

ГОСУДАРСТВЕННОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ПРОФЕССИОНАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ  
«КАЗАНСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ  
ИМ. В.И. УЛЬЯНОВА-ЛЕНИНА»

---

*Факультет географии и экологии*

**ПРАКТИЧЕСКОЕ РУКОВОДСТВО  
ПО ОЦЕНКЕ БИОЛОГИЧЕСКИ  
АКТИВНЫХ ВЕЩЕСТВ**

Учебно-методическая разработка  
к общему курсу  
Экологическая токсикология  
и специальному курсу  
Экологическая фармакология

КАЗАНЬ  
2007

## СОДЕРЖАНИЕ

Введение .....	4
1. ПРАВИЛА ОБРАЩЕНИЯ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ .....	5
2. ПУТИ ВВЕДЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМ .....	6
2.1. Введение в желудок .....	7
2.2. Апликация на кожу .....	8
2.3. Апликация на слизистые оболочки глаза .....	9
2.4. Подкожное введение .....	9
2.5. Внутримышечное введение .....	9
2.6. Внутривенное введение .....	10
2.7. Внутривенное введение .....	10
3. Способы забора крови у животных .....	11
3.1. Венозный способ .....	11
3.2. Пункция сердца .....	11
3.3. Артериальный способ .....	11
4. ПЕРВИЧНАЯ ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕЩЕСТВА .....	12
5. МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ .....	13
6. МЕТОД ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НАГРУЗКИ .....	14
7. НЕВРОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НА КРЫСАХ .....	14
8. ПРИМЕРЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ НА ЦЕЛОСТНЫХ ЖИВОТНЫХ .....	14
8.1 Эффективность веществ при различных путях введения .....	14
8.2. Наркотические эффекты, антагонизм .....	14
8.3. Рефлекторные эффекты ингаляций .....	15
8.4. Местное и резорбтивное действие веществ .....	15
9. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РАСТВОРЫ .....	18
10. ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ФРЕНИКО-ДИАФРАГМАЛЬНОМ ПРЕПАРАТЕ .....	19
ЛИТЕРАТУРА .....	21
ПРИЛОЖЕНИЕ .....	22

Печатается по решению  
Учебно-методической комиссии  
факультета географии и экологии  
Казанского государственного университета

Составитель:  
д.б.н., доцент В.В. Зобов

Рецензент:  
к.б.н., доцент Н.Ю. Степанова

**Практическое руководство по оценке биологически активных веществ:**  
Учебно-методическая разработка. – Казань: КГУ, 2007. – 20 с.

Учебно-методическая разработка предназначена для студентов факультета географии и экологии университета и является частью лабораторного практикума по курсам «Экологическая токсикология» и «Экологическая фармакология».

Рассмотрены теоретические аспекты и практические приемы работы, необходимые для оценки острой токсичности на лабораторных животных.

## ВВЕДЕНИЕ

Экотоксикология - междисциплинарное научное направление, изучающее токсические эффекты химических веществ преимущественно на популяции организмов и на биоценозы, входящие в состав экосистем. Объектами изучения экотоксикологии являются также источники вредных веществ, их распространение и превращения в компартментах среды. Характерной особенностью экотоксикологии является то, что, в отличие от традиционной токсикологии (объектом изучения которой является только человек), она изучает токсические эффекты как на индивидуальные организмы, так и на популяции организмов всего многообразия биоты. Вторая группа особенностей экотоксикологии связана с тем, что при изучении токсических эффектов на популяционном уровне возрастает значение окружающей среды как активного фактора, влияющего на поведение экотоксиканта в среде и проявления им токсических и других свойств.

Для вынесения большинства экотоксикологических заключений используются лабораторные методы традиционной токсикологии (наука о ядах) и фармакологии (наука о лекарствах) с привлечением нескольких биологических видов из разных таксонов, а результаты экстраполируются на все многообразие видов экосистемы с последующей оценкой риска токсических воздействий для человека. Для увеличения точности экстраполяции экотоксикологические оценки обычно проводятся с повышением яруса сложности биосистемы - от лабораторных тестов и мезокосмов (популяции, биоценозы) до полевых испытаний. Тем не менее, оценка уровня безопасности любого химического вещества (яда или лекарства) остается труднейшей проблемой токсикологии и фармакологии, связанной с проблемами в знаниях об объеме и характере использования вещества, о свойствах окружающей среды, о физиологических функциях населяющих ее организмов (включая человека). Фармако-токсикологическая характеристика новых синтетических средств, осуществляемая еще на этапе их разработки, позволяет направить мысль химика-синтетика и технолога в сторону изыскания менее токсичных (т.е. более безопасных) химических продуктов и, тем самым, снизить остроту токсикологической и экотоксикологической проблемы.

Цель предлагаемого курса - привить навыки работы с лабораторными животными (биотестерами) и проиллюстрировать основные фармако-токсикологические свойства химических продуктов такими экспериментами, которые могут быть проведены самостоятельно студентами-экологами.

## 1. ПРАВИЛА ОБРАЩЕНИЯ С ЛАБОРАТОРНЫМИ ЖИВОТНЫМИ

С тех пор как фармакология и токсикология существуют как точные науки, в стремлении достигнуть однозначности получаемых результатов выработан ряд обязательных требований. Опыты должны ставиться на животных: (а) одного вида и пола, (б) одинакового возраста, (в) по возможности с одинаковой наследственной характеристикой, (г) при одинаковом питании, (д) при одних и тех же условиях окружающей среды (температура, влажность, освещение, уровень шума и пр.).

Лабораторные животные должны содержаться в специально оборудованных комнатах вивария. В одной и той же комнате не следует держать животных разных видов. Нельзя размещать животных скученно, особенно мелких грызунов. Не разрешается (кроме специальных опытов) помещать в клетку самцов и самок - беременность изменяет состояние организма животных и может испортить весь эксперимент. Существуют следующие нормы размещения животных в клетках и условия содержания животных, модифицирующие токсичность веществ:

Вид	Минимальная площадь дна клетки на 1 животное в см <sup>2</sup>	Максимально допустимое количество животных в клетках
Мыши	40	15
Крысы	150	10
Морские свинки	300	5
Кролики	2000	1

Примечание: на 1 см<sup>2</sup> площади дна клетки должно приходиться ~1 г массы животного

Факторы	Изменения токсичности
Питание	Может изменяться в десятки и сотни раз
Повышение температуры среды	Изменяется при и явном перегреве (для грызунов >36°C)
Групповое или одиночное содержание	Токсичность судорожных ядов увеличивается до 10 раз
Сильный стресс (грубая фиксация в нефизиологическом положении)	Токсичность обычно повышается

## 2. ПУТИ ВВЕДЕНИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ В ОРГАНИЗМ

Вещества могут быть введены в организм животного:

- 1) ингаляционно (при вдыхании с воздухом), 2) в желудок, 3) на кожу, 4) под кожу (п/к), 5) на слизистые оболочки (глаз и т.п.), 6) в брюшную полость (в/б), 7) внутрь мышцы (в/м), 8) в вены (в/в), 9) внутрь мозга.

Каждый путь введения имеет свои характерные особенности. Скорость всасывания веществ при этом неодинакова, неодинаковой может быть и картина поражения одним и тем же веществом. Описаны следующие соотношения скоростей всасывания: если за единицу принять скорость всасывания при пероральном (через рот), то при подкожном введении она будет равна 2, а при внутривенном - 20. Но эти соотношения нельзя распространять на все химические вещества. Например, при введении веронала как перорально, так и подкожно скорость всасывания одинакова.

При вдыхании вещество непосредственно соприкасается с очень большой поверхностью легких. Между клетками легочных пузырьков и кровеносными сосудами есть лишь двухслойные клеточные участки, поэтому всасывание веществ в кровь из легких происходит очень быстро. Кровь при этом минует печень.

При попадании в желудок вещество соприкасается с различной средой и многочисленными ферментами в разных отделах кишечника. Пища, находящаяся в желудке и кишечнике уменьшает всасывание веществ, поэтому опыты на животных всегда ставятся натощак. Многие вещества в желудочном соке растворяются лучше, чем в воде, тогда вещество действует сильнее. Другие же вещества, попав в желудок, теряют свою эффективность или она резко падает.

При нанесении на кожу вещество может оставаться на ее поверхности, но может и всасываться, что приводит к общему отравлению (резорбтивное действие).

Вещества при нанесении на кожу могут вызывать раздражение, воспаление, гибель клеток. Это местное кожное действие. При нанесении на слизистые оболочки глаз вещества могут вызывать как местное, так и резорбтивное действие.

При введении веществ внутривенно или в брюшную полость их действие наступает наиболее быстро. Внутривенно вводят только водные растворы. При других способах возможно вводить не только водные, но и масляные растворы, взвеси, эмульсии.

## 2.1. Введение в желудок

Если вещество не растворяется в воде или в масле, его можно вводить в виде эмульсии. Для этого удобен, например, гель 1-2% крахмала. Исследуемый агент смешивают с остывшим крахмальным раствором, хорошо растирают и размешивают до получения однородной массы. Соотношения 1:1, 1:5, 1:10 и др.

Каждому виду животных в желудок (через рот - *per os*) можно ввести без вреда только определенное количество жидкости.

Вид животного	Масса животного, г	Количество жидкости, водной в желудок, мл.
Мыши	30 и выше	1-1,5
	25-30	0,8-1
	20-25	0,5-0,7
	18-20	0,3-0,4
Крысы	300 и выше	до 8
	250-300	до 6
	200-290	4-5
	100-190	3
Морские свинки	300 и выше	6
	250-290	4-5
Кролики	3500 и выше	200
	2500-3400	150
	2000-2400	100
Кошки	3000 и выше	100
	2500-3000	50-80
Собаки		от 50 до 500-800

Для мышей и крыс применяют зонды, а для более крупных животных - резиновые катетеры. Техника введения мышам и крысам одинакова. Успокоенную крысу берут левой рукой за кожу в области затылка и удерживают вертикально. Зонд вводят горизонтально в ротовую полость до задней стенки глотки, затем конец зонда поворачивают вниз. Если зонд введен правильно, он легко соскальзывает в пищевод. Нельзя применять насильно - стенки пищевода очень тонки и их легко проколоть. Если изо рта показалась кровь, то это говорит о неправильном введении зонда и о скорой гибели животного.

Вещество нельзя вводить быстро, иначе оно может быть выдавлено по пищеводу вверх и попасть в дыхательные пути, вызвав удушье. Очень молодые животные часто плохо переносят введение зонда. Переносление желудка может вызвать у них рефлекторную остановку дыхания.

## 2.2. Аппликация на кожу

Аппликация вещества на кожу имеет целью выяснить, обладает ли вещество местно раздражающим или кожно-резорбтивным действием. Если имеется только местно-раздражающее действие, то наблюдаются изменения только на коже. Если вещество обладает кожно-резорбтивным действием, то оно всасывается через неповрежденную кожу, вызывая общее (системное) отравление организма.

При аппликации растворов на кожу хвостов животных (крысы, мыши) фиксируют в специальных станочках. Испыгуемое вещество наливают в пробирки, которые ставят в штатив. Для каждого животного предназначена своя пробирка, в которую и опускают хвост животного на 2/3 его длины. Если вещество твердое, то его предварительно растворяют в воде, масле или готовят эмульсию. Время экспозиции вещества 4 часа. Фиксировать животных более чем на 4 часа нельзя. После эксперимента хвосты животных прополаскивают в теплой воде с мылом, затем в теплой воде.

При аппликации растворов на тело животных вначале выстригают шерсть на коже спины, живота или задней лапки. Шерсть следует выстригать полностью, чтобы не оставалось даже коротких волосков, но при этом не допускать ранений кожи, царапин. Обычно кожу подготавливают накануне дня опыта с тем, чтобы возможные ранения зажили.

Участки выстригаемой кожи могут быть следующими: у кроликов на спине, сбоку от позвоночника или на животе - 4×5 см, у морских свинок и крыс на животе или задней лапке - 2×2 см.

Жидкие вещества наносят на кожу в нерабавленном виде, твердые вещества - в концентрированных водных или масляных растворах, суспензиях, эмульсиях или мазах. Последние готовят на вазелине, примешивая к нему вещество и тщательно растирая, чтобы получить однородную смесь.

Если вещество обладает местнораздражающим действием, на месте аппликации наблюдается покраснение (гиперемия), отек, расчесы. Об отечности судят либо визуально, либо, исходя из показаний микрометра по

толщине кожной складки, которую захватывают двумя пальцами у концов видимой границы отека. Для сравнения толщину такой же складки проверяют у контрольного животного. Можно также измерять температуру пораженного участка кожи электротермометром.

## 2.3. Аппликация на слизистые оболочки глаза

Проводится чаще всего на кроликах. Испыгуемое вещество вносят в один глаз, другой остается для контроля, в него закапывают воду. Жидкое вещество можно вводить в количестве 1-2 капель, твердых веществ, обязательно хорошо растертых, не более 50 мг.

Оттягивая немного нижнее веко, наносят вещество на слизистую оболочку глаза. Затем на одну минуту прижимают палец к внутреннему углу глаза, зажимая этим слезно-носовой канал. Это дает уверенность, что вещество останется только на слизистой оболочке глаза.

Если вещество обладает раздражающим действием, животное закрывает глаза и долго их не открывает. Вещество может вызвать покраснение (гиперемия) слизистых оболочек глаза, отечность век, у некоторых животных наблюдается обильное отделяемое - прозрачное или гнойное. Зрачки в зависимости от действия ядов могут либо расширяться, либо сужиться. При резко выраженном действии яда могут образоваться язвы с гнойным отделяемым, помутнение роговицы, рубцовые изменения век.

## 2.4. Подкожное введение

Перед подкожной инъекцией (п/к) выстригают шерсть в месте будущего укола и протирают кожу спиртом. Пальцами левой руки берут кожу в складку и прокалывают ее у основания, ведя иглу параллельно складке. Под кожу можно вводить не более 30 мл жидкости (морским свинкам - не более 15 мл, крысам - не более 10 мл, мышам - не более 1 мл). При п/к введении направление иглы можно менять несколько раз, чтобы жидкость разместилась более равномерно.

## 2.5. Внутримышечное введение

Место введения готовят как и для п/к инъекции. Иглу вводят в толщу мышцы несколько под углом. Чаще для внутримышечного введения (в/м) используют мышцы бедра, как наиболее мощные. Кроликам можно вводить до 8 мл жидкости, морским свинкам - до 3 мл, крысам - до 5 мл, мышам - не более 0,5 мл.

### 3. СПОСОБЫ ЗАБОРА КРОВИ У ЖИВОТНЫХ

#### 3.1. Венозный способ

Небольшие количества крови получают путем надреза или прокола краевой вены уха кролика. Проколы делают на мелких ветвях ушной вены, начиная с верхушки уха. Для получения 2-5-10 мл крови наружную поверхность уха покрывают тонким слоем жидкого парафина и ухо с внутренней стороны протирают ксилолом, после чего прокалывают вену и собирают кровь в пробирку.

#### 3.2. Пункция сердца

Проводят на кролике либо под уретановым наркозом  $\sim 0,7-1,0$  г/кг 40% раствор уретана; в/в, либо под гексеналовым наркозом  $\sim 5$  мг/кг 10% раствора, в/в.

Место пункции очищают от шерсти и дезинфицируют. Указательным пальцем определяют сердечный толчок и прокалывают грудную клетку, отступив 2-3 мм от левого края грудины, обычно, в области третьего межреберья. Иглу вводят на глубину 2,0-2,5 см. При попадании иглы в полость желудочка в шприце появляется кровь. Так можно получить 20-30 мл крови. После взятия крови в/б или л/к вводят теплый физиологический раствор в двойном объеме от взятой крови.

#### 3.3. Артериальный способ

Максимальное количество крови получают после вскрытия общей сонной артерии кролика (под наркозом). Перерезанный сердечный конец вставляют в сосуд для сбора крови, на мозговой конец накладывают лигатуру. Так можно получить до 50-70 мл крови и сохранить жизнь кролику (перевязать конец артерии, из которой вытекала кровь, зашить рану, ввести в/б или л/к двойной объем теплого физиологического раствора).

У мышей и крыс кровь обычно берут из вен хвоста, при больших потребностях (у крыс) - из сердца или при вскрытии поверхностного верхнеколенного сосуда, лежащего на месте сгиба задней конечности в области колена (вытекающая кровь собирается в кожном кармане).

#### 2.6. Внутривенное введение

Крысу (или мышь) опускают вниз головой. Кожу живота каудальнее пупка берут в складку, у основания которой прокалывают брюшную стенку, держа иглу перпендикулярно. Крысам вводят внутривенно (в/б) до 5 мл жидкости.

#### 2.7. Внутривенное введение

Для внутривенных (в/в) инъекций готовят однородные и прозрачные растворы веществ в воде или в изотонической жидкости (водный раствор 0,9% NaCl). Введение в вену масляных растворов и агентов, вызывающих гемолиз (трисин, ридин, сапонин и т.п.) может привести к смертельному исходу. Весьма большое значение имеет скорость инъекции. После слишком быстрого введения растворов даже малотоксичных веществ могут наступить сильные расстройства кровообращения. Для кроликов и собак оптимальная скорость в/в введения составляет 1 мл/мин, максимум до 3 мл/мин.

Кроликов отличает великолепная сеть развитых ушных вен. Инъекция кроликам (а также кошкам) производится в краевую ушную вену, которая проходит по тонкому краю уха на наружной его поверхности. По ходу вены шерсть выстригается. Для расширения вен ухо слегка массируют и протирают спиртом или ксилолом. У основания уха вена пережимается. Проколы вены следует начинать ближе к верхушке уха, т.к. при частых инъекциях возможна облитерация сосуда в месте укола. Взрослым кроликам можно вводить до 10 мл жидкости/кг.

Для инъекций растворов крысам и мышам более всего подходит дорзальная вена хвоста. Перед инъекцией опускают хвост животного на 1-2 минуты в воду с температурой  $50^{\circ}\text{C}$  до появления гиперемии. Чтобы более отчетливо обозначились вены, корень хвоста сдавливают пальцами. В момент инъекции сдавливание прекращают. Растворы в объеме 0,5 мл для мыши и 1 мл для крысы вприскивают с помощью тонкой иглы.

Морской свинке вещества вводят в поверхностную вену наружной и внутренней поверхности задней конечности, в краевую вену уха, а при введении больших количеств - в поверхностную вену передней конечности ( $\sim 0,5$  см от ступни).

#### 4. ПЕРВИЧНАЯ ФАРМАКО-ТОКСИКОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕЩЕСТВА

Одной из первоочередных задач фармако-токсикологической оценки веществ является установление параметров острой неспецифической токсичности на лабораторных животных. В первую очередь решается вопрос определения абсолютной токсичности при кожно-резорбтивном, энтеральном (через рот) и ингаляционном путях поступления вещества в организм. При определении острой токсичности ориентируются на:

- ✓ внешний вид животного (состояние и блеск шерстного покрова, опрятность, активность, поза);
- ✓ общее состояние и поведение в неврологических тестах (возбуждение или угнетение, подвижность, изменение походки и другие эффекты на функции центральной нервной системы);
- ✓ изменение реакций на внешние раздражители (звук, свет и др.) или изменение физиологических функций организма (дыхания, сердцебиения, массы тела, характера выделения из носа, глаз, рта), а также снижение физической работоспособности в тестах с функциональной нагрузкой (бег на тротуаре, плавание);
- ✓ наличие мышечных фасцикуляций, подергиваний, тремора, парезов, параличей; наличие местного раздражающего и кожно-резорбтивного действия.
- ✓ динамика развития интоксикации после попадания яда в организм, характер интоксикации и ее исход.

При определении токсичности в качестве растворителя обычно используется вода, а в случае плохой растворимости в ней - подсолнечное (оливковое) масло, реже другие растворители. Каждая из исследуемых доз, как правило, вводится в объеме 0,1 мл на каждые 10 г (мыши), 100 г (крысы) или 1000 г (кролики) массы тела. Не прибегают к приготовлению растворов в тех случаях, когда вещество жидкой консистенции, а доза по объему превосходит 0,1 мл на 20 г массы (5000 мг/кг). Количественная характеристика токсичности не устанавливается, если химическое вещество переносится без видимых последствий в энтеральной (per os) дозе 20000 мг/кг. Указанный показатель служит основанием относить такое вещество к разряду практически не токсичных и безопасных по способности вызывать острое отравление.

#### 5. МЕТОД ВЫЯВЛЕНИЯ РАЗДРАЖАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ

Выявление местного и раздражающего действия возможно уже при определении острой токсичности, но требует постановки специальных экспериментов. Нельзя механически переносить данные о кожно-резорбтивной токсичности с одного вида животных на другие без дополнительных коррективов.

Сама проницаемость кожи и скорость всасывания веществ через кожу у разных видов животных и человека неодинакова. Еще большее значение имеет отношение всей поверхности тела к массе. Поверхность тела человека равна ~2 м<sup>2</sup>, при массе тела 70 кг, для мыши поверхность ~ 65,7 см<sup>2</sup>, при массе 20 г; отношение поверхности кожных покровов к массе у человека ~в 11 раз меньше, чем у мыши. Поэтому в случае отрицательного результата (т.е. отсутствие токсических проявлений), полученного в опытах на мышах, можно быть уверенным, что нет оснований ожидать опасного кожно-резорбтивного действия у человека. Вместе с тем, если у мышей развивается кожно-резорбтивное действие, то оно вполне возможно и у человека, но интенсивность и опасность его в тех же условиях много меньше.

При оценке кожно-резорбтивного действия в зависимости от характера наблюдаемых изменений проводят отнесение силы местного и общего резорбтивного действия веществ к одной из трех групп (I-III):

(I) Пробы (вещества), обладающие выраженным раздражающим действием. Вызывают гиперемию (покраснение) с резкой инъекцией сосудов слизистой оболочки и отечностью, слезотечение, а также помутнение роговицы и некроз слизистой.

(II) Пробы (вещества), обладающие умеренным раздражающим действием. Не вызывают видимых органических изменений тканей - таких как некроз и помутнение роговицы.

(III) Пробы (вещества) со слабым раздражающим действием. Могут вызывать лишь кратковременную слабую гиперемию слизистой оболочки глаз или вовсе не вызывать у подопытных животных видимых изменений.

При исследовании чрезвычайно токсичных или высокотоксичных проб (веществ) даже при внесении в конъюнктивальный мешок лишь одной капли может развиться картина общего отравления, вплоть до гибели животного.

## 6. МЕТОД ФУНКЦИОНАЛЬНОЙ НАГРУЗКИ

Физиологическая активность веществ может быть искусственно усилена и, как следствие, повышена чувствительность метода оценки токсичности путем наложения на индикаторный организм дополнительных нагрузок в виде, например, повышенной температуры или увеличения физической нагрузки в тестах «принудительное плавание» и «бег на тротуаре».

## 7. НЕВРОЛОГИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ НА КРЫСАХ

В неврологических исследованиях используют высокую регулярность и воспроизводимость непроизвольных, врожденных реакций, наличие или отсутствие которых дает важную информацию о широком спектре функций головного мозга. Несмотря на свою простоту, неврологические тесты могут дать сведения о функциях всех уровней центральной нервной системы (ЦНС). Такие тесты следует использовать, если есть основания полагать, что химические факторы окружающей среды повлияли на определенный отдел головного мозга, нарушили специфическую функцию или действовали на ЦНС в целом. Так, функции

- ✓ спинного мозга характеризуют рефлексы стибания;
- ✓ продолговатого мозга - реакции вздрагивания, роговичный рефлекс, качание головой;
- ✓ среднего мозга и Варолиева моста - рефлексы переворачивания и равновесия, зрачковые реакции;
- ✓ коры головного мозга - реакция постановки лапы на опоры, хватание, некоторые тесты на исследование равновесия.

## 8. ПРИМЕРЫ ЭКСПЕРИМЕНТОВ НА ЦЕЛОСТНЫХ ЖИВОТНЫХ

### 8.1. Эффективность веществ при различных путях введения

Двум мышам одинаковой массы вводят 25% водный раствор  $MgSO_4$  из расчета 1 г/кг: одной мышши - через рот, другой под кожу. Наблюдают за изменением поведения животных, сравнивают скорости развития эффекта.

### 8.2. Наркотические эффекты, антагонизм

1. Кролика медленно вводят в вену уха 25% водный раствор  $MgSO_4$  из расчета 0,2 г/кг (~0,8 мл/кг). После наступления полного наркоза также в/в вводят 10% водный раствор  $CaCl_2$  из расчета 2,5 мл/кг. Отмечают быстрый

эффект пробуждения (антагонизм) - углубление и учащение дыхания, появление роговичного рефлекса, принятие активной позы.

2. Кролика медленно вводят в вену уха смесь следующего состава: 96%  $C_2H_5OH$  42 мл, водный раствор  $NaCl$  0,9% 8 мл, дистиллированная вода 50 мл. При первых проявлениях наркотического действия прекращают введение смеси и медленно в/в вводят кофеин по 0,5 мл/кг 1% раствора. Отмечают эффект - поведение животного, скорость восстановления рефлекторной возбудимости, учащение и углубление дыхания.

### 8.3. Рефлекторные эффекты ингаляций

1. Кролика без наркоза плотно привязывают к столу вверх животом. В сердце, под контролем пальца, ощущающего максимальный толчок, и в диафрагму втыкают по длинной тонкой игле с флажками разного цвета. Определяют число сердечных сокращений и дыханий в минуту (подсчет движений флажков). Затем подносят к ноздрям кролика ватку, смоченную хлороформом, и отмечают замедление и даже временную остановку сердечных сокращений и дыхания. Тот же опыт через некоторое время повторяют с эфиром или нашатырным спиртом. Отмечают сходство и различие в эффектах.

2. Носовые ходы кролика смазывают (желательно поглубже) ватой, смоченной 0,25% раствором дикаина, и выжидают наступления его действия, после чего вновь проводят пробы с раздражением парами хлороформа и эфира. Затем вынимают флажки, отвязывают кролика и показывают, что поведение его нормально.

### 8.4. Местное и резорбтивное действие веществ

1. У кролика перед опытом подстригают ресницы и длинные волосы около глаз. Вначале определяют состояние нормального рефлекса смыкания век (роговичный рефлекс), который должен наступить при однократном прикосновении волосом к роговице или при раздражении ее электрическим током.

2. Животное укладывают набок. В один глаз закапывают 2 капли 1% раствора дикаина, в другой 2 капли 1% раствора новокаина и держат 1 минуту глаза закрытыми. Через 1, 10 и 20 минут вновь определяют роговичный рефлекс на обоих глазах в ответ на механическое и электрическое раздражения. Сравнивают глубину и длительность терминальной анестезии. Сравнивают



выполнять тестовую физическую нагрузку на третбане в течение 30 минут (в интервале 0-30 минут).

### ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ИЗОЛИРОВАННЫХ ОРГАНАХ

Процессы, лежащие между применением веществ и биологическим эффектом, условно можно разделить на 3 главных этапа:

1. Введение вещества в организм. Концентрация вещества в «биофазе», т.е. в непосредственной близости с рецепторами, зависит от дозы введенного вещества и от массы факторов, часть которых неизвестна. Среди известных - путь введения, гидро- и липофильность, степень ионизации молекулы при биологических pH, биотрансформация.
  2. Момент контакта вещества с рецептором и последующие изменения на уровне рецептора. Степень этих изменений зависит от: (А) концентрации вещества в биофазе; (Б) «сродства (аффинитета)» и «внутренней активности» вещества.
  3. Стимул или генерация цепи биохимических процессов, приводящих к биологическому эффекту.
- Если ставится цель изучить процессы, протекающие при взаимодействии вещества с рецептором, т.е. проанализировать связь «структура-активность», то необходимо обеспечить константность этапов (1) и (3) («концентрация вещества в биофазе» и «стимул-эффект»). В условиях целого организма (in vivo) этого достичь практически невозможно. Такие факторы, как перераспределение в организме, биотрансформация вещества, могут сильно изменить концентрацию в биофазе. Вот почему молекулярная фармакология ориентируется преимущественно на эксперименты «ex vivo» и «in vitro» (биохимические опыты «в пробирке»).

В этом случае почти единственным детерминирующим фактором в 1-й фазе становится концентрация вещества в фармакологической ванночке. Влияние таких факторов, как метаболизм, циркуляция и пр., сильно уменьшается и равновесие между веществом и рецептором достигается легко и быстро. При этом 3-я фаза также дает гораздо более постоянные данные, т.к. в этих случаях вообще исследуются гораздо более элементарные эффекты, чем в целом организме.

Существенный недостаток методологии «in vitro» заключается в том, что она не дает информации об изменении функций в целом организме, который имеет достаточно мощные компенсаторные и регуляторные возможности.

17

также величину зрачков, их реакцию на яркий и тусклый свет, кровенаполнение конъюнктив.

3. Закапывают в глаз кролика 2-3 капли 3% раствора сапонина и отмечают явления раздражения.

4. Закапывают в глаз кролика 1-2 капли 0,1% раствора адреналина хлористоводородного и через 2-3 мин сравнивают кровенаполнение конъюнктивы с кровенаполнением до введения адреналина. Расширения зрачка обычно не наблюдается.

5. Отмечают у кролика величину зрачков, характер и ритм дыхания, ритм сердечных сокращений и температуру в прямой кишке. Затем вводят под кожу 25 мг/кг новокаина (0,5 мл/кг 5% раствора). Отмечают влияние на величину зрачков, дыхание (ритм, характер) и температуру.

6. Смазывают 2-3 раза брюшко лягушки 96% раствором  $C_2H_5OH$ . Наблюдают явления кожно-резорбтивного действия.

7. При скрининге периферических миорелаксантов широко практикуют испытания на интактных кроликах с использованием теста «симптом склонения головы» (ССГ). Кролики получают постепенно возрастающие дозы исследуемого вещества в/в в течение 5 сек в объеме 1 мл/кг. ССГ фиксируется, когда кролик склоняет голову к полу и не может поднять ее, несмотря на легкий удар по носу. Определяют  $ED_{50}$  исследуемого вещества и сопоставляют с аналогичной дозой для d-тубокурарина.

8. В вену уха кролика вводят литилин или декаметоний (0,1-0,2 мг/кг) и отмечают изменение тонуса шейных мышц животного (ССГ).

9. Наблюдают за поведением кролика, подсчитывают число дыханий в минуту, проверяют роговичный рефлекс. Внутривенно вводят натрия оксибутират в дозе 1,5 г/кг. Через 15 минут повторно проверяют роговичный рефлекс, отмечают изменение дыхания. Наблюдают за наступлением мышечной релаксации, в том числе отмечая ССГ.

10. Опыт проводится на белых беспородных мышках обоего пола массой 18-22 г, предварительно тренированных к бегу на третбане в течение 30 минут при скорости движения ленты 1 км/ч и угле подъема 0°. Водный раствор прозерина метилсульфата (ингибитор холинэстераз) в дозе 0,25 мг/кг (из раствора 0,025%), вводится 8 мышам внутривенно в объеме 0,1 мл на каждые 10 г массы за 5 минут до начала выполнения физической нагрузки на третбане. Контрольным мышам вводится физиологический раствор. Критерием токсичности пробы служит неспособность тренированных к бегу мышей

16

## 9. ФИЗИОЛОГИЧЕСКИЕ РАСТВОРЫ

Физиологические (изотонические) растворы для холоднокровных содержат 0,6-0,75% NaCl, для млекопитающих 0,8-0,9% NaCl. Они пригодны лишь для в/в инъекций и для коротких опытов на нервных стволах и мышечных препаратах, хотя и здесь лучше пользоваться более сложными физиологическими растворами с буферными возможностями (для стабилизации pH), содержащими ионы Ca, K, Mg, глюкозы. Все эти растворы в различных модификациях называются растворами Рингера, Кребса, Тироде, Локка, де Желона.

Функционирование изолированных органов (*ex vivo*) в искусственных условиях наиболее приближается к нормальному при  $pH=7,0-7,8$ , и в этих пределах оно изменяется мало.

Желательно применять свежедистиллированную воду, т.к. при стоянии вода становится кислой (абсорбция  $CO_2$  воздуха); для удаления  $CO_2$  перед приготовлением раствора воду следует прокипятить (при употреблении буферных растворов можно этого не делать). Выгодно пользоваться концентрированными растворами солей (чтобы каждый раз не взвешивать):  $CaCl_2$ ,  $KCl$ ,  $NaHCO_3$ ,  $MgSO_4$  - 10%. Для  $NaH_2PO_4$  желательно иметь 5% раствор, для NaCl - 9%.

Важна последовательность растворения компонентов: сначала растворяют в большом количестве воды NaCl, затем KCl, после него -  $NaHCO_3$  и (если нужно)  $NaH_2PO_4$ ; после этого прибавляют  $CaCl_2$  при постоянном и сильном взбалтывании. Глюкозу добавляют непосредственно перед опытом.

Для получения 1 литра раствора Рингера-Локка поступают таким образом: 100 мл 9% NaCl разводят водой до 950 мл, затем прибавляют 2,0 мл 10% KCl, потом 2,0 мл 10%  $NaHCO_3$  и 2,0 мл 10%  $CaCl_2$ , после чего доводят водой до 1 л.

При приготовлении раствора Тироде для теплокровных по Магнусу лучше готовить раздельно 2 раствора (А и Б):

1-й раствор (А) - 8,0 г NaCl, 2,0 мл 10% KCl, 2,0 мл 10%  $CaCl_2$  и 1,0 мл 10%  $MgCl_2$  последовательно растворяют в 900 мл дистил. воды;

2-й раствор (Б) - 1,0 г  $NaHCO_3$  и 1,0 мл 5%  $NaH_2PO_4$  растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Оба раствора хранят в хорошо закрытых емкостях. Перед употреблением их перемешивают, постепенно подливая 2-й раствор к 1-му при постоянном встряхивании. При частом использовании раствора Тироде лучше иметь запас растворов удвоенной концентрации, которые можно

хранить неделями; перед употреблением разводят растворы (А и Б) в 2 раза дистиллированной водой и прибавляют глюкозу по 1,0 г на 1 л.

Для приготовления раствора Кребса также лучше иметь раздельно 2 раствора (А и Б):

1-й раствор (А) - 6,9 г NaCl, 3,5 мл 10% KCl, 2,8 мл 10%  $CaCl_2$  и 2,0 мл 10%  $MgSO_4$  последовательно растворяют в 900 мл дистил. воды;

2-й раствор (Б) - 2,09 г  $NaHCO_3$  и 3,2 мл 5%  $KN_2PO_4$  растворяют в 100 мл дистиллированной воды. Последующие рекомендации аналогичны тем, что описаны для раствора Тироде. Глюкозу (1 г/л) добавляют перед опытом.

Любое испытуемое вещество должно растворяться в воде и быть совместимым с физиологическим раствором. Обычно растворы исследуемого вещества добавляются в ванночку в соотношении 1:100 ее объема. При использовании ванночки на 50 мл раствор испытуемого вещества следует вводить в объеме 0,5 мл. Удобнее заранее приготовить высококонцентрированный исходный раствор вещества в дистиллированной воде (например, 1 мг/мл). Ошибка разведения при этом меньше, чем при приготовлении 1 мкг/мл.

## 10. ЭКСПЕРИМЕНТЫ НА ФРЕНИКО-ДИАГРАМАЛЬНОМ ПРЕПАРАТЕ

Общезвестна чрезвычайно высокая чувствительность синаптических образований нервной ткани млекопитающих к микроколичествам веществ.

Изолированные нервно-мышечные препараты скелетных (поперечно-полосатых) мышц используются для оценки избирательной токсичности веществ, действующих в области холинергических нервных окончаний (пестициды с антихолинэстеразным механизмом действия, соли тяжелых металлов из группы тиоловых ядов - Co, Ni и др.).

1. Крупную крысу (или морскую свинку) забивают и обескровливают. Вскрывают грудную клетку справа от грудины и затем проводят разрез проксимальнее места прикрепления диафрагмы. Передняя часть левой грудной стенки удаляется и осторожно выделяется диафрагмальный нерв. Обе доли легкого удаляют. Из диафрагмы вырезают веерообразную полосу. Разрезы проводят параллельно мышечным волокнам диафрагмы в 3 см слева и справа от места вхождения диафрагмального нерва. Полосу выделают с диафрагмальным нервом длиной около 2,5 см. Препарат фиксируют в ванночке для изолированных органов на 50 мл. Сухожильный конец диафрагмы

соединяют нитью с регистрирующим рычагом изометрического датчика силы мышечных сокращений. Нерв стимулируют прямоугольными толчками тока с частотой 0,2 Гц. Ванночку заполняют либо раствором Тироде, либо раствором Krebsa, через который пропускается карбоген (95%O<sub>2</sub>+5%CO<sub>2</sub>). Экспозиция действия веществ составляет 3 мин. Затем нервно-мышечный препарат отмывают сразу после окончания воздействия вещества и через 2, 4 и 6 мин повторно. Следующую инъекцию проводят через 5 мин после заключительного отмывания.

2. Закрепляют френико-диафрагмальный препарат морской свинки в ванночке. После «уравновешивания» с физиологическим раствором стимулируют диафрагмальный нерв сверхпороговыми импульсами тока с частотой 0,2 Гц. Убеждаются в стабильности амплитуды исходных сокращений мышцы. Вводят в ванночку возрастающие концентрации периферического миорелаксанта декаметония: 10<sup>-7</sup>М, 10<sup>-6</sup>М, 10<sup>-5</sup>М. Отмечают изменения амплитуды сокращений в процентах к исходной. Затем отмывают препарат 4-кратно (см. выше), добиваясь восстановления исходной амплитуды сокращений.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Батрак Г.Е., Кудрин А.Н. Дозирование лекарственных средств экспериментальным животным. -М.: Медицина, 1979.-167 с.
2. Буреш Я., Бурешова О., Хьюстон Дж. П. Методики и основные эксперименты по изучению мозга и поведения. [пер. с англ.]. – М.: Высш. шк., 1991. – 399 с.
3. Гацура В.В. Методы первичного фармакологического исследования биологически активных веществ. -М.: Медицина, 1974.
4. Елизарова О.Н. Определение пороговых доз промышленных ядов при пероральном введении. -М.: гос. Изд. мед. лит-ры, 1962.-174 с.
5. Николаев М.П. Экспериментальные основы фармакологии и токсикологии (практическое руководство). Наркомздрав СССР. Медгиз, 1941.-196 с.
6. Петков В. Лекарство, организм, фармакологический эффект. - София: Медицина и физкультура, 1974.-350 с.
7. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. – М.: ЗАО ИИИА Ремедиум, 2000. – 398 с.

ПРИЛОЖЕНИЕ

Дозирование веществ лабораторным животным

**МЫШИ:**

Тест «местное действие»; аппликация на кожу по 0,005 мл на каждые 10 г массы

мл/кг	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	5,0	50,0	500,0
% р-ра	0,02	0,04	0,06	0,08	0,1	1,0	10,0	100,0

Тест «токсичность»; в/в, в/м, в/б по 0,1 мл на каждые 10 г массы тела

масса / мл/кг	19	20	21	22	23	24	25	% р-ра
1	0,19	0,2	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,01
2	0,38	0,4	0,42	0,44	0,46	0,48	0,5	0,01
3	0,57	0,6	0,63	0,66	0,69	0,72	0,75	0,01
4	0,76	0,8	0,84	0,88	0,92	0,96	1,0	0,01
5	0,95	1,0	1,05	1,1	1,15	1,2	1,25	0,01
5	0,095	0,1	0,105	0,11	0,115	0,12	0,125	0,1
6	0,114	0,12	0,126	0,132	0,138	0,144	0,15	0,1
7	0,133	0,14	0,147	0,154	0,161	0,168	0,175	0,1
8	0,152	0,16	0,168	0,176	0,184	0,192	0,2	0,1
9	0,171	0,18	0,189	0,198	0,207	0,216	0,225	0,1
10	0,19	0,2	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	0,1
15	0,285	0,3	0,335	0,33	0,345	0,36	0,375	0,1
20	0,38	0,4	0,42	0,44	0,46	0,48	0,5	0,1
100	0,19	0,2	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	1
500	0,19	0,2	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	5
1000	0,19	0,2	0,21	0,22	0,23	0,24	0,25	10

**КРЫСЫ:**

Тест «токсичность»; в/м, п/к, в/б по 0,1 мл на каждые 100 г массы тела

мл/кг	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	1,0	10,0	100,0	1000,0
% р-ра	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,1	1,0	10,0	100,0

**КРОЛИКИ:**

Тест «токсичность»; в/в по 0,1 мл на каждый 1 кг массы тела

мл/кг	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9
% р-ра	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9

Подписано в печать 26. 04. 07.  
 Формат 60x84 1/8. . Гарнитура «Times» Печать ризографическая.  
 Печ. л. 1,5. Тираж 100 экз. Заказ 149.

Лаборатория оперативной полиграфии УМУ КГУ  
 420045, Казань, ул. Кр. Позиция, 2а.  
 Тел. 231-52-12.