, A. Debella, E. Makonnen, W. Ergete. // Journal of Clinical Toxicology. 2016. Vol.6. № 2. pp.5-7.
30. Diao L., Meibohm B. Pharmacokinetics and pharmacokinetic-pharmacodynamic correlations of therapeutic peptides./ L. Diao, B. Meibohm. //Clin Pharmacokinet, 2013. №52 (10). pp. 855–858.
31. Gary Walsh. Pharmaceutical biotechnology : concepts and applications. 2007. 499 p.
32. Grymak Y.I. Effect of endotoxemia on the morphological and biochemical blood indices of pregnant cows./ Y. I. Grymak.// The Animal Biology, 2015. Vol.17. № 4. pp. 50-51.

33. Haggag Y. A., Donia A. A., Osman M. A., El-Gizawy S. A. Peptides as Drug Candidates: Limitations and Recent Development Perspectives./ Y. A. Haggag, A. A. Donia, M. A. Osman, S. A. El-Gizawy. // Biomedical Journal of Scientific & Technical Research. 2018. p.6661.
34. Honek J. Preclinical research in drug development./ J. Honek.// Communications Consulting & Medical Writing. –2017.– Vol.26. –№ 4. – pp.5-7.
35. Huang D, Ou B, Prior R.L. The chemistry behind antioxidant capacity assays./ D. Huang, B. Ou, R.L. Prior. //J Agri Food Chem. 2005. № 53 (6). pp.1842-1845.
36. Huang, W., Percie du Sert, N., Vollert, J., Rice, A.S.C. General Principles of Preclinical Study Design. In: Bernalov, A., Michel, M., Steckler, T. (eds) Good Research Practice in Non-Clinical Pharmacology and Biomedicine. Handbook of Experimental Pharmacology. 2019. Vol.257. pp.55-57.
37. ICH guideline S6 (R1) – preclinical safety evaluation of biotechnology-derived pharmaceuticals. Committee for medicinal products for human use (CHMP). 2011. p.22.
38. Illum L. Nasal drug delivery - recent developments and future prospects. / L. Illum// J Control Release, 2012. Vol.2. № 161. pp.254-255.
39. Iwuji, T. C., Herbert, U. Haematological and serum biochemical characteristics of rabbit bucks fed diets containing garcimiola kola seed meal./ T.C. Iwuji, U. Herbert.// Proceedings of 37th Annual Conference of Nigerian Society for Animal Production. 2012. c.87-89.
40. Khalifa F. Quantitative Determination of Creatinine in Serum./ F. Khalifa.// European Journal of Clinical Research. 2014. Vol.6. № 4. pp. 102-103.
41. Kliegman R. M. Paroxysmal Nocturnal Hemoglobinuria and Acanthocytosis./ R. M. Kliegman.// in Nelson Textbook of Pediatrics, 2020.
42. Kovalainen M., Mönkäre J., Riikonen J., Pesonen U., Vlasova M, Salonen J., Lehto V., Järvinen K., Herzig K. Novel Delivery Systems for Improving the Clinical Use of Peptides / M. Kovalainen, J. Mönkäre, J. Riikonen, U. Pesonen, M. Vlasova, J. Salonen, V. Lehto, K. Järvinen, K. Herzig. Kovalainen M., Mönkäre J.,

- Riikonen J., Pesonen U., Vlasova M., Salonen J., Lehto V., Järvinen K., Herzig K.// Article in Pharmacological Reviews, 2015. № 67. pp.547-548.
43. Leader B., Baca Q. J., Golan D. E. Protein Therapeutics: a summary and pharmacological classification./ B. Leader, Q.J. Baca, D.E. Golan. Leader B., Baca Q. J., Golan D. E.// Nature Rev. Drug Discov. 2008. №7 (1). pp.21-25.
44. Lin K.H. Pharmacokinetics of biotech drugs: peptides, proteins and monoclonal antibodies./ J. H. Lin.// Curr Drug Metab. 2009. №10 (7). pp.661-672.
45. Loboda A.N., Markevich V.E. The Gamma-Glutamyl Transpeptidase Contents in Serum and Urine in Newborn as an Indicator of Disturbance Kidney Function Due to Asphyxia./ A.N. Loboda, V.E. Markevich.// Clinical medicine. 2014. Vol.6. № 4. pp. 102-103.
46. Olaniyan B. A., Zhao X., Mustafa A.F. Determination of caprine serum albumin in milk using bromocresol green dye./ B. A. Olaniyan, X. Zhao, A. F. Mustafa.// Open Journal of Animal Sciences. 2013. Vol.3. № 3. pp. 261-267.
47. Ozsoy Y, Gungor S, Cevher E. Nasal delivery of high molecular weight drugs./ Y. Ozsoy, S. Gungor, E. Cevher.// Molecules. 2009. №14 (9). pp. 3754–3765.
48. Patton J.S., Byron P.R. Inhaling medicines: delivering drugs to the body through the lungs./ J.S.Patton, P.R. Byron.// Nat Rev Drug Discov. 2007. №6. pp.67-71.
49. Preeti P., Suresh J. Estimation of Serum Creatinine by Routine Jaffé's Method and by Dry Chemistry in Icteric and Hemolytic Serum Samples./ P. Preeti, J. Suresh.// International Journal of Medical Research & Health Sciences. 2017. Vol.6. № 3. pp. 68-69.
50. Richter W.F., Bhansali S. G. , Morris M. E. Mechanistic Determinants of Biotherapeutics Absorption Following SC Administration./ W. F. Richter, S. G. Bhansali, M. E. Morris. Richter W.F., Bhansali S. G. , Morris M. E.// The AAPS Journal. 2012. №14 (3). pp.560 -566.
51. Said V. S., Stybel V. V., Gytyj B. V., Pryima O. B., Sobolta A. G., Leskiv K. Y. Morphological parameters of dogs' blood under experimental toxocariasis./

- V.S Said, V.V. Stybel , B.V. Gytyj, O.B. Pryima, A. G. Sobolta, K.Y. Leskiv. // Veterinary science «Colloquium-journal». 2020. № 23 (75).
52. Sayani A.P, Chien Y.W. Systemic delivery of peptides and proteins across absorptive mucosae./ A.P. Sayani, Y.W. Chien. // Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1996. №13. pp.185 -189.
 53. Shai Y. Mechanism of the binding, insertion and destabilization of phospholipid bilayer membranes by α -helical antimicrobial and cell non-selective membrane-lytic peptides./ Y. Shai. // Biomembrane. 1999. Vol.1452. № 1. pp.57-60.
 54. Siddiqui O., Chien Y.W. Nonparenteral administration of peptide and protein drugs./ O. Siddiqui, Y.W. Chien // Crit Rev Ther Drug Carrier Syst. 1987. Vol.3. № 3. pp. 196-197.
 55. Soetan, K. O., Akinrinde, A. S., Ajibade, T. O. Preliminary studies on the haematological parameters of cockerels fed raw and processed guinea corn (*Sorghum bicolor*)/ K. O Soetan, A. S. Akinrinde, , T. O. Ajibade. // Proceedings of 38th Annual Conference of Nigerian Society for Animal Production. 2013. c.49-52.
 56. Steinmetz, K.L., Spack, E.G. The basics of preclinical drug development for neurodegenerative disease indications./ K. L. Steinmetz, E. G. Spack.// Proceedings of the 2009 Drug Discovery for Neurodegeneration Conference. 2009. Vol.9. № 1. pp.1-4.
 57. Tahanovich A.D., Kotovich I.L., Kolb A.V. Practical Biochemistry/ A.D. Tahanovich, I.L. Kotovich, A.V. Kolb; translated from Russian by T.F. Danilova. – Minsk : BSMU, 2013. 6-8 p.
 58. Tang L., Persky A.M., Hochhaus G., Meibohm B. Pharmacokinetic aspects of biotechnology products./ L. Tang, A.M. Persky, G. Hochhaus, B. Meibohm.// J Pharm Sci. 2003. №93 (9). pp.2184-2191.
 59. Titov M.I. Medical preparations based on synthetic peptides./ M. I. Titov.// Bulletin of St. Petersburg University 2013. №4. pp.86-87.

60. Tussupbekova G.A., Tuleuhanov S.T., Ablaihanova N., Kydyrmanov A.L., Kozhamzharova A.S., Rakhmetova A.M. Research of biochemical and hematological parameters of blood of Caspian seals./ G.A. Tussupbekova, S.T. Tuleuhanov, N. Ablaihanova, A.I. Kydyrmanov, A.S. Kozhamzharova, A.M. Rakhmetova.// Vestnik KazNMU, 2018. № 2. pp.218-219.
61. Van der Maaden K., Jiskoot W., Bouwstra J. Microneedle technologies for (trans) dermal drug and vaccine delivery./ K. van der Maaden, W. Jiskoot, J. Bouwstra J.// J Control Release, 2012. Vol.2. № 161. pp.645-647.
62. Venkatesan N, Ramanathan M. Preclinical Toxicity Studies-Tool of Drug Discovery./ N.Venkatesan, M. Ramanathan.// Pharmacovigilance and Pharmacoepidemiology. 2017. Vol.1. №1. pp.6-7.
63. Veuillez F., Kalia Y.N, Jacques Y., Deshusses J., Buri P. Factors and strategies for improving buccal absorption of peptides./ F. Veuillez, Y.N Kalia, Y. Jacques., J. Deshusses, P.Veuillez F., Kalia Y.N, Jacques Y., Deshusses J., Buri P. // Eur J Pharm Biopharm. 2001. №52 (2). pp.93-97.
64. Wang J., Hu J., Cui J., Bai X., Du Y., Miyaguchi Y., Lin B. Purification and identification of a ACE inhibitory peptide from oyster proteins hydrolysate and the antihypertensive effect of hydrolysate in spontaneously hypertensive rats./ J. Wang, J. Hu, J. Cui, X. Bai, Y. Du, Y. Miyaguchi, B. Lin. //Food Chem. 2008. № 111 (2). p.303-307.
65. Werle M, Bernkop-Schnürch A. Strategies to improve plasma half life time of peptide and protein drugs./ M. Werle, A. Bernkop-Schnürch.// Amino Acids. 2006. №30 (4). pp. 351-355.