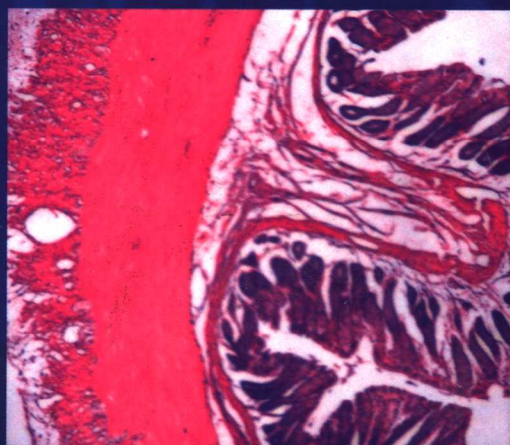


SHIYAN
BINGLI XUE
CAISE TUPU

医学图谱系列

实验病理学彩色图谱

周光兴 谢家骏 漆畹生 富群华 编 著



SHIYAN

BINGLI XUE

CAISE TUPU

医学图谱系列

实验病理学彩色图谱

周光兴 谢家骏 漆畹生 富群华 编 著

图书在版编目(CIP)数据

实验病理学彩色图谱/周光兴等编著. —上海:复旦大学出版社,
2005.1
ISBN 7-309-04280-8

I. 实… II. 周… III. 实验动物-药物-毒性实验-图谱
IV. R965.3-64

中国版本图书馆CIP数据核字(2004)第122979号

实验病理学彩色图谱

周光兴 谢家骏 漆晚生 富群华 编著

出版发行 复旦大学出版社

上海市国权路579号 邮编 200433

86-21-65118853(发行部) 86-21-65109143(邮购)

fupnet@fudanpress.com <http://www.fudanpress.com>

责任编辑 宫建平

装帧设计 陈萍

总编辑 高若海

出品人 贺圣遂

印刷 江苏扬中市印刷有限公司

开本 787×1092 1/16

印张 15.75

字数 373千

版次 2005年1月第一版第一次印刷

印数 1—2100

书号 ISBN 7-309-04280-8/R·876

定价 158.00元

如有印装质量问题, 请向复旦大学出版社发行部调换。

版权所有 侵权必究

内 容 提 要

本专著共分4章,以彩图为主,配以精练的文字。第一章阐述实验病理学的观察方法及原则,第二章介绍受试动物组织常见病变及分类,第三章重点叙述动物各系统组织一般毒性病变,其中包括心血管系统、消化系统、呼吸系统、泌尿系统、生殖系统、内分泌系统、神经系统以及皮肤与眼毒性病变,第四章介绍了其他因素引发的动物组织毒性病变。本书将实验动物毒性病理与实验动物疾病病理有机地结合起来,用精练的文字,对各种药(毒)物作用于实验动物各组织的病理形态学变化予以描述并标准化,同时将上述文字描述的实验病理形态学特征拍摄成彩色组织病理学图片约600余幅。均为笔者长期从事实验病理学资料的积累,具有非常实用的学术参考价值。

前 言

比较医学是介于人类医学和实验动物医学之间一门非常重要的学科,它的内容几乎涵盖了人类医学的所有基础学科和临床学科,并日益得到前所未有的重视。利用实验动物进行实验病理学研究就是比较医学领域的一项重要内容。它通过采用各种病理形态学研究方法对不同种类的药(毒)物作用于各种实验动物体内所产生的毒性反应进行病理组织形态学研究,以寻找该种药(毒)物作用于机体的“靶器官”和“蓄积库”,从而阐明该种药(毒)物在动物体内毒性作用的发生机制和发展规律,并利用这种规律来开展人类疾病动物模型和新药安全性评价的研究工作,为人类疾病的防治提供可靠的实验对象和实验依据。随着我国加入 WTO,生物医学研究领域的许多方面都已经或即将和国际标准接轨;随着具有国家法律意义的《实验动物管理条例》的修改完善并实施,对动物实验的过程和结果要求越来越高,尤其是在动物疾病模型和新药安全性评价领域体现更甚。对于动物疾病模型和新药安全性评价研究领域的研究者来说,实验动物组织病理学检查是必不可少的参考资料。由于动物实验研究过程中所谓的标准化动物都可能会因为实验因素的干预而使受试动物的组织器官产生病理形态学改变,而这种改变对于客观地评价实验结果非常重要。此外,这种病变的产生除了实验因素,还往往与动物在实验中受外界刺激而自身产生的疾病干扰有关。由于研究者缺乏动物病理学方面的知识,而国内又缺乏这方面的系统参考资料,确实给研究者分析实验结果带来了一定的困难,极大地限制了许多动物实验课题的比较医学意义。因此,通过研究编写出版具有比较医学价值的实验病理学参考书非常必要。鉴于国内在这方面的研究专著目前尚属空白,国外可供参考的资料也不多,利用自己在多年实践工作中积累的材料和经验编写《实验病理学彩色图谱》一直是我多年的梦想。很荣幸,在几位同行的积极参与和鼓励下,这个梦想即将实现。

1

本书主要将实验动物毒性病理与实验动物疾病病理有机地结合起来,用精练的文字对已知各种药(毒)物作用于实验动物各组织器官的病理形态学变化予以描述并标准化,与实验动物器官组织因疾病引起的病理形态学变化进行比较病理学描述和分析,同时将上述文字描述的动物病理学特征(包括毒性病理及疾病病理)拍摄成彩色组织病理学图片,以供各相关领域的研究者参考。为了拓展本书的学术应用参考领域,本书的文字及图片除了围绕动物组织各系统病变及动物病变的种类进行描述外,还采用一个章节的内容专门对实验病理学的观察方法、观察原则、观察要点、观察结果的影响因素、观察结果的分析以及整体动物实验结果观察的评价进行了文字阐述,并配有彩色图片的说明,以求获得更好的实用效果。希望本书的实用性能满足众多生命科学领域动物实验研究者的需求,尤其是能够得到动物疾病模型和新药安全性评价研究领域研究者的认可。如能实现这个目的,我们将感到无比欣慰。

由于编写者能力及摄影技术所限,在本书的彩色图片拍摄中及文字描述中的错误和不足之处在所难免,敬请读者和同行不吝赐教,以便再版时进一步完善。衷心感谢在本书编写过程中提供过技术协助和精神鼓励的同道,这是本书得以顺利完成的技术保证和力量源泉。

周光兴
2004 年 10 月

序 言

现代医学的产生可以上溯到以黎文霍克(1632~1723)发明显微镜为起点。经几代人的努力,传统医学(经验医学)逐渐受到实验医学的挑战,不断地更新扬弃。在这段时间内,由于微生物学和显微病理学等方面的建树,现代医学飞速发展,用了不到200年的时间,奠定了今天现代医药科学的基础。

迄今病理学仍然是重要的诊断手段。它以直观形态学的不容怀疑的证据,证明并阐述机体病理改变的实际情况,甚至还可以评分计算、量化成代码公式,较统计学引出的数据分析还来得简便。特别是毒理学更是依赖病理学的支撑得以丰富其内容,构筑了今天的毒性病理学,以病理学阐述毒理转归,以毒理学解释病理学所由。根据本书作者的界定:“实验病理学是用病理组织形态学的各种实验方法,以实验动物为研究对象,观察和研究各种药物因不同剂量对受试动物的组织、器官造成病理性改变的损伤部位、损伤性质、损伤程度、发生机制及转归的一门重要学科”。这样,就明确了以实验动物作为实验平台,通过各类动物的大量实验组织病理学所见,建立比较组织病理学方法,代替了不可能在人体进行的实验病理学研究,其诊断价值是值得重视的。

实验病理学可以展示动物病理的全过程,必要时还可以终止动物生命来探求某阶段动物组织病理学的真实情况,因而具有组织、器官较完整的实验病理材料。何况动物界种类繁多,有飞禽、走兽,有野生、家栖和家养,有草食、肉食和兼食,它们的生理和生物化学环境存在差异,比较组织病理学将其罗列排比,能更真实地展现和了解机体病理变化的全过程,这是比较医学的绝对优势。

本书编入了大量动物组织病理学彩色图片,尤为可贵的是这些图片均来自笔者长期从事动物实验病理学研究材料的积累,具有非常实用的学术参考价值,确实为一本国内难得的原创性学术专著。本书的问世对国内与动物实验有关的生物医学领域及新药安全性评价领域将具有重要的指导意义。周光兴教授是我国极少数比较医学专家之一,不久之前有幸读过他编著的《比较组织学彩色图谱》,今日又见一本比较病理学的专著出版,深感我国比较医学已开动起步,这门新兴的边缘学科在21世纪中将放出它耀眼的光辉。

中国农业科学院研究员
上海市实验动物管理委员会副主任 刘端三
《上海实验动物科学杂志》主编

2004年10月

目 录

第一章 实验病理学的观察方法及原则	1
第一节 实验病理学研究方法	1
一、实验病理学研究的必要性	1
二、实验病理学研究方法	1
三、实验病理学研究材料的特点	3
四、受试动物的靶器官和蓄积库	3
第二节 肉眼观察方法的要点	4
一、受试动物外观检查	4
二、受试动物的体表状况检查	4
三、受试动物组织和器官外观检查	4
四、脏器系数	5
第三节 病理组织形态学观察方法的要点	5
一、掌握受试动物的正常组织学知识	5
二、影响毒性病变观察的客观因素	6
三、影响毒性病变观察的主观因素	6
四、动物毒性病变的性质及观察标准	7
第四节 实验病理学整体观察原则	7
一、毒性作用靶器官的确定原则和方法	7
二、毒性病理学观察结果与其他检测指标的关系	8
三、整体毒性病理学观察的基本原则	8
四、其他应考虑的问题	9
第二章 受试动物组织常见病变及分类	26
第一节 循环障碍组织病变	26
第二节 退行性组织病变	38
第三节 进行性组织病变	54
第四节 肿瘤性组织病变	66
第五节 炎症组织病变	85
第三章 动物各系统组织一般毒性病变	94
第一节 心血管系统毒性病变	94
第二节 消化系统毒性病变	103
一、胃肠道常见毒性病变	103

二、胰腺常见毒性病变	104
三、肝脏常见毒性病变	104
四、胆囊常见毒性病变	105
第三节 呼吸系统常见毒性病变	132
第四节 泌尿系统毒性病变	146
第五节 生殖系统毒性病变	158
第六节 内分泌系统毒性病变	175
第七节 神经系统毒性病变	182
第八节 皮肤与眼毒性病变	190
第四章 其他因素引发的动物组织毒性病变	201
第一节 农药引发的动物毒性病变	201
第二节 重金属引发的动物毒性病变	210
第三节 抗生素引发的动物毒性病变	217
第四节 其他因素引发的动物毒性病变	239
参考文献	241

第一章 实验病理学的观察方法及原则

第一节 实验病理学研究方法

一、实验病理学研究的必要性

实验病理学是用病理组织形态学的各种实验方法,以实验动物为研究对象,观察和研究各种药物因不同剂量对受试动物的组织、器官造成病理性改变的损伤部位、损伤性质、损伤程度、发生机制及转归的一门重要学科。它在人类疾病动物模型研究及药物安全性评价工作中占有非常重要的地位。鉴于药物安全性评价涉及药物的毒性剂量、药物毒性作用的维持时间、药物在机体的蓄积毒性以及药物毒性作用的靶器官等许多内容,因此借助实验病理学的研究成果,可以对受试药物毒性导致对人体损伤的可能发生部位、毒性反应的性质和病理变化程度做出推断和评价,为药物临床研究的剂量选择和研究过程的顺利实施、人类疾病动物模型的复制提供可靠的参考依据。由于各种药物毒性作用的人体病理材料不易获得,即使有也往往具有很大的局限性,因此使用实验动物来进行药物临床前的毒性研究就显得非常必要。综合运用相关药物的动物实验病理学资料,不但具有较好的完整性,如动物组织和器官的病理形态学改变、病变的类型和程度、动物因毒性作用而产生的临床表现等,而且在明确受试药物的剂量-效应关系,确定受试药物的毒性剂量及安全性范围等方面均具有十分重要的参考意义。

二、实验病理学研究方法

医学实践中,研究人员经常应用实验动物进行药物安全性评价以及人类疾病动物模型的复制研究。鉴于动物对药物毒性反应的特殊性和复杂性,在进行毒性病理学研究时,通常均采用多学科的综合研究方法,包括常规的病理形态学研究方法和特殊的病理学研究方法。在某些情况下,病理组织形态学现代新技术的应用,往往能起到事半功倍的作用。不同药物作用于动物机体所产生的毒性反应,在机体的器官、组织、细胞等结构方面,通常表现为形态学上的改变。利用特殊病理形态学研究方法,往往还可以在组织形态研究方面,寻找到受试药物对动物机体毒性作用的某些特殊反应,其研究结果对常规毒性病理学研究方法可以起到补充和完善的作用。毒性病理学常用以下几种研究方法。

1. 酶组织化学方法(enzyme histochemistry methods)

采用酶组织化学方法可研究药物对动物机体各组织、器官的毒性作用,了解机体组织受到药物毒性作用时各种酶的特殊变化。

(1) 优点:把形态学和生物化学紧密地结合起来,通过各种染色方法能够显示动物组织切片中各种酶的化学组成、定位、定量和活性,用于探知药物毒性作用的质量控制和评价,以及酶的超微结构定位。

(2) 缺点:本方法操作程序相对较为复杂,实验干扰因素较多,同批实验标本的可比性相对较差。实践中多用于药物毒理病理学评价时的定性研究。

2. 免疫组织化学方法(immunohistochemistry methods)

应用免疫学的组织化学原理,在动物组织切片及细胞标本中,通过特异性抗原抗体反应,利用各种可见的标记物来研究药物作用于动物机体后产生毒性作用时各种化学成分的变化,并可进行定性、定位及定量分析。机体组织或细胞中的蛋白质、多肽、氨基酸、多糖、磷脂、酶、激素、核酸等,都可用免疫组织化学技术进行检测。在药物安全性评价及复制疾病动物模型的毒性病理学研究工作中,免疫组织化学方法可用以标记和定位各种药物的毒性反应特征,以了解受试药物对受试动物靶器官毒性作用的损伤机制,有较好的实际应用价值。

3. 放射自显影技术(autoradiography techniques)

本方法是应用同位素在衰变期发射的粒子使乳胶感光,可永久记录核粒子的运行轨迹,且示踪定位准确。将常规病理形态学观察与本方法结合起来,能比较受试标记物在各器官、组织、细胞中的分布和定位,既可以作定性研究,也可以作定量研究。它是研究药物作用于动物机体后,其在体内产生毒性反应的物质代谢、转化、分布和作用机制的常用研究方法。本技术对实验病理学常规组织形态学观察结果的分析和评价研究是一种良好的辅助手段。

4. 电子显微镜技术(electronic microscope techniques)

电子显微镜相对于普通光镜而言具有较高的分辨能力和放大倍数,可以观察药物毒性反应时动物各种组织、器官的细胞超微结构(ultrastructure)。当药物产生的毒性作用于动物机体组织时,可以损伤组织、器官的细胞膜和细胞超微结构。此时可引起细胞水肿和各种细胞器发生形态和数量上的改变,表现在受损细胞的细胞质内出现线粒体(mitochondria)、内质网(endoplasmic reticulum)、高尔基复合体(Golgi complex)、溶酶体(lysosome)、核糖体(ribosome)等各种细胞器的病理学改变。借助于本技术对细胞超微结构的观察,可以对光镜下实验病理形态学观察结果作进一步的验证和完善,使研究者在亚细胞水平上对受试药物的毒性作用和特点有更全面的了解。

5. 形态定量病理技术(morphometry pathologic techniques)

本技术包括图像分析技术(image analysis techniques)和图像细胞光度技术(image cytometry techniques)两部分。随着电子计算机和电视技术的发展,病理形态学的研究方法已经不仅能够对机体组织和器官的病理变化进行定性观察,也能够借助于专门的软件对病理形态观察结果进行定量数据分析,从而使形态学研究满足了由光镜水平进入电镜水平,进而向分子生物学领域发展的需要。借助于定量病理技术,研究者能够充分了解和掌握药物作用于受试动物后产生的毒性反应,以及药物毒性导致机体组织、器官出现损伤的部位及其产生病理形态学变化的原因,明确药物毒性作用的性质与程度,确定药物毒性的靶器官,精确评价药物毒性反应的持续时间和剂量-效应关系。本技术克服了在进行实验病理学研究时,观察者对于不同病变的形态描述,因缺乏客观标准尺度而导致的对病变结果认识的主观性限制,减少了因人为因素或观察时间因素,对同一毒性病变的诊断、分型、分级等作

出结论时可能产生的误差,使相关药物毒性作用的动物病理形态学研究更全面,结果更科学、更可靠。

三、实验病理学研究材料的特点

应用实验动物进行药物毒理学研究及复制人类疾病动物模型时,研究者可从受试动物身上获得大量极有价值的病理材料。由于动物实验克服了人体研究的某些局限性,因此,受试动物毒性病理材料一般均相当完整。通过药物毒理学试验研究缜密、完整的课题设计,所获得的动物病理组织材料除了具有完整性外,还具有非常良好的动态特点。由于常规药物的毒理学试验至少需要通过两种动物的体内研究,并且有低、中、高剂量的分组和对照组的设立,有性别分组和年龄分组。因此,所有这些受试动物,在不同阶段、不同剂量、不同性别条件下,所得到的动物病理材料包括血液、尿液、器官组织、细胞、细胞器、染色体、基因等,都可以用各种形态学方法进行定性和定量、形态和功能、微观与宏观的病理学分析;使大量的静态病理材料有机地结合起来,呈现出药物毒性反应的动态变化。通过对这些动态病理材料的整体科学分析,使得研究者对受试药物的毒性作用结果评价更全面、更客观,也更精确。毫无疑问,利用实验动物进行药物毒理学试验及疾病模型复制的课题设计是非常重要的。这种重要性表现在对动物实验条件、受试动物质量和课题研究人员的要求有着非常严格的标准。否则,即使获得了大量的动态病理材料,但在对所获材料进行动态病理学分析时,都可能会因实验过程中各种主客观因素的影响而事倍功半。这充分显示了动物实验研究及药物安全性评价工作中实行优良实验室规范(good laboratory practice, GLP)的必要性。

四、受试动物的靶器官和蓄积库

药物毒性作用的靶器官(target organ)主要指药物作用于机体后其毒性导致的体内损伤过程中主要受累的器官。药物毒性作用的蓄积库(storage depot)则主要指药物毒性成分在机体全身分布中某些浓度或数量最高的部位、器官和组织。药物毒理学试验中受试动物靶器官和蓄积库的确定,需要通过动物组织器官的病理形态学观察和在动物身上同期开展的其他检测项目如血液、尿液、生化检测或心电图测定结果等的综合分析才能够实现。一般而言,每种药物毒性作用于动物后都有特定的靶器官和蓄积库。通常情况下,各个药物毒性的靶器官和蓄积库是相同的。但实践中有时也会碰到某些药物毒性的靶器官和蓄积库并不完全一致的情况,对这种特殊情况研究者必须引起足够的重视。只有充分认识并掌握受试药物毒性作用导致的动物靶器官和蓄积库的特点,才能够对动物毒性病理材料充分认识和完整分析,避免产生错误的结论而影响药物毒性评价的准确性。尤其是应用两种以上动物的病理材料进行整体病理形态学观察分析时,当不同种类受试动物组织、器官的毒性损伤部位和病变性质表现出并不完全一致的结果时,评价结论更应慎重。此时,更应从实验动物本身的生物学特性、饲养环境条件、受试动物质量以及动物实验条件来加以整体考虑,以排除与受试药物毒性无关的意外影响因素。

第二节 肉眼观察方法的要点

一、受试动物外观检查

应用实验动物进行药物毒理学试验或人类疾病动物模型复制时,由于受试动物数量和试验时间的限定,或是由于药物毒性作用对动物机体的影响,实验过程中受试动物外观均可能会发生一定程度的生理学或病理学变化。这些变化主要包括受试动物的营养状况、活动状况及精神状况,受试动物是否有外观异常及发育障碍,受试动物粪便的颜色、质地和形状,受试动物进食情况及生长状况,受试动物食物消耗量与体重增长是否有相关性,以及受试动物(尤其是大动物)的发情状况等。对于这些变化,研究者必须随时详细列表记录,特别是实验过程中各组动物出现外观异常或意外死亡的时间、组别、性别及数量。以上数据,对人类疾病动物模型研究及药物毒理学试验工作的正常进行,以及试验结束时动物毒性病理学观察结果的整体评价分析,具有很高的参考价值。

二、受试动物的体表状况检查

一般而言,人类疾病动物模型研究及药物毒理学试验结束后,按照实验设计及药物安全性评价的法定要求都必须对受试动物作病理学检查。这种检查除了常规组织病理切片形态观察以外,受试动物的体表检查也是非常重要的一项内容。

实验动物体表检查内容主要包括:动物的被毛外观(密或疏、脱毛或污染)状况,动物皮肤黏膜(干或湿、弹性)状况,皮肤表面是否有肉眼可见的色素、角化、贫血、黄疸、水肿、出血、淤血、创伤、糜烂、溃疡等异常病变。这些体表检查对于受试药物(尤其是体表用药或具有变态原性的药物)的毒性病理形态学评价极有价值,对于客观地评价受试药物对受试动物是否具有毒性以及药物毒性的剂量-效应关系具有实用参考价值(参见图 1-5,1-6,1-7,1-9,1-10)。

三、受试动物组织和器官外观检查

动物组织、器官均有其固有的形状、质地和颜色。正常情况下,受试动物的各种组织、器官其解剖部位都是固定的。药物毒理学试验过程中,当受试药物毒性因素作用于受试动物后,药物毒性常可导致动物的各种组织、器官,尤其是受试药物的靶器官及与靶器官有关联作用的组织、器官,出现形状、大小、颜色、质地等方面的病理学变化,有时解剖位置都会发生病理性移位。以上这些外观变化,对于动物组织、器官的病理形态学观察是极其有用的参考信息,对于提高药物毒性病变诊断的准确性很有帮助。此外,动物尸解作病理取材时,受试动物的胸腔、腹腔及心脏是否有体液残留及其性状如何(包括颜色及清晰度等),都对整体动物毒性病理学观察结论具有实用参考价值(参见图 1-1~1-4,1-8,1-11~1-17)。

实践中,实验动物组织、器官的外观病变,千变万化,形态各异,因此,必须用规范的病理学术语来标准和描述。可以根据实际病变的范围用局限(灶)性(+)、散发性(++)和

弥漫(散)性(++)来描述,也可以根据实际病变的反应程度用轻度(+)、中度(++)和重(深)度(+++)等来表示。

四、脏器系数

药物安全性评价工作中受试动物毒性病理学检查结果,在整个毒性试验过程中占有很重要的位置,它的观察结果是评价受试药物是否具有毒性作用的重要科学依据。因此,实验病理学研究十分重视器官重量指标的诊断价值,所有组织、器官的绝对重量和相对重量(脏器系数)都具有实际病理意义。实践证明,大多数药物毒性的病理形态学观察结果反映出脏器系数指标和病理形态学变化之间具有某些相关性。当某一器官(如大脑、肝、肾、脾、肾上腺、睾丸等),受药物毒性作用影响而发生萎缩或发育不良时,其脏器系数也相应减小;反之,当上述某一器官重量增加时,则该器官很可能有病理性充血、增生、肥大等增生性病理变化。绝大多数情况下,脏器系数本身就能表现出药物毒性的剂量-反应关系。

为保证脏器系数指标的精确性,研究人员在称量动物组织器官时,应仔细剥离与其相连的结缔组织和脂肪组织;并统一各组织、器官的称量标准(主要指心脏、肺、睾丸、子宫等特殊器官的取材位置和处理),避免因人为因素而导致对病理观察结果的误导作用。受试动物脏器系数变化的毒理病理学意义,必须与实验病理形态学研究的其他观察结果结合起来进行整体评价分析,才更有助于判别动物组织、器官毒性病变的性质和程度,以便作出正确的结论。

第三节 病理组织形态学观察方法的要点

5

一、掌握受试动物的正常组织学知识

应用实验动物进行毒理学试验仅是人类疾病动物模型研究及药物安全性评价工作中的一部分内容。它的主要意义在于判断药物毒性作用导致动物出现病理性损伤的性质和程度、靶器官、量效关系以及受试动物的预后与转归等基础问题,为人类疾病动物模型复制和药物的临床研究及安全性评价提供有参考价值的形态学依据。因此,对于受试对象的实验动物本身来说,掌握其正常组织形态学知识是非常必要的。

由于实验动物之间及实验动物与人之间,在许多组织和器官的正常组织形态学方面存在着一定的异同性,而这种异同性又具有潜在毒理病理学意义,进行病理形态学观察时极易混淆。如大鼠皮肤与人类皮肤相比,在皮肤角质层、血管、汗腺、毛囊等形态结构方面就存在着某些差异。啮齿类动物胰腺的胰岛数量有明显的性别差异。雌性实验动物(尤其是犬)的卵巢、子宫和阴道组织,极易受动物个体本身不同发情周期的影响,而造成在脏器系数及组织形态上的差异。以上这些差异极易干扰病变观察结果,并导致病变观察者作出片面的结论。所以,从事实验病理学观察的研究人员,必须熟练掌握常用实验动物(特别是药物安全性评价常用实验动物)的正常组织学知识,避免因缺乏受试动物组织形态学知识而导致整体毒性病理学评价结果的人为误差(参见图 1-18 ~ 1-27, 1-30 ~ 1-35, 1-43, 1-45)。

二、影响毒性病变观察的客观因素

动物试验结束后,对受试动物组织、器官进行病理学观察,其结果可全面反映动物机体在药物毒性因素作用下,其功能结构及代谢状态的特征和规律。因此,组织切片提供的病理学信息非常重要。这些信息对评价受试药物是否具有毒性,起着十分重要的作用。组织切片制作过程中程序较多,每个环节都存在着影响成功制作组织切片的人为因素,其影响因素表现出复杂的多样性。

(1) 切片制作过程必须规范,选择组织材料固定液的种类、固定时间、透明温度和透明时间,以及组织切片的厚度、染色方法、染色时间等都必须前后统一,只有这样才能保证制作良好的动物组织切片,避免因切片质量因素而导致有价值的病理信息丢失。

(2) 动物尸解病理取材前受试动物的处死方法或麻醉方法选择不当,也会影响组织切片的病变观察,尤其是动物实质器官出现的某些急性出血、淤血、水肿等病变,所以全部受试动物的整体试验方法必须一致。无论是两种受试动物之间,还是各剂量组动物之间、对照组动物之间、剂量组动物与对照组动物之间或实验不同阶段处死动物之间,其处死和麻醉方法的标准应有连续性和同一性,不能随心所欲。

(3) 人类疾病动物模型复制及对药物毒理学试验过程中死亡动物的组织切片观察,研究人员也必须了解新鲜动物标本和死亡动物标本之间组织形态变化观察(尤其是与毒性病变有关的变性、坏死、炎症等)的诊断异同点。只有这样做,才能更好地全面利用受试动物组织切片提供的全部病理信息,为全面评价受试药物的毒性作用提供客观而可靠的毒性病理形态学依据(参见图 1-28,1-29,1-37,1-39,1-42)。

三、影响毒性病变观察的主观因素

鉴于实验病理学观察结果在药物安全性评价研究中的地位至关重要,有时甚至是决定性的,因此,在进行动物毒性病理学观察时,必须确定受试动物的组织和器官形态学特征及病变种类,病变所处组织的部位和病变反应程度。在此基础上,确定动物机体对受试药物毒性的早期反应、中期反应、晚期反应和恢复期反应,以确定受试药物毒性的累积效应和性别效应,最终明确受试药物的剂量反应关系,为该药物的临床研究提供剂量设置选择和安全性评价参考。要顺利完成毒性病理学观察的工作,必须排除观察者的主观因素。具体要求如下。

(1) 观察标本取材部位必须一致,取材时必须参考肉眼观察的结果,尽量取外观组织和器官有颜色、形态、大小等差异的交界处。

(2) 受试动物的成对器官取材(如肾脏、肾上腺、甲状腺、卵巢等)必须整体考虑,左右一致,对肝、肺等分叶器官需固定取材部位,避免因取材部位不一致而使有价值的病理材料丢失。

(3) 根据实验病理学研究的需要,各剂量组和对照组供病理观察的组织标本必须相同,各组织标本的取材部位和数量也必须一致。对受试药物毒性可能造成的靶器官及肉眼观察已有异常的组织标本,取材数量和部位可不受限制。

(4) 取材时必须根据各组织器官的组织形态特征而确定取材的解剖方向,以保证病理

学观察时组织结构层次的完整性。

(5) 关于确定动物病变观察的种类和程度,则应列表并预先定出标准。如无病变为0,轻度病变为+,中度病变为++,重度病变为+++。

实际工作中,受试动物毒性病变观察受观察者的主观因素影响很大,如果观察前不对观察结果统一标准的话,很可能因观察时间、观察顺序、不同观察者等主观因素,导致对病变性质和程度评价不一致的情况。因此药物毒理学试验的受试动物毒性病理观察的整体工作,最好由一个观察者或固定的观察者来完成。这样做的好处是人为误差因素相对较小,可以避免毒性病理学观察过程中因主观因素造成的误差,保证对观察结果的公正评判。

四、动物毒性病变的性质及观察标准

应用实验动物进行人类疾病动物模型复制及药物毒理学试验时,毒性病理学观察人员必须了解和掌握动物组织器官病理学的基本特点,这是顺利开展药物毒性评价工作的一个重要方面。实验动物作为“活试剂”,它所处的实验环境是按照国家规定的等级标准而人为限定的,属于“健康动物”。当药物毒性作用于动物机体后,其组织器官往往会出现一些与受试药物有关且具有规律性的病理形态学变化。实践中,动物的病理变化一般涉及病理学的全部基本病变和病变的主要类型,包括细胞损伤(变性、坏死等)、充血、出血、水肿、血栓形成、炎症、纤维化、增生、硬变及肿瘤等。这些病变往往随动物试验的时间长短和受试药物剂量大小,而表现出复杂而多样化的性质和特点。要确定受试药物毒性病变的性质,首先必须观察这些病变在试验组动物与对照组动物之间的异同性,然后再明确这些病变在各剂量组动物之间出现的相关性及规律性。例如,是否可恢复?是否有性别和剂量效应?尽量排除与药物毒性因素无关的病变(病变出现的性质、程度及数量之间无相关性 & 统计学意义)干扰。最后根据对这些病变的整体统计分析再作出评判及结论。这是从事实验病理学观察研究的基本原则和标准。

第四节 实验病理学整体观察原则

一、毒性作用靶器官的确定原则和方法

受试药物作用于实验动物后,其药物毒性的诱导因素通常都会引起动物机体出现特定的毒副作用。这些毒副作用反映在动物组织和器官上,就会出现一些有临床意义的病理形态学变化。当然,有些药物也可能毒性较弱或根本无毒性,但这样的情况实践中比较少见。如果某项药物毒理学试验的病理组织观察结果,动物机体组织和器官不出现任何病理形态学变化,也无与药物毒性有关的靶器官,这很可能是实验设计上存在缺陷(如药物剂量设置不当等)所造成的。

当某个药物作用于动物机体产生毒副作用后,动物除了出现一些临床表现(如嗜睡、脱毛、消瘦、食欲下降、活动减少等)外,反映在组织和器官上就会出现与药物作用持续时间及药物剂量相关的毒性蓄积而导致的组织和器官病变。这些病变一般是有规律的。在某些情况下,病变也可能在多种器官上呈现多样性形态变化。如果发现受试动物有规律性的组织和器官病变,且表现程度累及较重的器官,往往提示是该种受试药物的靶器官。实践工

作中,有时单纯依靠常规染色的组织切片观察并不能确定靶器官的毒性病变性质。此时,用其他毒性病理学研究方法(如特殊染色方法、免疫组织化学方法、电镜技术等)有助于进一步提高病理学诊断的准确性。

应该指出:药物毒性作用靶器官的毒性形态特点,往往表现出非常明显的时间效应和量效关系,在试验过程中呈现显著的正相关作用。这个特点与一般病理学研究以描述性形态改变和终末期病变为主有所不同。与药物有关的动物毒理学试验中出现的多器官多样性形态学变化,必须经过整体观察来确定这些病变是否具有特异性。有特异性的动物组织和器官毒性病变,往往提示其与受试药物毒性有相关性,它对确定药物毒性作用的靶器官有较好的辅助诊断作用。至于动物毒理学试验过程中出现的一些非特异性组织器官毒性病变,则应在确定病变的性质、数量、程度及有关量效关系方面加以验证和整体统计分析。如果确定它们是无规律性的散发毒性病变,且无明显的剂量-效应关系,则这些病变不能简单地判定与受试药物因素相关。

二、毒性病理学观察结果与其他检测指标的关系

药物安全性评价工作中,动物组织和器官的毒性病理形态学观察仅是受试药物动物毒理学试验的一项重要检测内容。它的观察结果和所作出的结论对于确定药物毒性作用的靶器官、剂量-效应关系、毒性作用机制以及毒性转化规律具有重要价值。不可否认,单纯依靠病理形态学观察,虽然直观形象且具有较强的说服力,但在作出整体药物毒性评价结论时,必须结合其他在受试动物身上同期开展的检测项目,如脏器重量分析、脏器系数比较、生化指标结果、血液指标、尿液指标及心电图检测等结果进行综合评判,才能保证受试药物的动物毒性病理学评价报告更精确、更完善、更具有科学性。以往的实践证明,这些检测指标对于常见的药物毒性靶器官如肝、肾、心脏等具有非常好的辅助诊断作用。动物毒理学试验中的其他检测项目数据分析,对于毒性病理学观察结果的整体评价,具有较高的借鉴和实用价值,两者的结果分析应当统一起来,不能分开。

三、整体毒性病理学观察的基本原则

(1) 按照国家《药品注册管理办法》的申报资料要求,药物长期毒性试验必须使用两种以上实验动物,涉及动物数量较多,而用于进行组织切片观察的组织 and 器官则数量就更多了。对受试动物众多组织和器官进行病理形态学观察,必须使用双盲法,全部切片应采用代码分组,避免实验分组信息让观察者提前知道,以减少观察结果混有为主观因素。

(2) 病理观察时,观察者最好先将所有组织切片在显微镜下浏览一遍,不做观察记录,使观察者对所有受试动物组织切片中反映的组织形态背景及病理形态学信息有一初步印象和了解,然后再进行仔细观察和结果记录。

(3) 观察中至少有一组动物的组织切片是属于正常组织形态的,否则,整批试验结果的毒性病理学观察可能就毫无意义。

(4) 整个实验观察结果还必须考虑毒性病变在两种受试动物之间是否有共同反应?是否存在性别差异和时间效应?观察到的毒性病变是否与动物年龄有关或属于动物本身的自发性病变?毒性病变在同批送检标本或同组受试动物中呈现的是个体反应,还是群体反应?上述观察结果可间接或直接提供一系列信息,将这些信息与受试药物剂量分组结合