	ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ ТОКСИКОЛОГИИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ		
СОП №:	Номер версии:	Число страниц:	
IV/2П-011-2022/3	3	10	
	Дата начала действия версии СОП:	Дата окончания действия версии СОП	
	15.06.2022	15.06.2024	
Наименование СОП:	**Исследование скелетов плодов по методу Доусона**		
Составлено/ Пересмотрено:	_____ подпись	19.05.2020 08.06.2022 дата	Т.Д. Денисова
Проверено: Руководитель СОК	_____ подпись	10.06.2022 Дата	В.Н. Перфилова
Утверждено: Руководитель лаборатории	_____ подпись	13.06.2022 дата	Л.И. Бугаева
Форма обучения:	чтение ✓	практические занятия	

1. **НАЗНАЧЕНИЕ**

1.1. Цель: описание процесса исследования состояния скелета плодов после окраски.

1.2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ:

СОП - предназначена научным сотрудникам, принимающим участие в исследованиях по репродуктивной токсикологии и является обязательным для изучения.

2. **НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ**

2.1. ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЗАКОН №61-ФЗ «ОБ ОБРАЩЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ» (с изменениями и дополнениями ФЗ от 13.07.2015 N 241-ФЗ и ФЗ от 22.12.2014 N 429-ФЗ в редакции от 13.07.2015).

2.2. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33044—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Guide 1:1998 (“OECD principles of good laboratory practice”, IDT)).

3. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

За выполнение данной процедуры несет ответственность научный сотрудник (исследователь) лаборатории токсикологии, имеющий соответствующие знания и опыт работы, прошедший обучение по данной СОП

4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данный метод изучения состояния скелета плодов применяют при проведении исследований по репродуктивной токсикологии. Исследования состояния скелета плодов проводят по методу Доусона в модификации отдела эмбриологии НИИЭМ АМН СССР («Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств», 2012). Плоды предварительно окрашивают ализарином (Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств, 1975). При обследовании скелета плодов могут наблюдаться такие эффекты, как: *Акрания* - отсутствие костей свода черепа; *Дисморфия челюсти* **-** нарушение морфогенеза челюсти; *spina bifida* **-** не заращение дуг позвонков; *Сколиоз* - боковое искривление позвоночника; *Гипоплазия ребер* **-** дефект развития ребер, при котором отмечается недоразвитие грудинных концов ребер. Недостающая часть ребра замещается соединительной тканью; *Олигодактилия* - отсутствие одного и более пальцев на руках или ногах; *Брахидактилия* **-** укорочение пальцев; Разрастание хрящевой ткани - дисморфогенез соединительной ткани.

5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice (GLP) - Система обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю исследований в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих исследований.

Стандартные операционные процедуры; СОП (standard operating procedures; SOPs) - Документированные процедуры, содержащие описание процессов проведения испытаний или другой деятельности, как правило, не представленные детально в планах исследования или руководствах по методам проведения испытаний

6. СОКРАЩЕНИЯ

СОП – стандартная операционная процедура

7. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ/ИНСТРУМЕНТЫ

7.1. Медицинские инструменты (пинцет анатомический, пинцет хирургический).

7.2. Чашки Петри, бинты, фильтровальная бумага, стеклянные емкости (флаконы).

7.3. Лупа бинокулярная/увеличительное стекло

7.3. Шариковые ручки,

7.4. журнал регистрации данных

8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ

8.1. После окраски ализарином скелета плодов их изучают под бинокулярной лупой.

8.2. У каждого плода по отдельности подсчитывают количество ребер, позвонков, наличие с обеих сторон ключицы, лопатки.

8.3. Подсчитывают количество точек окостенения в различных костных образованиях: - грудине, пястьях и плюснах.

8.4. Подсчитывают с обеих сторон наличие количества костей плечевого отдела (плечевая, локтевая, лучевая), костей таза (подвздошная, седалищная, лонная) и костей задней конечности (бедро - бедренная, б.берцовая, м.берцовая)

8.5. Также учитывают и аномалии скелета (если таковые имеются).

8.6. Полученные результаты заносят в журнал регистрации данных (Приложение А).

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

9.1. Руководящие методические материалы по экспериментальному и клиническому изучению новых лекарственных средств //Москва, 1975

9.2. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств// Под общей редакцией д.м.н. А.Н.Миронова. Москва, 2012. Часть первая. С.80-93.

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Лаборатория токсикологии

НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

СОГЛАСОВАНО
Руководитель СОК
_____ В.Н. Перфилова
«___» _____20___г.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ИЦ
_____Л.И. Бугаева
«___» _____20___г.

Журнал регистрации первичных данных по исследованию состояния скелета плодов по методу Доусона

Место хранения: 400087, г. г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39. Помещение _____

Начат	
Окончен	

Список сотрудников, допущенных к заполнению журнала регистрации первичных данных по исследованию состояния скелета плодов по методу Доусона.

№ п/п	Должность	Ф.И.О.	Подпись
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			

Карта регистрации первичных данных

Код исследования: _____
Дата проведения эксперимента_____ Время _____
Группа_____ Вещество _____ Доза _____Путь введения_____
Вид ТС_____ Линия _____Пол _____

Протокол состояния костной системы плодов

Плоды	Отделы скелета крыс									
	Грудина (2-5 точек)	Ребра (13 пар)	Позвонки (29)	Кости передней конечности (dextra, sinistra)				Кости задней конечности (dextra, sinistra)		
				Ключица	Лопатка	Плечевой отдел (плечевая, локтевая, лучевая)	*Пястье* (проксимальная, промежуточная, дистальная)	Тазовые (подвздошная,седалищная, лонная)	Бедро (бедренная, б.берцовая, м.берцовая)	*Плюсна* (4 гр.)

Исполнитель: _____ / Ф. И. О._____/
Дата подпись расшифровка подписи
Исполнитель: _____ / Ф. И. О._____/
Дата подпись расшифровка подписи
Руководитель исследования: _____ / Ф. И. О._____/
Дата подпись расшифровка подписи

Лист регистрации изменений от «08» июня 2022 в СОП № IV/2П-011-2022/3 версия 3

№ изм.	№ страницы	№ пункта	Внесенные изменения
1	1		Логотип ВолгГМУ Старого образца. **изменено на** Логотип нового образца
2	1		Номер IV/2П-1.008-2020 **изменен на** СОП № IV/2П-011-2022/3
3	1		Согласно СОП 1/1П-001-2021 на титульном листе **убраны** графы: дата утверждения, дата пересмотра. **Добавлено**: составлено/пересмотрено. Графа- Дата начала действия **изменена** на Дата начала действия версии СОП. **Добавлено** – Дата окончания действия версии СОП.
4	1	1	Заголовок п.1 Назначение и область применения **изменена на** Назначение Цель данной стандартной операционной процедуры (СОП) описать процесс окрашивания скелета ализарином с последующим исследованием его состояния **изменена на** 1.1. «Цель: описание процесса исследования состояния скелета плодов после окраски. Подпункт 1.1. СОП. предназначена всем сотрудникам, выполняющим манипуляции по окрашиванию скелета ализарином, знающим методику и владеющим техникой ее выполнения. **изменены на** 1.2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ: СОП - предназначена научным сотрудникам, принимающим участие в исследованиях по репродуктивной токсикологии и является обязательным для изучения
5	1	2	**НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ** 2.2. ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ПРАВИЛ НАДЛЕЖАЩЕЙ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (Приказ Минздрава России от 01.04.2016 №199н) - **Убран**
6	2		колонтитул из 4-граф **изменен** на 3 графы (убрано- начало действия)
7	2	3	П.3 Общие положения **удалены**. П.4 Ответственность за выполнение работ по процедуре **изменена на** П.3 Ответственность
8	2	4	**Добавлен** п. 4 Область применения
9	2		Термины и определения **присвоен** п.5
10	2		**Добавлен** п.6 Сокращения

11	2	5	П.5 Применяемое оборудование/инструменты **изменен** на п.7 п п.. 5.1. Емкости для приготовления растворов и хранения эмбрионального материала. 5.2. Медицинские инструменты для изучения состояния скелета плодов крыс (скальпель, пинцет анатомический, пинцет хирургический). 5.3. Чашки Петри, бинты, фильтровальная бумага, стеклянные емкости (флаконы). - **удалены** **добавлено:** 7.1. Медицинские инструменты (пинцет анатомический, пинцет хирургический). 7.2. Чашки Петри, бинты, фильтровальная бумага, стеклянные емкости (флаконы). 7.3. Лупа бинокулярная/увеличительное стекло 7.4. Шариковые ручки, 7.5. журнал регистрации данных
12	2	6	Процедура выполнения **изменена** на п.8 П.п. 6.1. Плоды фиксируют в 96^{O} этаноле не менее 7 дней. 6.2. Для этого выделенные плоды помещают в стеклянную емкость (флакон) с этанолом. При этом, количество спирта должно превышать объем фиксируемых плодов в 5-10 раз. Периодически необходимо менять спирт. 6.3.После фиксации в этаноле, плоды каждого помета переносят в чашки Петри. 6.4. После этого, плод фиксируют в положении на спине и скальпелем проводят разрез в направлении сверху вниз через грудную клетку до нижней части брюшной полости, затем осторожно удаляют внутренние органы хирургическим пинцетом. 6.5. После удаления внутренних органов, плоды погружают 1% раствор КОН для просветления мягких тканей. 6.6. Для приготовления 1% раствора КОН берут 1 г гидрооксида калия и растворяют в 99 мл воды. 6.7. Через 1-2 суток, когда становятся видны закладки костей, плоды вынимают из щелочи и промывают водопроводной водой. 6.8. Затем плоды переносят в раствор А. 6.9. Раствор А – состоит из 150 мл глицерина, 800 мл дистиллированной воды и 10 г КОН, к которому перед употреблением добавляют несколько капель раствора Б (1% водный раствор красного ализарина) до появления светло-фиолетового цвета. 6.10. Через 3-5 суток окостеневшие участки скелета окрашиваются в интенсивно красно-фиолетовый цвет. 6.11. После этого плоды переносят в чистый раствор А на 7-14 дней для обесцвечивания мягких тканей и окончательного просветления плодов.

			6.12. Затем плоды обезвоживают путем медленной проводки через смеси спирта, глицерина и воды в разных пропорциях: 1 часть спирта, 2 части глицерина и 7 частей воды; 2 части спирта, 2 части глицерина и 6 частей воды; 4 части спирта, 4 части глицерина и:2 части воды; Равные части спирта и глицерина; Чистый глицерин, к которому добавляют 1-2 капли формалина (чтобы предупредить загнивание); В чистом глицерине плоды могут храниться. – **удалены** П.п. 6.13. Плоды с окрашенным скелетом изучают под бинокулярной лупой. 6.14. Подсчитывают количество ребер, позвонков, количество точек окостенения в различных костных образованиях, а также учитывают и аномалии скелета (если таковые имеются). Результаты заносят в протокол исследования **изменены на**: П.п.8.1. После окраски ализарином скелета плодов их изучают под бинокулярной лупой. 8.2. У каждого плода по отдельности подсчитывают количество ребер, позвонков, наличие с обеих сторон ключицы, лопатки. 8.3. Подсчитывают количество точек окостенения в различных костных образованиях: - грудины, пястья и плюсны. 8.4. Подсчитывают с обеих сторон наличие количества костей плечевого отдела (плечевая, локтевая, лучевая), костей таза (подвздошная, седалищная, лонная) и костей задней конечности (бедро - бедренная, б.берцовая, м.берцовая) 8.5. Также учитывают и аномалии скелета (если таковые имеются). 8.6. Полученные результаты заносят в журнал регистрации данных (Приложение А).
13	3	7	Ссылки **изменены** на п.9 Список используемых источников
14	4	8	п. 8 Приложения **изменено** на п.10 Карта регистрации первичных данных – **удалена** Вместо нее **добавлен** журнал регистрации первичных данных

Руководитель лаборатории:

«_13_»_июня_____2022__ г._____/_Бугаева Л.И._____/

дата подпись расшифровка