

УДК 619:611.636.4

Жила М. І., к. вет. наук, доцент, ©*Державний науково-дослідний контрольний інститут ветеринарних препаратів та кормових добавок***ЛАБОРАТОРНІ ДОСЛІДЖЕННЯ ПРИ КЛІНІЧНОМУ ВИПРОБУВАННІ ВЕТЕРИНАРНИХ ЛІКАРСЬКИХ ЗАСОБІВ**

У статті аналізується значення лабораторних методів дослідження, зокрема патоморфологічного при проведенні клінічних випробувань (досліджень). Акцентується увага на комплексній лабораторній діагностиці при визначенні клінічного стану тварини, безпечності та ефективності досліджуваного лікарського засобу.

Ключові слова: клінічні випробування, ветеринарні препарати, патоморфологія, біологічний матеріал.

Сучасна ветеринарна медицина використовує великий арсенал різноманітних препаратів, біологічно активних кормових добавок, що застосовуються з лікувальною або профілактичною метою. Бурхливий ріст фармацевтичної індустрії на початку минулого століття зумовив серйозні вимоги щодо контролю якості, безпеки та ефективності нових лікарських засобів [3, 12, 13, 29].

Ряд європейських країн, США, Австралія, Японія створили свої правила контролю за якістю й ефективністю фармацевтичних засобів, які увійшли в систему правил: Належної Лабораторної Практики (GLP), Належної Виробничої Практики (GMP) та Належної Клінічної Практики (GCP).

Клінічне випробування (дослідження) представляє собою науковий експеримент, що проводиться на цільових тваринах для виявлення клінічних, фармакологічних ефектів, побічних реакцій та/або для вивчення усмоктування, розподілу, метаболізму та виведення досліджуваного ветеринарного лікарського засобу з метою підтвердження його безпечності та/або ефективності.

Лабораторна діагностика є важливою складовою у процесі клінічного випробування ветеринарних препаратів та кормових добавок. За допомогою гематологічних, біохімічних, патоморфологічних, імунологічних та інших методів досліджень проводиться діагностика загального клінічного стану тварини, контролюється вплив ветеринарних лікарських засобів та кормових добавок на організм, визначається прогноз захворювання, а також ефективність проведеного лікування. Дослідник поряд із даними анамнезу та клінічного обстеження тварини, повинен обов'язково проводити і враховувати результати лабораторних аналізів при визначенні клінічного стану, встановленні діагнозу в хворих, які будуть задіяні у клінічних випробуваннях [2, 7, 17, 32].

Лабораторні дослідження [2, 5, 17, 19] можуть бути загальними, для оцінки статусу цілого організму (загальний аналіз крові, сечі) або спеціальними, для встановлення морфофункціонального стану окремих органів чи систем організму (ниркові, печінкові тести, показники імунної системи тощо).

Матеріалом для лабораторних досліджень є кров, сеча, молоко, вміст рубця, шлунковий сік, кал, слина, ліквор, шматочки органів і тканин та інші біологічні субстрати організму тварин. Достовірність отриманих результатів буде залежати як від правильності відбору (час та методи взяття, використання антикоагулянтів чи консервантів), зберігання та доставки біологічного матеріалу в лабораторію, так і від безпосереднього проведення аналізів [4, 15, 24, 30].

Результати досліджень біологічного матеріалу в здорових тварин можуть залежати від виду тварини, породи, статі, віку, фізіологічного стану, а також методів дослідження. Інтерпретацію отриманих результатів здійснюють у порівнянні до фізіологічних коливань певних показників для даного виду тварини [1, 7, 9, 10].

При виборі методів, переліку показників лабораторних досліджень, досліднику потрібно проаналізувати та врахувати результати отриманні при доклінічному вивченню впливу досліджуваних препаратів, лікарських субстанцій чи кормових добавок на організм експериментальних тварин [3, 16].

Серед різних методів лабораторної діагностики часто проводять патоморфологічні дослідження, які є необхідним етапом у вивченні біологічної реакції організму тварини на дію ветеринарних лікарських засобів і дозволяють, у переважній більшості випадків, скласти точне уявлення про характер і важкість перебігу патологічного процесу, встановлення лікувального ефекту чи іншого очікуваного результату внаслідок дії досліджуваного ветеринарного препарату, кормової добавки тощо [12, 13, 16].

Завдяки сучасному обладнанню та методів імуногістохімії, стала можливою візуалізація будь-якого біологічного процесу в організмі від макроскопічного до субмікроскопічного і молекулярного рівнів, внаслідок чого морфологічні дослідження набули самостійного і базового характеру при обстеженні організму [14, 20, 22].

Необхідність застосування патоморфологічних досліджень виникає як на початкових фазах проведення клінічних випробувань — при встановленні морфофункціонального стану організму в цілому (гомеостазу), виявленні безпечності лікарського препарату на організм тварини, вплив різних доз препарату на основні фізіологічні показники організму, а також при встановленні діагнозу у хворих тварин, для лікування яких передбачається використання досліджуваного препарату. Так і на кінцевих стадіях (фазах) клінічних випробувань, де уточнюються особливості дії препарату, визначаються можливі побічні реакції та ступінь їх важкості, удосконалюється дозування та термін лікування для отримання бажаного ефекту. Обов'язковим є проведення патоморфологічних досліджень при контрольному забої тварин під час експерименту в динаміці або тварин, що загинули в часі проведення клінічних випробувань [3, 16, 29].

Перед проведенням патоморфологічного дослідження завжди потрібно чітко з'ясувати клінічний стан тварини. Бо саме клініко-анатомічний підхід у діагностиці дає можливість не тільки констатувати виявлені патологоанатомічні зміни, а й пояснити патогенетичні механізми [1, 6, 22, 23, 31].

Вплив на організм патогенних чинників внутрішнього чи зовнішнього походження призводить спочатку до пошкодження структурних компонентів клітини і порушенню її функції, а в подальшому можливий розвиток як патології окремої клітини, так і цілої групи клітин. Патологія клітини, або целюлярна патологія — є структурною основою всієї патології живого організму в цілому. Сучасними методами дослідження чітко встановлено, що будь-який патологічний процес має поетапний розвиток, починаючи з порушень молекулярної будови, структурних змін на субклітинному, клітинному, тканинному, органному та системному рівнях, що в свою чергу призводить до функціональних розладів. Не існує жодного антигена (пошкоджуючого чинника), який не викликав би структурні зміни. Важливо зауважити, що початкові стадії патологічного процесу, проявляються тільки на рівні ультраструктури клітини і є, як правило, зворотні або можуть бути компенсовані. Знання клітинної патології допомагає досліднику розуміти морфологічну сутність патологічного процесу, що відбувається в тканинах і органах, розпізнавати кількісні і якісні морфологічні зміни ультраструктур клітин, та дозволяє інтерпретувати функціональні зміни [7, 15, 21, 22].

За умов проведення морфометричного аналізу необхідно використовувати набір морфологічних ознак для кількісної характеристики патологічного процесу, конкретно для кожного органу чи тканини. В таких випадках розробляються тест-системи (алгоритм дослідження), за допомогою котрих можна провести оцінку місцевої та загальної дії препарату. Якісні дані світлової мікроскопії (опис гістопрепаратів) співставляються з результатами кількісних морфометричних показників, що дозволяє об'єктивно відобразити морфологічні, функціональні зміни окремих клітин, тканин, органів та систем організму. При вивченні морфофункціонального стану органів і тканин потрібно враховувати дані фармакокінетики та фармакодинаміки досліджуваних препаратів чи субстанцій. В першу чергу, критичними є органи які відповідають за детоксикаційну та видільну функцію організму (наприклад, печінка є основним органом в якому відбувається детоксикація різних екзо- і ендогенних субстанцій, в тому числі і ліків). Дані макроскопічних спостережень завжди повинні корелювати з результатами мікроскопічних досліджень [14, 16, 30].

Методи патоморфологічних досліджень: розтин трупів, дослідження біопсійного матеріалу, цитологічні дослідження мазків, мазків-відбитків.

Метою проведення патологоанатомічного розтину є як встановлення морфологічних змін в органах і тканинах, так і відбір матеріалу для подальших лабораторних досліджень. Під час розтину трупів тварин, нерідко виникає необхідність підтвердити або встановити діагноз за допомогою гістологічного, бактеріологічного, вірусологічного, хімічного або інших лабораторних досліджень. Патологічний матеріал відбирають якнайшвидше після смерті

тварини, оскільки внаслідок автолізу і розкладання трупа він може стати непридатним для досліджень. Залежно від походження, патологічний матеріал умовно можна розділити на: трупний, боєнський, експериментальний, післяопераційний, біопсійний [14, 24].

Дослідження біопсійного матеріалу дозволяє діагностувати приховані патологічні процеси, розпізнати різні за формою й етіологією запальні та незапальні процеси, виявити на ранніх стадіях розвитку злоякісні пухлини за допомогою гістологічних, гістохімічних, імунофлюоресцентних і електронномікроскопічних методів [5, 18, 24].

Залежно від способу взяття матеріалу, а також наявності інструментів, у ветеринарній медицині застосовують аспіраційну пункцію (пункційну аспіраційну біопсію) та біопсію, яку виконують під контролем ультразвукового приладу чи лапароскопу. Аспіраційна пункція, як метод прижиттєвого одержання ізольованих клітин з подальшим виготовленням і фарбуванням мазка для цитологічних досліджень, полягає в аспірації клітин органа чи тканини. Її проводять переважно без анестезії, як частину загального клінічного обстеження.

У ветеринарній практиці найчастіше використовується біопсія печінки, нирок, органів кровотворення та імунної системи. Дослідження гемопоезу при різних фізіологічних та патологічних станах слід оцінювати на основі показників як периферичної крові, так і пунктатів кісткового мозку і селезінки.

Крім того у ветеринарній медицині широко впроваджене і часто застосовується цитологічне дослідження. Цитологічна діагностика включає в себе техніку взяття, фарбування і мікроскопію клітин, отриманих з живого організму для постановки або уточнення клінічного діагнозу. Відомо два способи отримання клітин з живого організму: цитологія ексфоліативна (злущення) і аспіраційна [12, 13, 22, 28].

Цитологія ексфоліативна передбачає дослідження злущених клітин, які переважно містяться у виділеннях з носової порожнини, статевих органів. До цієї категорії належить також виконання препаратів відбитків з поверхні шкіри (скребок), слизових оболонок, з поверхні і розрізу внутрішніх органів, дослідження клітинного складу вмістимого суглобових порожнин, черевної, грудної порожнин тіла.

При виявленні макроскопічних змін в органах чи тканинах необхідно провести гістологічне (патогістологічне) дослідження. Гістологічне дослідження значною мірою доповнює макроскопічне і дає можливість поставити правильний діагноз. Відправляючи матеріал для проведення гістологічних досліджень, потрібно пам'ятати, що результати дослідження залежатимуть, у першу чергу, від якості гістопрепаратів, на що безпосередньо впливає спосіб відбирання та фіксація вихідного матеріалу [14, 18, 24, 30].

З науковою, інколи діагностичною метою, виникає необхідність у гістохімічних, імуногістохімічних та імуноферментних методах досліджень, ПЛР-діагностиці.

Таким чином, доказ безпечності та ефективності ветеринарних препаратів, кормів та кормових добавок, на різних стадіях (фазах) клінічного випробування, на

цільових тваринах можна отримати тільки після результатів комплексних лабораторних досліджень, які повинні обов'язково включати патоморфологічні.

При виборі тварин для клінічних досліджень лабораторні методи діагностики дозволяють встановити загальний клінічний стан досліджуваних тварин, при необхідності проведення експерименту із залученням хворих тварин, правильно поставити діагноз [2, 10, 11, 17].

Використання традиційних та сучасних методів патоморфологічних досліджень при клінічних випробуваннях ветеринарних лікарських засобів дає можливість всебічно оцінювати стан організму на різних його рівнях та одержати інформацію щодо морфологічних змін, які виникають і розвиваються в клітинах, тканинах, органах і системах організму.

Проведення таких досліджень вимагає застосування різних підходів та методів, які в кінцевому результаті, можуть вказати, в першу чергу на важко вловимі ознаки дії препаратів на окремі клітини чи структури організму, діагностувати так званий преморбідний стан організму (передпатологічний), а також негативні зміни, що є важливим для виявлення побічних реакцій лікарського засобу. Правильне проведення патоморфологічних досліджень прискорює розробку нових високоефективних, безпечних ветеринарних препаратів, кормових добавок і створює передумови для визначення оптимальних доз, способу і тривалості застосування, часу та шляхів виведення діючої субстанції з організму тварини [8, 16, 26, 29].

Література

1. Апатенко В. М. Общая паразитология. /В. М. Апатенко. – Харьков. – 2005. – 152 с.
2. Ветеринарна клінічна біохімія / В. І. Левченко, В.В. Влізло, І. П. Кондрахін та ін., / За ред. В. І. Левченка і В. Л. Галяса. - Біла Церква, 2002. - 400с.
3. Доклінічні дослідження ветеринарних лікарських засобів / І. Я. Коцюмбас, О. Г. Малик, І. П. Патерега та ін.; За ред. І. Я. Коцюмбаса. — Львів: Тріада плюс, 2006. — 360 с.
4. Єсіна Е. В. Значення патоморфологічних досліджень у діагностиці захворювань тварин / Е. В. Єсіна, М. К. Потоцький // Ветеринарна медицина України. – 2007. – № 3. – С. 27-29.
5. Застосування біопсії у ветеринарній медицині (методичні рекомендації) /Влізло В. В., Максимович І. А., Данкович Р. С., Стронський Ю.С. - Київ, 2006. - 40 с.
6. Зон Г. А. Патологоанатомічний розтин тварин / Г. А. Зон, М. В. Скрипка, Л. Б. Івановська. – Донецьк, 2009. – 189с.
7. Карпуть И. М. Гематологический атлас сельскохозяйственных животных / И. М. Карпуть. — Минск: Ураджай, 1986. — 183 с.
8. Клинические испытание лекарств / Мальцев В. И., Ефимцева Т. К., Белоусов В. Н. и др.; под ред. В. И. Мальцева. - К.: Морион, 2002. - 352 с.
9. Клінічна діагностика внутрішніх хвороб тварин / В. І. Левченко, В. В. Влізло, І. П. Кондрахін та ін.; за ред. В. І. Левченка. — Біла Церква, 2004. — 608 с.
10. Клиническая лабораторная диагностика в ветеринарии: Справочное издание / И. П. Кондрахин, Н. В. Курилов, А. Г. Малахов и др. —

М.: Агропромиздат, 1985. — 287 с.

11. Колб В.Г. Клиническая биохимия. Минск: Беларусь.- 1976. - С.150-160.
12. Комплексна оцінка впливу ветеринарних препаратів на морфофункціональний стан імунної системи: Методичні рекомендації /Коцюмбас І. Я., Коцюмбас Г. І., Голубій Є. М. та ін. –Львів, 2009. – 63 с.
13. Контроль впливу ветеринарних лікарських засобів на стан імунітету тварин / Косенко М. В., Коцюмбас І. Я., Косенко Ю. М. та ін.// Ветеринарна медицина України. – 2004. №1. – С. 43-44.
14. Красніков Г. А. Патоморфологічні дослідження при вивченні інфекційних захворювань // Ветеринарна медицина України. – 2002. – № 9. – С. 12-13.
15. Коцюмбас Г. І., Жила М. І., Щербатовська О. М. Порядок проведення патоморфологічного дослідження при діагностиці захворювань птиці // Ветеринарна медицина України. – 2011, № 3. – С. 23-26.
16. Коцюмбас І. Я., Коцюмбас Г. І. Особливості морфологічних досліджень при вивченні токсичності нових лікарських засобів // Вісник БДАУ. - 36. Наук.прць. - Біла Церква, 2000. — Вип. 13, Ч. 2. С. 79-84.
17. Лабораторна діагностика у ветеринарній медицині (довідник) /В.В. Влізло, І. А. Максимович, В. Л. Галяс, М. І. Леню - Львів, 2008. - 92с.
18. Меркулов Г. А. Курс патологистологической техники / Г. А. Меркулов. – Л.: Медицина. – 1969. – 423с.
19. Меньшиков В. М. Лабораторные методы исследования в клинике / В. М. Меньшиков, Л. Н. Делекторская, Р. П. Золотницкая. — М.: Медицина, 1987. — 368 с.
20. Морфофункциональные исследования в гигиене / Бонашевская Т. И., Беляева Н. И., Кумпан Н. Б., Панасюк Л. В.- М., Медицина, 1984. - 65 с.
21. Новиков Д. К., Новиков В. И. Клеточные методы иммунодиагностики. - Минск “Белорусь”, 1979. - 222 с.
22. Патологічна анатомія тварин / За редакцією П. П. Урбановича, М. К. Потоцького. – Київ, Ветінформ. – 2008. – 880 с.
23. Патологоанатомическая диагностика болезней птиц / Под ред. В. П. Шишкова, А. В. Акулова, Н. А. Налетова. – М.: Колос, 1978. – 440 с
24. Потоцький М. К. Основи гістопатологічної техніки (методичні вказівки) / М. К. Потоцький. - Київ, 2001. - 66 с.
25. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ /Арзамасцев Е. В., Бабаян Э. А., Белоусов Ю. Б. и др.; под ред. Р. У. Хабриева. - М.: Медицина, 2005. - 832 с.
26. Руководство по клиническим испытаниям лекарственных веществ /под ред. О. В. Стефанова, В. И. Мальцева, Т. К. Ефимцевой. – К.: Авицена, 2001. – 426 с.
27. Фізіолого-біохімічні методи досліджень у біології, тваринництві та ветеринарній медицині (довідник). – Львів, 2004. – 399с.
28. Чумаченко В. Ю., Чумаченко В. В., Павленко О. Дослідження імунної системи (механізми захисту). Ветеринарна медицина України. – 2004. №4. – С. 26-28.
29. Good Clinical Practice for the Conduct of Clinical Trials on Veterinary Medicinal Products in the uropean Union /Directive 81/852/EEC as amended
30. Choroby drobiu /Pod red. M. Mazurkiewicza. – Wroclaw, 2005. – 789 s.

31. Rotkiewicz T. Patomorfologiczne metody badania zwierzat. – Wyd. ART Olsztyn 1990. – 138 s.

32. Winnicka A. Wartosci referencyjne podstawowych badan laboratoryjnych w weterynarii. – Warszawa, 1997. – 115 s.

Summary

Zhyla M. I.

State Scientific-Research Control Institute of Veterinary Medicinal Products and Feed Additives, Lviv, Ukraine

**LABORATORY RESEARCH AT THE CLINICAL TRIALS OF
VETERINARY MEDICINAL PRODUCTS**

The article analyses the importance of laboratory test methods, namely pathomorfological at conduct of clinical trials. The article focuses on complex laboratory diagnostics at determination of clinical condition of animals, safety and efficacy of tested medicinal product.

Рецензент – д.вет.н., проф. Гуфрій Д.Ф.