

Министерство здравоохранения Российской Федерации  
(Минздрав России)

**Федеральное медико-биологическое агентство  
(ФМБА России)**

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации  
Группа 21. Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Оценка морфофункциональных нарушений у потомства  
как результата воздействия экотоксикантов  
на организмы родительских особей**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.45-17

Москва 2017

## Предисловие

1. Разработаны Федеральным государственным бюджетным учреждением науки «Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУН ИТ ФМБА России).

Директор – д.м.н. М.Б. Иванов.

2. Исполнители: д.м.н. А.В. Носов, к.б.н. Д.С. Лисицкий, д.м.н., профессор А.Н. Петров, д.м.н., профессор Лесиовская Е.Е., д.м.н., профессор А.Л. Коваленко, д.м.н., профессор Г.И. Сидорин, д. м. н. В.А. Кашуро, к.б.н. Н.В. Томилин, д.м.н. Ю.Ю. Ивницкий, к.м.н. М.А. Зайцева, к.м.н. С.В. Степанов, к.м.н., доцент М.К. Шевчук, к.б.н. Е.Г. Батоцыренова, к.м.н. С.Г. Дагаев, к.м.н. Л.И. Дьякова, к.б.н. Л.Г. Кубарская, к.б.н. К.И. Стосман, к.б.н. Н.И. Сходкина, к.б.н. О.А. Филько, к.б.н. А.В. Храброва, Н.А. Белякова, Е.К. Георгианова, к.б.н. А.В. Швецов, к.б.н. Н.Е. Соловьева, А.Ф. Фахардо, Н.М. Воробьева, К.О. Войцехович, А.С. Мелехова, Е.Б. Скоморохова.

3. В настоящем документе реализованы требования Законов Российской Федерации:

– от 12 апреля 2010 г. № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств»;

– от 22 июля 1993 г. № 5487-1 «Основы законодательства Российской Федерации об охране здоровья граждан» (с изменениями, внесенными Указом Президента Российской Федерации от 24 декабря 1993 г. № 2288);

– от 30 марта 1999 г. № 52-ФЗ «О санитарно-эпидемиологическом благополучии населения»;

– от 21 декабря 1994 г. № 68-ФЗ «О защите населения и территорий от чрезвычайных ситуаций природного и техногенного характера»;

– от 31 мая 2001 г. № 73-ФЗ «О государственной судебно-экспертной деятельности в Российской Федерации».

4. Утверждены и введены в действие Федеральным медико-биологическим агентством «26» июля 2017 г.

5. Введены впервые.

## Содержание

Предисловие.....	2
Введение.....	4
1 Область применения.....	6
2 Нормативные ссылки.....	7
3 Обозначения и сокращения.....	8
4 Основные положения.....	10
4.1 Краткая характеристика изучаемых экотоксикантов.....	10
4.2 Общие подходы к созданию экспериментальных моделей отравления эктоксичными агентами.....	11
4.3 Оценка вегетативных и неврологических показателей половозрелого потомства..	16
4.4 Оценка генотоксического действия экотоксикантов на родительские особи.....	17
4.5 Биохимические маркеры влияния экотоксикантов на родительские особи.....	18
4.6 Иммунологические маркеры экотоксикантов.....	21
Библиография.....	22
ПРИЛОЖЕНИЕ А (обязательное) Основные методы оценки вегетативных и нейрофизиологических функций лабораторных животных.....	24
ПРИЛОЖЕНИЕ Б (обязательное) Исследование генотоксичности экотоксикантов (спиртов, бериллия сульфата, НДМГ) методом щелочного гель-электрофореза.....	31
ПРИЛОЖЕНИЕ В (обязательное) Метод определения функционального состояния печени с помощью бромсульфалеиновой пробы.....	33
ПРИЛОЖЕНИЕ Г (обязательное) Иммунологический метод исследования реакции торможения миграции лимфоцитов.....	35

## Введение

За последние 20 лет в нашей стране наметилась устойчивая депопуляция населения, т.е. спад рождаемости, который в дальнейшем приведет к уменьшению количества жителей России и трудовых ресурсов. В период с 1995 по 2015 год общая численность жителей России сократилась почти на пять миллионов человек, и ситуация продолжает оставаться достаточно сложной. Более того по коэффициенту фертильности (количество детей, которые в среднем за жизнь рождает одна женщина в детородном возрасте) Российская Федерация занимает 179 место (1,61 младенец в пересчете на одну женщину) в мире. Более того, есть основания полагать, что к 2025 году число женщин в самом подходящем для зачатия и родов возрасте – от 20 до 25 лет – сократится в 1,7 раза [1].

Одной из причин такого демографического спада является значительное ухудшение экологической ситуации в нашей стране. В современных условиях человечество подвергается комплексному комбинированному воздействию многообразных агрессивных факторов внешней среды (ксенобиотиков), большинство которых имеет техногенное происхождение. Массированное поступление этих загрязнителей в окружающую среду в результате техногенных катастроф, с выбросами промышленных предприятий и транспорта приводит к ухудшению как основных показателей здоровья населения (инвалидность, заболеваемость детей и взрослых, смертность), так и репродуктивного здоровья [2].

Ксенобиотики могут оказывать неблагоприятное воздействие на любом этапе реализации репродуктивной функции, начиная с созревания половых клеток (гамет) до оплодотворения, в периоде развития зародыша и плода – после оплодотворения, заканчивая эмбриогенезом и плодным периодом развития. Установлено, что комплексное и длительное поступление химических репродуктивных веществ в организм усиливает их тератогенную и эмбриотоксическую активность даже на пороговых и подпороговых уровнях воздействия. Установлена возможность прохождения через плацентарный барьер основных ксенобиотиков. В настоящий момент насчитывается более 600 химических веществ, способных проникать от матери к плоду через плаценту [3].

Частным случаем функционального тератогенеза является способность ряда гормональных, антигормональных и нейротропных препаратов в период половой дифференциации мозга, когда происходит формирование у плода паттерна развития полового и других форм поведения, а также нейроэндокринной регуляции овариального цикла, нарушать эти процессы без нарушения морфологии. Вызванные этими веществами нарушения функции обнаруживаются после достижения половой зрелости и сохраняются на протяжении всего репродуктивного периода жизни человека [4].

В доступных источниках подробно описаны основные проявления тератогенного действия на человека ряда медикаментозных препаратов и алкоголя, в то же время данные о подобных эффектах со стороны потенциально опасных веществ, представляющих интерес для промышленной и экотоксикологии, представлены в значительно меньшей степени [5].

Вышеизложенное указывает на необходимость постоянного совершенствования систем и принципов исследования взаимодействия промышленных экотоксикантов с организмом человека и животных в ходе репродуктивного цикла, выяснения молекулярной природы нарушения генеративной функции в целом, прогнозирования и ранней диагностики их нарушений, поиска рациональных путей и систем профилактики, эффективной дезинтоксикации (фармакологической коррекции), особенно в направлении повышения иммунобиологической резистентности к химическому антропогенному воздействию.

УТВЕРЖДАЮ  
УТВЕРЖДАЮ

Заместитель руководителя  
Федерального медико-биологического  
агентства



Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации  
Группа 21. Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Оценка морфофункциональных нарушений у потомства как результата воздействия  
экоотоксикантов на организмы родительских особей**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.45-17

---

**1 Область применения**

Разработка экспериментальных моделей острой и хронической интоксикации экоотоксикантами (производные гидразина, бериллий) и спиртами родительских особей, и экспериментальная оценка отдаленных последствий у их потомства.

В основу представленных методических рекомендаций легли результаты экспериментальных исследований, проводимых в ФГБУН «Институте токсикологии Федерального медико-биологического агентства», в области изучения отдалённых последствий (эмбриотоксическое и тератогенное действие), длительного низкодозового воздействия высокотоксичных экоотоксикантов и спиртов.

Методические рекомендации предназначены для токсикологов, фармакологов, физиологов, а других специалистов, интересующихся вопросами тератогенности, репродуктивной и эмбриотоксичности опасных промышленных экоотоксикантов и ксенобиотиков.

## 2 Нормативные ссылки

В настоящем документе использованы ссылки на нормативные документы:

- Федеральный закон от 12.04.2010 (ред. от 13.07.2015) № 61-ФЗ «Об обращении лекарственных средств».
- ГОСТ 33044-2014 от 01.08.2015 «Принципы надлежащей лабораторной практики».
- «Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ», М., Медицина, 2005, 832 с.
- Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Изд-во Гриф и К, 2012. – 944 с.
- Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ– 2-е изд. / Под. ред. Р.У. Хабриева. – М.: Медицина, 2005. – 832 с.
- Приказ МЗ РФ № 199н «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» от 01.04. 2016 г.
- Постановление главного государственного санитарного врача РФ № 51 от 29.08.2014 Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

### **3 Обозначения и сокращения**

ПЖ – поведение животных

ТМ – тонус мышц

УРПИ – условная реакция пассивного избегания

ЦНС – центральная нервная система

БСФ – бромсульфалеин

ОЦК – объём циркулирующей крови

РТМЛ – реакция торможения миграции лимфоцитов

ЦИК – циркулирующие иммунные комплексы

ЧД – частота дыхания

ЧСС – частота сердечных сокращений

ЭКГ – электрокардиограмма

ГГАС – гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система

НДМГ – несимметричный диметилгидразин

### **4 Термины и определения**

Токсичность – токсикометрический показатель, вычисляемый как величина, обратная средней смертельной дозе или средней смертельной концентрации токсичного вещества.

Выраженная токсичность – общий термин, описывающий явные признаки токсичности, вызванные введением исследуемого вещества. Они должны быть достаточны для оценки опасности и такими, чтоб повышение водимой дозы предполагало в результате тяжёлые токсические проявления и возможную смерть.



Доза – количество вводимого вещества. Доза выражается либо по массе (г, мг), либо массой тестируемого вещества на единицу массы тела животного (г, мг/кг), либо постоянной концентрацией в пище (ppm).

Дозировка – основное понятие, включающее в себя дозу, частоту и продолжительность введения.

Материнская токсичность – неблагоприятное воздействие на беременных самок, происходящее как непосредственно (прямое воздействие), так и опосредовано (непрямое воздействие).

Ослабление фертильности – расстройство мужских и женских репродуктивных функций или способностей.

Репродуктивная токсичность – неблагоприятное воздействие на потомство и/или ослабление мужских и женских репродуктивных функций или способностей.

Эмбриотоксичность – проявление репродуктивной токсичности, представляющее собой пред-, пере-, постнатальные структурные или функциональные расстройства потомства.

## **5 Основные положения**

### **5.1 Краткая характеристика изучаемых экотоксикантов**

К репродуктивным экотоксикантам относят химические, физические или биологические агенты, оказывающие вредное влияние на физиологические, биохимические процессы и функции репродукции человека и животных как в экспериментальном, так и в производственном аспекте.

Среди приоритетных групп экотоксикантов, подлежащих постоянному мониторингу и контролю, особое значение приобретают ксенобиотики, обладающие высокой биодоступностью и классом опасности для здоровья человека и животных. К таким экотоксикантам относят компоненты ракетных топлив на основе гидразина и его производных, тяжелые металлы и целый ряд органических спиртов.

Несимметричный диметилгидразин (1,1-диметилгидразин, гептил, НДМГ) широко используется в качестве эффективного высокоэнергетического ракетного топлива, а также в синтезе полимеров и пластмасс, медицинских препаратов, регуляторов роста растений, ингибиторов коррозии и т.д. Он является токсичным веществом 1 класса опасности. Всемирной организацией здравоохранения НДМГ внесен в список особо опасных химических соединений. НДМГ обладает нейротропным, гепатотропным, гемолитическим, эмбриотоксическим, тератогенным, мутагенным и канцерогенным действием [6]. Известно, что НДМГ легко окисляется под действием света и кислорода в окружающем воздухе, а в организме способен к метаболическому превращению с образованием формальдегида, нитрозодиметиламина (НДМА), тетраметилтетразена, глюкозодиметилгидразона, аммиака и диоксида углерода [7].

Среди тяжелых металлов, в большом количестве поступающих в окружающую среду, особое значение приобретают металлы, обладающие высокой опасностью для здоровья с мало изученными токсическими свойствами, например, бериллий. По воздействию на организм человека он относится к чрезвычайно опасным веществам (первый класс опасности согласно ГОСТу 12.1.007-76). Этот металл и его соединения находят широкое применение в промышленности. Так это незаменимый металл для оболочек ядерных реакторов в качестве отражателя нейтронов и изолирующего материала, для производства рентгеновских, неоновых трубок и люминофоров. Сплавы бериллия используются в ракетостроении, приборостроении, космической технике, электронике и оборонной промышленности.

Однако влияние бериллия и его соединений на материнский организм и потомство является слабо изученным. Известно, что бериллий обладает способностью кумулировать в организме матери и проникать через плаценту в кровоток плода, накапливаясь в его органах, что может неблагоприятно сказываться на развивающемся организме в постинтоксикационном периоде. В связи с тем, что бериллий проявляет специфическое иммунотоксическое действие, остаются не выясненными характер и специфичность морфофункциональных нарушений у такого потомства, связь этих изменений с патологическими процессами в иммунной системе матери.

В настоящее время перечень соединений, вызывающих острые отравления и хронические интоксикации, с которыми сталкиваются практикующие врачи-токсикологи, постоянно расширяется. К таким соединениям можно отнести двухатомный спирт – 1,4-бутандиол, ко-

торый широко используется в качестве промышленного растворителя и сырья для синтеза полимеров. Клинические проявления токсического действия 1,4-бутандиола, схожие с картиной интоксикации гидроксibuтиратом натрия, а также свободный доступ к бутандиолу на рынке служат причиной употребления данного соединения с целью наркотического опьянения [8]. На сегодняшний день в литературе отсутствуют данные о влиянии 1,4-бутандиола на репродуктивную функцию родительских особей и морфофункциональное состояние родившегося при этом потомства.

## **5.2 Общие подходы к созданию экспериментальных моделей отравления эктоксичными агентами**

### 5.2.1 Экспериментальные животные

В исследовании в качестве тест-системы используют беспородных белых крыс-самцов и крыс-самок, весом 180-220 г., возраст 3 месяца. Крысы являются стандартным объектом токсикологических исследований и наиболее часто используются в токсикологических экспериментах.

#### 5.2.1.1 Содержание животных

Животных содержат в стандартных условиях в соответствии с правилами, утвержденным Постановлением главного государственного санитарного врача РФ № 51 от 29.08.2014 Об утверждении СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)».

#### 5.2.1.2 Клетки

Животных содержат в поликарбонатных клетках, группами по 10 особей одного пола, на подстиле; клетки покрывают стальными решетчатыми крышками с кормовым углублением. Беременные самки по одной особи в клетке с потомством.

#### 5.2.1.3 Подстил

В качестве подстилки используют опилки.

#### 5.2.1.4 Корм

«Корм для содержания лабораторных животных» ПК-120-1, приготовленный по ГОСТ Р 50258-92 в соответствии с нормами утвержденными приказом МЗ СССР №755 от 12.08.77 г. Животные получают *ad libitum* в кормовое углубление стальной решетчатой крышки клетки. Данные о составе и качестве корма от производителя хранятся в документации лаборатории.

#### 5.2.1.5 Вода

Животным дают воду, соответствующую ГОСТ Р 51232-98 «Вода питьевая». Вода в стандартных поилках со стальными крышками-носиками, предоставляется животным *ad libitum*.

#### 5.2.1.6 Условия окружающей среды

Животных содержат в условиях окружающей среды (18-22°C и относительной влажности воздуха 30-70%). В комнатах содержания животных поддерживают 12 часовой цикл освещения.

#### 5.2.1.7 Карантин

Лабораторные животные до начала исследования содержатся 14 дней для адаптации при групповом содержании в клетках. Во время этого периода у животных каждый день контролируется клиническое состояние путём визуального осмотра. Животных с обнаруженными в ходе осмотра отклонениями в экспериментальные группы не включают.

#### 5.2.1.8 Распределение по группам, объём выборки

Животных распределяют по группам с использованием в качестве основного критерия массы тела, таким образом, чтобы индивидуальное значение массы тела не отклонялось от среднего значения в пределах одного пола более чем на 10%. Оптимальная группа родительских особей для оценки не менее 10 животных обоих полов, выборка родившегося потомства 6-8 животных (по 3-4 животных разного пола) от не менее 8 матерей.

#### 5.2.1.9 Идентификация животных

Каждому отобранному в исследование животному присваивается индивидуальный номер, название исследования, номер исследуемой группы. Индивидуальные номера содержащихся в группе животных также указываются на карточке клетки.

#### 5.2.1.10 Осмотр животных в клетках

Ежедневно всех животных осматривают в клетках: непосредственно после введения исследованных растворов и в конце дня. Данные отражаются в лабораторных записях.

### 5.2.2 Алгоритм моделирования

#### 5.2.2.1 Определение среднесмертельной дозы НДМГ, сульфата бериллия и 1,4-бутандиола

Среднесмертельная (или абсолютно смертельная) доза при введении в желудок ( $LD_{50}$ ) – количество вредного вещества, вызывающего гибель 50 % животных при однократном введении в желудок.

На первом этапе определяют среднесмертельные дозы для исследуемого вещества с использованием различных методов. Пути введения токсикантов могут быть любыми. Однако для моделирования интоксикаций нейротоксичными агентами целесообразно выбирать внутрибрюшинный путь введения. Это позволяет стандартизировать схему введения и уменьшить вариабельность клинических проявлений интоксикации.

#### 5.2.2.2 Моделирование острой и хронической интоксикации НДМГ, сульфатом бериллия и 1,4-бутандиолом родительских особей

Острую интоксикацию самкам белых беспородных крыс моделируют путём однократного внутрижелудочного введения исследуемых веществ: раствор НДМГ в дозе 122 мг/кг; раствор бериллия сульфата – 4800 мг/кг; раствор этилового спирта – 8 г/кг; 1,4-бутандиол – 1,4 г/кг. Контрольным животным – крысам-самкам вводят воду дистиллированную, внутрижелудочно в объеме, соответственно модели.

Хроническую интоксикацию исследуемых токсикантов моделируют внутрижелудочным введением несимметричного диметилгидразина или сульфата бериллия в дозе, соответствующей  $0,1LD_{50}$ , а спиртов в дозе  $0,5LD_{50}$ .

Хроническое введение раствора несимметричного диметилгидразина (НДМГ) крысам-самкам проводится ежедневно в течение 30 дней, внутрижелудочно, в дозе 12,2 мг/кг (из расчёта 3,1 мл 0,08 % раствора НДМГ на 200,0 г массы крысы).

Хроническое введение раствора бериллия сульфата ( $BeSO_4 \times 4H_2O$ ) крысам-самкам проводится ежедневно в течение 30 дней, внутрижелудочно, в дозе 480 мг/кг (из расчёта 3,2 мл 3 % раствора бериллия сульфата на 200,0 г массы крысы).

Хроническое введение 1,4-бутандиола крысам-самкам проводится ежедневно в течение 30 дней, внутрижелудочно, в дозе 0,7 г/кг (из расчёта 2,8 мл 5 % раствора 1,4-бутандиола на 200,0 г массы крысы). В выходные дни животные получают 2,5 % раствор 1,4-бутандиола без доступа к воде.

Контрольным животным – крысам-самкам вводят воду дистиллированную, внутрижелудочно в объеме, соответственно модели.

В течение всего срока эксперимента у животных еженедельно регистрируют массу тела, потребление корма и воды, ежедневно визуально оценивают внешний вид, поведение и общее состояние. Оценивают ежедневно эстральный цикл самок до введения вещества, во время введения и до наступления беременности в соответствии с «Руководством по проведению доклинических исследований лекарственных средств» (под редакцией А.Н. Миронова).

5.2.2.3 Моделирование оценки острого и хронического воздействия экотоксикантов на родительские особи на рост и развитие их потомства

После острого введения на 15 сутки и хронического введения на 31 сутки животных готовят к процессу спаривания. Для этого к самкам подсаживают самцов, в соотношении на 3 самки 1 самец. Днём предполагаемой беременности считают день обнаружения во влагалище самки сперматозоидов или их частей и визуальное подтверждение под микроскопом (методика утверждена соответствующей стандартной операционной процедурой).

В течение всего срока эксперимента (до наступления и после наступления беременности) у крыс-самок еженедельно регистрируют массу тела, потребление корма и воды, ежедневно визуально оценивают внешний вид, поведение и состояние животных.

У родившегося потомства регистрируют изменения следующих параметров физического развития и морфофункциональных нарушений:

- сроки отлипания ушной раковины (со 2-х суток);
- пол (самцы/самки) начиная со 2-х суток;
- массу тела (г) на 4-е, 7-е, 14-е и 21-е сутки;
- появление первичного волосяного покрова, начиная с 5-х суток;
- прорезывание резцов с 8-х суток;
- открытие глаз на 12-14 сутки;
- опускание семенников у самцов на 23-25 сутки;
- открытие влагалища у самок на 28-30 сутки.

Проводится изучение скорости созревания сенсорно-двигательных рефлексов в период вскармливания:

– Переворачивание на плоскости (оценивается на 4-9 сутки). Исследуемую тест-систему укладывают на плоской поверхности на спину, отпускают (быстро) и измеряют время, необходимое для возвращения в нормальное положение. Формирование рефлекса считается завершённым (в среднем – на 8-й день), если происходит возвращение на все 4 лапы. Тест проводят не более чем по 30 секунд с каждым животным (до полного формирования рефлекса во всех группах).

– Отрицательный геотаксис (оценивается на 5-9 сутки). Тестирование проводят 1 раз в день, по 1 минуте. Тест-систему помещают на наклонную плоскость (по горизонтали – 25°) вниз головой. Рефлекс считается сформированным, если крысята поворачиваются на 180° – головой в сторону возвышения платформы (в среднем – 7-й день). Можно измерять время удержания на наклонной плоскости. Исследования проводят до полного формирования рефлекса во всех группах.

– Избегание обрыва (оценивается на 6-10 сутки). Тест-систему укладывают на горизонтальную поверхность или возвышающуюся над клеткой платформу таким образом, что передние лапы касаются края стола. Формирование рефлекса завершено (в среднем – 9-й день), если в течение 10 секунд происходит отползание от края площадки. Исследования проводят до полного формирования рефлекса во всех группах.

– Двигательная активность: поднятие головы и передних лап (с 8-9 суток); ползание (с 9-11 суток); опора на задние конечности, подъём всего тела (с 13-15 суток); умывания различного рода, обнюхивания, время отсутствия активности, возможные аномалии походки (с 17-20 суток). Двигательную активность можно оценивать как на обычном столе для манипуляций, так и в камере «открытого поля». Время оценки от 2-х до 5-ти минут, устанавливается в начале проведения эксперимента.

На 30-е сутки животных разных полов (самцы/самки) рассаживают.

### 5.2.3 Моделирование острого стрессорного воздействия потомства после острого и хронического воздействия экотоксикантов на родительские особи

Адаптация – способность организма приспосабливаться к постоянно изменяющимся условиям окружающей среды, выработанная в процессе эволюции [9].

Индукцированный острый или хронический стресс, частным случаем которого является химическая интоксикация материнского организма, с самого начала беременности способен задержать развитие плода. Показано, что в последнем триместре беременности у крыс гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система (ГГАС) реагирует на стрессирование материнского организма, что приводит к синдрому пренатального стресса. У взрослых потомков стрессированных матерей он проявляется нарушениями стресс-реактивности ГГАС, репродуктивных функций, обмена веществ и поведения [10, 11].

В связи с вышеизложенным, для более глубокой оценки отдаленных последствий хронических и острых интоксикаций родительских особей экотоксикантами имеет смысл моделирование острого стрессорного воздействия у потомства. В качестве возможных моделей такого воздействия может выступать 24-часовая депривация сна по Журбе [12], гипо- или гипертермия. Критериями оценки выраженности стресса являются: массовые коэффициенты надпочечников, потребление пищи и воды, спонтанный диурез, способность гепатоцитов к метаболизму ксенобиотиков путем их конъюгации (тест на функциональную активность глюкуронидазной системы, приводящей к образованию глюкуронидов и, тем самым, к окончательной детоксикации ксенобиотиков).

Клиренс-тест на метаболизирующую способность гепатоцитов позволяет оценить конечные этапы биотрансформации ксенобиотиков (приложение В).

Биотрансформация лекарств в печени происходит обычно в несколько этапов. Прежде всего, вещество должно быть активно захвачено из крови клеткой печени. Извлеченные печенью вещества могут пройти последовательно два этапа химических превращений: метаболическую трансформацию и конъюгацию. Первый этап биотрансформации (метаболическая трансформация) — это превращение вещества за счет окисления, восстановления и гидролиза) происходит под влиянием ферментов монооксигеназной системы, главными из которых являются цитохром Р-450 и никотина адениндинуклеотид фосфорилированный и восстановленный (НАДФ. Н.). Второй этап биотрансформации (конъюгация — это биосинтетический процесс, сопровождающийся присоединением к веществу или его метаболитам ряда химических группировок или молекул биогенных соединений) заключается в образовании парных эфиров с гиалуроновой, серной, уксусной кислотами и конъюгатов с глутатионом, глицином и другими аминокислотами.

### 5.3 Оценка вегетативных и неврологических показателей половозрелого потомства

Для описания вегетативных показателей и неврологического статуса половозрелого потомства используют следующие тесты:

#### 5.3.1 Электрокардиограмма (ЭКГ)

Метод основан на регистрации биопотенциалов, возникающих при сердечной деятельности. Волны возбуждения, деполяризации и затем реполяризации создают разность электрических потенциалов между одной и другой частями сердца. Распространение возбуждения по сердечной мышце вызывает слабые электротоки, идущие по внеклеточной жидкости. Электрокардиография – процесс записи разницы потенциалов, возникающей в результате деполяризации и реполяризации сердечной мышцы. Устройство для записи ЭКГ-сигналов является гальванометром, записывающим изменения напряжения между его положительными и отрицательными отведениями (приложение А).

#### 5.3.2 Поведение животных

Комплексная оценка поведения животного при нахождении крысы в клетке и взятии на руки. Взятие на руки и помещение животного на поверхность клетки позволяет исключить состояние сна. Поведение животных: активная деятельность (груминг, принятие пищи и др.), сон, при взятии на руки активные целенаправленные реакции – 4 балла; лежит, при взятии на руки движения замедленные, но сохраняется их целенаправленность к избеганию, поворачивает голову – 3 балла; лежит на животе или в боковом положении, при взятии на руки движения нецеленаправленные – 2 балла; лежит на животе или боковом положении, при взятии на руки движения отсутствуют – 1 балл.

#### 5.3.3 Тонус мышц

Исследуется тонус мышц при взятии животного в руки. Тонус мышц: нормальный (упругий тонус брюшной стенки, тонус конечностей умеренный) – 3 балла; дистонус (снижен или повышен) – 2 балла; атония – 1 балл.

#### 5.3.4 Тест «открытое поле»

На 50-е сутки у животных однократно регистрируют двигательную и ориентировочно-исследовательскую активность в «открытом поле» в соответствии с утверждённой стандартной операционной процедурой. Данный тест позволяет эффективно оценить нейрофизиологическое состояние и поведенческие реакции лабораторных животных с акцентом на изучение спонтанной двигательной активности, исследовательской активности, уровней депрессивности и тревожности (приложение А).

#### 5.3.5 Тест «условная реакция пассивного избегания» (УРПИ)

На 60-е сутки у животных однократно регистрируют изменение состояния памяти по методике «УРПИ» в соответствии с утверждённой стандартной операционной процедурой.



Методика предназначена для изучения когнитивных функций грызунов в условиях острого стресса. Она позволяет оценить индивидуальные различия когнитивного стиля решения задачи (поиска пути избавления из острой стресс-ситуации), становление когнитивных функций в онтогенезе, влияние фармакологически-активных веществ на нарушение когнитивных функций (приложение А).

#### **5.4 Оценка генотоксического действия экотоксикантов на родительские особи**

Одной из наиболее важных и распространенных причин возникновения морфофункциональных нарушений является нерепарируемые повреждения структуры ДНК в гаплоидном кариотипе половых клеток и гибель клеток в эмбриональном периоде гестации.

Удобным объектом для исследования потенциального генотоксического действия токсикантов на репродуктивную функцию являются мужские половые клетки – сперматозоиды, которые можно получать в достаточном количестве у человека и животных. Оценка состояния ДНК сперматозоидов является важным прогностическим показателем рождения здорового потомства.

Сперматозоиды отличаются от соматических клеток высокой плотностью упаковки ядерного хроматина, связанного с заменой 85% гистонов на протамины, содержащих много аргинина и лизина, и образующих дисульфидные связи. Плотная упаковка хроматина уменьшает объём ядра и защищает ДНК от внешних воздействий [13].

При проведении исследований необходимо учитывать, что длительность сперматогенеза у человека, белых крыс и мышей составляет 72, 48 и 25 суток, соответственно. Это означает, что в исследованиях репродуктивной токсичности на сперматозоидах грызунов нужно подбирать сроки действия, которые определяют действие токсиканта на предшественников половых клеток на различных этапах сперматогенеза (приложение Б).

#### **5.5 Биохимические маркеры влияния экотоксикантов на родительские особи**

##### **5.5.1 Определение концентрации общего белка**

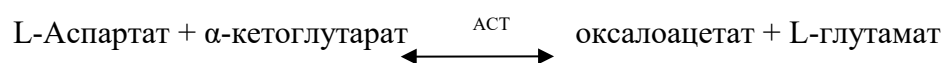
Принцип метода: белки реагируют в щелочной среде с серноокислой медью и образуют соединения, окрашенные в фиолетовый цвет. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации белка в биологической жидкости. Единицы измерения в г/л.

##### **5.5.2 Определение концентрации альбумина**

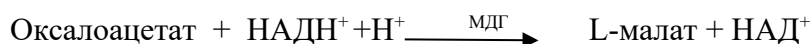
Принцип метода: альбумин в слабокислой среде реагирует с бромкрезоловым зеленым с образованием цветного комплекса синего цвета. Интенсивность окраски раствора прямо пропорциональна концентрации альбумина в биологической жидкости. Измерение проводят при длине волны 640 нм. Единицы измерения в г/л [14].

### 5.5.3 Определение активности аспаратаминотрансферазы (АСТ)

Принцип метода: аспаратаминотрансфераза (АСТ) катализирует перенос аминогруппы от аспартата на  $\alpha$ -кетоглутарат, образуя оксалоацетат и глутамат. Активность АСТ определяют по скорости уменьшения восстановленной формы никотинамидадениндинуклеотида ( $\text{НАДН}^+ + \text{H}^+$ ) и увеличения окисленной формы никотинамидадениндинуклеотида ( $\text{НАД}^+$ ), оптическая плотность которого измеряется при 340 нм (в реакции с участием малатдегидрогеназы – МДГ).



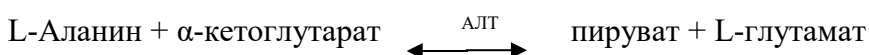
Индикаторная реакция:



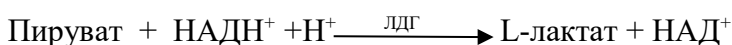
Равновесие реакции сдвинуто вправо. Скорость уменьшения  $\text{НАДН}^+$  прямо пропорциональна скорости образования оксалоацетата и, соответственно, активности АСТ. Единицы измерения в Ед/л.

### 5.5.4 Определение активности аланинаминотрансферазы (АЛТ)

Принцип метода: аланинаминотрансфераза (АЛТ) катализирует перенос аминогруппы от аланина на  $\alpha$ -кетоглутарат, образуя пируват и глутамат. Активность АЛТ определяют по скорости уменьшения  $\text{НАДН}^+ + \text{H}^+$ , оптическая плотность которого измеряется при 340 нм (в реакции с участием лактатдегидрогеназы – ЛДГ).



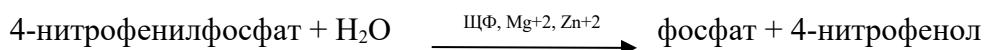
Индикаторная реакция:



Равновесие реакции сдвинуто вправо. Скорость уменьшения  $\text{НАДН}^+ + \text{H}^+$  прямо пропорциональна скорости образования пирувата и, соответственно, активности АЛТ. Единицы измерения в Ед/л [16].

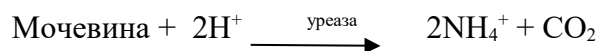
### 5.5.5 Определение активности щелочной фосфатазы (ЩФ)

Принцип метода: под действием ЩФ 4-нитрофенилфосфат натрия, используемый в качестве субстрата, в присутствии ионов магния и цинка гидролизуетсся с образованием п-нитрофенола, дающего в щелочной среде жёлтое окрашивание. Интенсивность окраски прямо пропорциональна активности ЩФ и измеряется фотометрически при 405 нм. Единицы измерения в Ед/л [17].

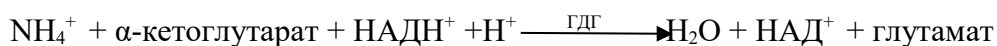


### 5.5.6 Определение концентрации мочевины

Принцип метода: мочевина в присутствии уреазы гидролизуеться с образованием аммиака и  $\text{CO}_2$ . Образовавшийся аммиак в присутствии глутаматдегидрогеназы (ГДГ) реагирует с  $\alpha$ -кетоглутаратом и  $\text{НАДН}^+ + \text{H}^+$  с образованием глутамата и  $\text{НАД}^+$ .



Индикаторная реакция:



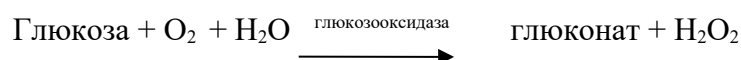
Снижение абсорбции вследствие снижения концентрации  $\text{НАДН}^+ + \text{H}^+$  в единицу времени пропорционально концентрации мочевины. Аммиак, который образуется в результате различных процессов распада, также определяется этим методом. Единицы измерения в ммоль/л [18].

### 5.5.7 Определение концентрации креатинина

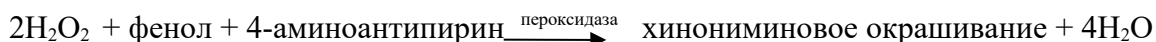
Принцип метода: в его основе лежит способность креатинина реагировать в щелочной среде с пикриновой кислотой с образованием окрашенного соединения. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации креатинина и измеряется фотометрически при  $\lambda = 500 \pm 20$  нм. Единицы измерения в мкмоль/л [19].

### 5.5.8 Определение концентрации глюкозы

Принцип метода: тест основан на сочетании реакции ферментативного окисления глюкозы глюкозооксидазой с получением перекиси водорода, которая затем под действием пероксидазы образует окрашенный продукт. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации глюкозы и измеряется фотометрически при  $\lambda = 500 \pm 20$  нм. Единицы измерения в ммоль/л [20].



Индикаторная реакция:

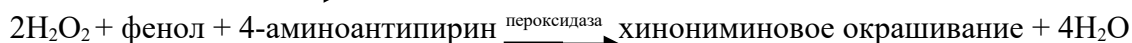
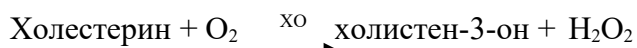


### 5.5.9 Определение концентрации холестерина

Принцип метода: холестерин определяется ферментативно с применением холестеринэстеразы (ХЭ) и холестериноксидазы (ХО)



Эфир холестерина расщепляется под влиянием холинэстеразы, образуя свободный холестерин и жирные кислоты



Холестерин превращается в  $\Delta^4$ -холестенон и перекись водорода под влиянием кислорода в присутствии холестериноксидазы.

Образовавшаяся перекись водорода дает красное окрашивание в реакции с 4-аминоантипирин и фенолом в результате каталитического действия пероксидазы. Интенсивность окрашивания прямо пропорциональна концентрации холестерина и измеряется фотометрически при  $\lambda = 500 \pm 20$  нм. Единицы измерения в ммоль/л [21].

#### 5.5.10 Определение общего билирубина

Принцип метода: азобилирубин – комплекс красного цвета, получаемый в реакции между билирубином и diaзониевой солью сульфаниловой кислоты, показывает максимум абсорбции при 555 нм в кислой среде. Интенсивность полученной окраски пропорциональна количеству билирубина, вступившего в реакцию. В присутствии ускорителя, диметилсульфоксида, в реакцию вступают непрямой и прямой билирубин, таким образом, определяется уровень общего билирубина. Единицы измерения в мкмоль/л [22].

#### 5.5.11 Определение ионов калия

Принцип метода: ионы калия в свободной от белка щелочной среде реагируют с тетрафенилборонатом натрия и формируют взвешенную суспензию тетрафенилбороната калия. Мутность смеси пропорциональна концентрации калия в пробе [23].

#### 5.5.12 Определение ионов натрия

Принцип метода: натрий осаждается магний-уранилацетатом; оставшиеся ионы уранила реагируют с тиогликолевой кислотой с образованием комплекса желто-коричневого цвета. Оптическая плотность реакционной смеси относительно холостой пробы по реагенту пропорциональна концентрации натрия [24].

#### 5.5.13 Определение хлорид-ионов

Принцип метода [24]: хлорид-ионы реагируют с комплексом ртути(II)-2,4,6-три-(2-пиридил)-s-триазином (ТПТЗ). В результате реакции формируется хлорид ртути. Освободившийся ТПТЗ реагирует с двухвалентным железом, формируя окрашенный в голубой цвет комплекс. Увеличение поглощения реакционной смеси при длине волны 590 нм пропорционально концентрации хлоридов в пробе (приложение В).

## 5.6 Иммунологические маркеры экотоксикантов

### 5.6.1 Реакция торможения миграции лейкоцитов *in vitro* (РТМЛ)

Реакция торможения миграции лейкоцитов позволяет оценить способность Т-лимфоцитов к выработке лимфокинов в ответ на антигенную стимуляцию. Этот тест оценки функциональной активности Т-лимфоцитов часто используется для диагностики

иммунологической недостаточности (реакция с митогенами), гиперчувствительности (аллергии) замедленного типа (реакция со специфическим антигеном или аллергеном и характеризует активность воспалительного процесса (приложение Г).

#### 5.6.2 Определение циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК)

ЦИК (циркулирующие иммунные комплексы) – комплексы, состоящие из антигена, антител и связанных с ними компонентов системы комплемента (С3, С4, С1q). В ответ на внедрение чужеродного антигена ЦИК синтезируются и циркулируют в кровеносном русле. Формирование ЦИК представляет собой физиологический механизм защиты организма, приводящий к быстрому удалению экзогенных и эндогенных антигенов (паразиты, бактерии, вирусы, микроорганизмы, пыльца, антигены растений, пищевые продукты) через ретикуло-эндотелиальную систему. В норме образующиеся иммунные комплексы впоследствии захватываются и разрушаются фагоцитами, метаболизируются в печени и удаляются из организма. Целый ряд ксенобиотиков (положительно заряженные антигены, гаптены) способен связываться с тканями, формировать ЦИК и накапливаться в различных органах и тканях, вызывать воспалительный процесс и повреждение биологических структур. Процесс усиливается при чрезмерном количестве антигена, избыточном формировании иммунных комплексов и их неэффективной элиминации. В результате может возникнуть болезнь иммунных комплексов – гиперчувствительность III типа (приложение Г).

### Библиография

1 Пылин И. Демография России: Демографическая ситуация за последние 20 лет в России // на сайте [http://www.syl.ru/article/200190/new\\_demografiya-rossii-demograficheskaya-situatsiya-za-poslednie-let-v-rossii](http://www.syl.ru/article/200190/new_demografiya-rossii-demograficheskaya-situatsiya-za-poslednie-let-v-rossii).

2 Общая токсикология / Под ред. Б. А. Курляндского, В. А. Филова. – М.: Медицина, 2002. – 608 с.

3 Ушкалова Е.А. Лекарственные средства и беременность // Фарматека. Нефрология, Урология, Гинекология. – 2005. – №10 (105). – С. 9–14.

4 Козлов В.А., Абрамова Г.Д. Фармакологический тератогенез // Здравоохранение Чувашии. – 2006. – № 1. – С. 68–80.

5 Albertini R. J., Anderson D., Douglas G. R., Hagmar L., Hemminki K., Merlo F., Natarajan A. T., Norppa H., Shuker D. E., Tice R., Waters M. D., Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. International Programme on Chemical Safety // Mutat. Res. – 2000. – Vol. 463. – P. 111–172.

6 Справочник «Вредные химические вещества в ракетно-космической отрасли» / Под ред. Котенко К. В., Кушневой В.С. – Москва, 2011. – 408 с.

7 Пособие по токсикологии, гигиене, химии, индикации, клинике, диагностике острых и хронических интоксикаций и профилактике профессиональных заболеваний при работе с несимметричным диметилгидразином // Под общей редакцией М. Ф. Киселева, В. Р. Рембовского, В. В. Романова. – СПб., 2009. – 249 с.

8 Носов А.В., Башарин В.А., Бонитенко Е.Ю., Белякова Н.А. Коррекция нарушений энергетического обмена при острых отравлениях депримирующими ядами // Биомедицинский журнал Medline.ru. – 2014. – Т. 15. – С. 195-208.

9 Селье Г. Стресс без дистресса: Пер. с англ. – М.: Прогресс, 1982. – 126 с.

10 Резников А.Г., Пишак В.П., Носенко Н.Д., Ткачук С.С., Мыслицкий В.Ф. Пренатальный стресс и нейроэндокринная патология. – Черновцы: Изд-во «Медакадемия», 2004. – 320 с.

11 Гаркави Л.Х., Квакина Е.Б., Уколова М.А. Адаптационные реакции и резистентность организма. – 3-е изд. – Ростов-на-Дону: Изд-во Ростовск. ун-та, 1990.

12 Миронов А.Н. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая / Под ред. А.Н. Миронова. – М.: Изд-во Гриф и К, 2012. – 944 с.

13 Baumgartner A., Cemeli E., Laubenthal J., Anderson D. The Comet Assay in Sperm – Assessing genotoxins in male germ cells // Issues in Toxicology. – 2009. – № 5. – P. 331–372.

14 Gornall A.G., Bardawill C.S., David M.M. Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction // J. Biol. Chem. – 1949. – Vol. 235. – P.751–766.

15 Bergmeyer H.U., [Horder M.](#), Rej R. Approved recommendations (1985) on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 2: IFCC Method for

Aspartate Aminotransferase (EC 2.6.1.1) // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1986. – Vol. 24. – P. 497–510.

16 Bergmeyer H.U., [Horder M.](#), Rej R. Approved Recommendation (1985) on IFCC Methods for the Measurement of Catalytic Concentration of Enzymes. Part 3: IFCC Method for Alanine Aminotransferase (EC 2.6.1.2) // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1986. – Vol. 24. – P. 481–495.

17 Tietz N.W., Rinker A.D., Shaw L.M. IFCC methods for the measurement of catalytic concentration of enzymes. Part 5: IFCC methods for alkaline phosphatase // J. Clin. Chem. Clin. Biochem. – 1983. – Vol. 21. – P. 731–748.

18 Gutmann I., Bergmeyer H.U. Methods of enzymatic Analysis. – NY.: Academic Press, 1974. – P. 1794–1798.

19 Fabiny D.L., Ertingshausen G. Automated reaction-rate method for determination of serum creatinine with Centrifuge // Chem. Clin. Chem. – 1971. – Vol. 17. – P. 696-700.

20 Trinder P. Determination of glucose in blood using glucose oxidase with an alternative oxygen acceptor // Ann. Clin. Biochem. – 1969. – Vol. 6. – P. 24–27.

21 Pearlman F.C., Lee R.T.Y. Detection and measurement of total bilirubin in serum, with use of surfactants as solubilizing agents // Clin. Chem. – 1974. – Vol. 20. – P. 447–453.

22 Allain C.C., Poon L.S., Chan C.S.G., Richmond W. and Fu PC. Enzymatic determination of total serum cholesterol // Clin. Chem. – 1974. – Vol. 20. – P. 470–475.

23 Макаров В.Г., Макарова М.Н. Справочник. Физиологические, биохимические и биометрические показатели нормы. – СПб.: Изд. «ЛЕМА», 2013. – 116 с.

24 Hillmann G. et al. Fortlaufende photometrische Messung der sauren Prostataphosphatase-Aktivitat // Chem. U. Klin. Biochem. – 1967. – Vol.5. – P. 93.

25 Tietz N. W. Fundamentals of Clinical Chemistry Saunders. – USA.: Philadelphia, 2006. – 4 Edit. – 984 p.

## ПРИЛОЖЕНИЕ А

(обязательное)

Основные методы оценки вегетативных и нейрофизиологических функций лабораторных животных

## **А.1 Электрокардиограмма**

Методика предназначена для регистрации электрокардиограммы (ЭКГ) у лабораторных животных, после воздействия острой и хронической интоксикации экотоксикантов на родительские особи.

### **А.1.1 Объект испытаний**

Объектом испытаний являются экотоксические агенты.

### **А.1.2 Цель испытаний**

Оценить отдалённые последствия острых и хронических интоксикаций экотоксикантами родительских особей на нейрофизиологическое состояние и поведенческие реакции половозрелого потомства с акцентом на оценку реакции на внешние раздражители, спонтанную двигательную активность и поведенческие реакции, отражающие развитие тревожно-фобического состояния животных в незнакомой обстановке.

### **А.1.3 Группы животных**

Опыт 1 (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, подвергшихся острой или хронической интоксикации экотоксикантом). Контроль (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, получавших однократно или многократно физиологический раствор).

### **А.1.4 Требования к параметрам окружающей среды**

Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°C до плюс 24°C, при относительной влажности воздуха до 40-60 %, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0...1,5 м/с.

### **А.1.5 Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний**

Перечень рекомендуемого оборудования:

- Специализированный электрокардиограф для ветеринарии «Полиспектр 8/В», ООО «Нейрософт», Россия или аналогичный.
- Ноутбук, программное обеспечение (прилагается к прибору).
- Набор электродов, зажимы типа «крокодил», иглы атравматические.
- Рестрейнеры (пластиковые контейнеры) для крыс подходящего размера.
- Раствор антисептика.
- Пинцет.
- Токопроводящий гель/паста.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

### **А.1.6 Описание метода**



Животное фиксируют в рестрейнер соответствующего размера, подкожно в районе передних и задних лап вводят тонкие атравматические стерильные иглы – электроды из нержавеющей стали или зажимы типа «крокодил», предварительно место прикрепления зажима смазывается токопроводящим гелем. Электроды подсоединяют в соответствии с правилом (на животное смотрят со спины): правая передняя лапа – Красный электрод, левая передняя лапа – Жёлтый электрод, задняя левая лапа – Зелёный электрод, задняя правая лапа – Чёрный электрод.

Регистрацию и оценку ЭКГ проводят по II стандартному отведению с помощью прилагаемого программного обеспечения к оборудованию.

#### **А.1.7 Регистрируемые показатели и расчетные соотношения**

Оценивают следующие параметры: зубец P, мВ (отображает процесс охвата возбуждением миокарда предсердий), зубец R, мВ (отображает силу сокращения желудочков), сегмент PQ, мс (показатель предсердно-желудочковой проводимости), сегмент QT, мс (продолжительность электрической систолы). Значение зубцов P и R во втором отведении положительное. Первая часть зубца P характеризует правое предсердие, вторая часть – левое.

#### **А.1.8 Оценка результатов**

Критерием нарушения регистрируемых параметров на ЭКГ является отклонение от представленных норм по сравнению с контрольной группой животных или с «фоновыми» данными одной и той же группы животных (показания при этом должны быть сняты за несколько дней до введения исследуемых препаратов).

Расчёт средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

#### **А.1.9 Отчётность**

Отчётным документом является протокол испытаний.

### **А.2 Тест «Открытое поле»**

Методика предназначена для оценки влияния острой и хронической интоксикации экотоксикантов на родительские особи на нейрофизиологический статус и поведенческие реакции потомства в тесте «открытое поле».

#### **А.2.1 Объект испытаний**

Объектом испытаний являются экотоксические агенты.

#### **А.2.2 Цель испытаний**

Оценить отдалённые последствия острых и хронических интоксикаций экотоксикантами родительских особей на нейрофизиологическое состояние и поведенческие реакции половозрелого потомства с акцентом на оценку реакции на внешние раздражители, спонтанную двигательную активность и поведенческие реакции, отражающие развитие тревожно-фоби-

ческого состояния животных в незнакомой обстановке.

### **А.2.3 Группы животных**

Опыт 1 (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, подвергшихся острой или хронической интоксикации экотоксикантом). Контроль (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, получавших однократно или многократно физиологический раствор).

### **А.2.4 Требования к параметрам окружающей среды**

Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°C до плюс 24°C, при относительной влажности воздуха до 40-60 %, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0...1,5 м/с.

### **А.2.5 Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний**

Перечень рекомендуемого оборудования:

- Прибор «Open Field/Phenomaster/Activity», TSE, Германия (включает в себя 4 камеры с 2-мя рамками ИК-лучей каждая, 4 вставных пола-подставки) или аналогичный.
- Компьютер персональный и программное обеспечение (прилагается к установке).
- Набор клеток (или вёдер) для раздельного содержания животных перед экспериментом.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

### **А.2.6 Описание метода**

Крысу помещают в одно и то же место камеры и проводят наблюдения в течение 2 минуты с регистрацией параметров поведения. Тестирование проводят в установленный период времени. Общая продолжительность одного тестирования – 2 минуты.

Под продолжительностью тестирования понимается время, складывающееся из 1 минуты экспозиции животного в темной картонной коробке и 3 минут собственно тестирования животного в «открытом поле».

В момент проведения испытаний нельзя шуметь, разговаривать, включать и выключать свет, совершать какие-либо движения, которые могут привлечь внимание животного и, в итоге, повлиять на результаты эксперимента. Недопустимо пребывание в момент тестирования в комнате иных животных, кроме исследуемого в «открытом поле».

### **А.2.7 Регистрируемые показатели и расчетные соотношения**

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

- горизонтальная активность (количество актов);
- вертикальная (стойки) активность (количество актов);

- заглядывания (количество актов);
- груминг (количество актов);
- средняя скорость, развиваемая животным (см/с);
- среднее расстояние, пройденное животным в течение эксперимента (м);
- общая двигательная активность (количество актов);
- количество движений в центре площадки (количество актов);
- количество движений на периферии площадки (количество актов).

#### **А.2.8 Оценка результатов**

Оценивают изменение двигательной активности животных по показателям: горизонтальная активность; груминг; средняя скорость, развиваемая животным; среднее расстояние, пройденное животным в течение эксперимента; общая двигательная активность. Оценивают изменение ориентировочно-двигательной активности по показателям: стойки, заглядывания. Оценивают эмоциональную лабильность животных по показателям: количество актов дефекации и уринации. Оценивают тревожную составляющую по изменению соотношения показателей: количество движений в центре площадки и количество движений на периферии площадки. Увеличение данных показателей может интерпретироваться как возбуждающее действие на поведение животных и центральную нервную систему. Снижение данных показателей как угнетающее действие.

Критерием действия препарата на нейрофизиологический статус животного является отклонение определяемых показателей от значений в контроле. При этом снижение горизонтальной и вертикальной двигательной активности, времени выхода из центральных квадратов, увеличение времени замирания свидетельствует об угнетении нервной системы животных. Увеличение числа дефекаций и уринаций, груминговых реакций, возрастание длительности груминга указывает на анксиогенный эффект.

Расчёт средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

#### **А.2.9 Отчётность**

Отчётным документом является протокол испытаний.

### **А.3 Тест «Экстраполяционное избавление»**

Методика предназначена для изучения когнитивных функций грызунов в условиях острого стресса.

#### **А.3.1 Объект испытаний**

Объектом испытаний являются экотоксиканты.

#### **А.3.2 Цель испытаний**

Оценить последствия острых и хронических интоксикаций родительских особей на когнитивные функции половозрелого потомства.

### **А.3.3 Группы животных**

Опыт 1 (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, подвергшихся острой или хронической интоксикации экотоксикантом). Контроль (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, получавших однократно или многократно физиологический раствор).

### **А.3.4 Требования к параметрам окружающей среды**

Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°C до плюс 24°C, при относительной влажности воздуха до 40-60 %, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0...1,5 м/с.

### **А.3.5 Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний**

Перечень рекомендуемого оборудования:

– Установка «Экстраполяционное избавление» («Открытая наука», Россия) или аналогичная.

– Источник света, мощностью 100 Вт.

– Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-26-г-010», ГОСТ 3309-84.

– Набор корнцангов хирургических (2 прямых, 2 изогнутых), ГОСТ 19126-79.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

### **А.3.6 Описание метода**

Крысу необходимо аккуратно поместить в воду, опустив её внутрь прозрачного цилиндра хвостом вниз. Для этого спокойно возьмите животное правой рукой полным хватом за плечевой пояс и шею. Второй рукой можно взять хвост и направить его внутрь цилиндра (или вложить в правую руку и прижать мизинцем – тогда задние лапки немного поднимутся вверх и животное будет посажено в цилиндр чуть спиной, не цепляясь задними лапами за край цилиндра). Вынимать животное из воды (внешней ёмкости) следует сразу после подныривания

### **А.3.7 Регистрируемые показатели и расчетные соотношения**

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

– латентный период начала аверсивных реакций после посадки в установку (секунды);

– число прыжков за тестовый период (количество актов);

– латентный период подныривания (секунды).

Время тестирования: вплоть до подныривания (но не более 2-х минут).

### **А.3.8 Оценка результатов**

Проводится оценка изменения количества прыжков за время наблюдения и латентного периода подныривания в опытных группах животных по сравнению с контрольной (интактной). Снижение латентного периода подныривания в последующие дни после отработки навыка говорит о наличии когнитивных нарушений у животных.

Расчет средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

### **А.3.9 Отчётность**

Отчетным документом является протокол испытаний.

## **А.4 Тест «условная реакция пассивного избегания» (УРПИ) (реакция перехода)**

Метод позволяет оценить состояние процессов обучения и памяти.

### **А.4.3.1 Объект испытаний**

Объектом испытаний являются экотоксические агенты.

### **А.4.2 Цель испытаний**

Оценить нарушение кратковременной и долговременной памяти у половозрелого потомства родительских особей, подвергшихся острой или хронической интоксикации экотоксичными агентами.

### **А.4.3 Группы животных**

Опыт 1 (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, подвергшихся острой или хронической интоксикации экотоксикантом). Контроль (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, получавших однократно или многократно физиологический раствор).

### **А.4.4 Требования к параметрам окружающей среды**

Испытания проводят в реальных климатических условиях, в диапазоне температур окружающей среды от плюс 18°C до плюс 24°C, при относительной влажности воздуха до 40-60 %, при атмосферном давлении в диапазоне от 84,0 до 106,7 кПа (от 630 до 800 мм рт.ст.), скорости воздушного потока в вытяжной системе вентиляции 1,0...1,5 м/с.

### **А.4.5 Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний**

Перечень рекомендуемого оборудования:

– Вытянутая пластмассовая камера PACS-30 (Columbus Instruments, США) длиной 50 см, шириной 10 см и высотой 10 см с электрифицированным решетчатым полом (сила тока силой 1 мА) или аналогичный. Стены и потолок одной половины камеры выкрашены в черный цвет, а в другой половине они прозрачны.

– Секундомеры лабораторные типа «СОС ПР-26-г-010», ГОСТ 3309-84 или аналогичные.

– Часы процедурные, ГОСТ 3309-84.

– Одноразовые шприцы.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

#### **А.4.6 Описание метода**

1) Исследование норок («норковый рефлекс») – крысу помещают в светлый отсек (хвостом к дверце). Отмечают время пребывания в светлой камере – латентный период первого захода (ЛП<sub>0</sub>);

2) Обучение – при переходе в тёмный отсек животное там получает болевое электрокожное раздражение через электродный пол.

3) Воспроизведение – через 12 часов и 24 часа после обучения (допускается также наблюдение через 36, 48 и 72 часа) отмечают время пребывания животных в отсеках установки.

#### **А.4.7 Регистрируемые показатели**

Показатели, количественно выражающие оцениваемые характеристики и подлежащие определению в испытаниях:

– количество обученных крыс (не зашедших в тёмную камеру) в процентах от общего количества животных;

– латентный период первого захода через 12 и 24 часа после обучения (ЛП<sub>12</sub> и ЛП<sub>24</sub>);

– при дальнейших расчётах можно использовать разницу между латентными периодами ЛП<sub>12</sub> – ЛП<sub>0</sub> и ЛП<sub>24</sub> – ЛП<sub>0</sub>.

#### **А.4.8 Оценка результатов**

Проводится оценка изменения количества обученных животных (%), средней продолжительности латентного периода пассивного избегания перехода в опытных группах животных по сравнению с контрольной (интактной). Снижение количества обученных животных и/или латентного периода первого захода говорит о наличии когнитивных нарушений у животных.

Расчет средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами.

#### **А.4.9 Отчётность**

Отчётным документом является протокол испытаний

## ПРИЛОЖЕНИЕ Б

(обязательное)

Исследование генотоксичности экотоксикантов (спиртов, бериллия сульфата, НДМГ) методом щелочного гель-электрофореза

Степень повреждения ДНК определяют с помощью метода щелочного гель-электрофореза единичных клеток (Comet assay). Кровь забирали из хвостовой вены в специальные микропробирки с ЭДТА. 10 мкл крови из каждой пробирки смешивали со 150 мкл расплавленной агарозы ( $t = +40^{\circ} \text{C}$ ), 30 мкл суспензии помещали на предварительно покрытые агарозой предметные стекла, немедленно накрывали покровным стеклом и помещали в холодильник для затвердевания агарозы. Через 15 мин покровные стекла удаляли и помещали препараты в лизирующий раствор с высокой концентрацией соли: 2,5 моль/л NaCl, 1%-ным тритоном X-100 и 10%-ным ДМСО, 10 ммоль/л триса (pH 10-10,5) для лизиса содержимого клеток и освобождения ДНК. После 2 ч лизиса при  $t = +4^{\circ} \text{C}$  препараты укладывали в горизонтальную камеру для электрофореза, заполненную щелочным раствором: 300 ммоль/л NaOH, 10 ммоль/л  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , (pH > 13). На этом этапе двуспиральные молекулы ДНК денатурировали в течение 30 мин, превращаясь в односпиральные, что высвобождало ранее фрагментированные участки. Одновременно AP-сайты трансформировались в одиночные разрывы. В ходе последующего электрофореза (1 В/см, 300 мА, в течение 30 мин) фрагменты ДНК мигрировали к аноду с разной скоростью, зависящей от величины фрагмента, образовывалась структура, напоминающая хвост кометы, что регистрировали после окраски ДНК бромистым этидием с помощью флуоресцентной микроскопии.

Нуклеоид представляет собой ярко светящееся округлое образование, от которого в сторону анода вытягивается хвост, состоящий из фрагментированной ДНК. Относительную интенсивность свечения хвоста по отношению к суммарной интенсивности свечения нуклеоида и хвоста использовали в качестве индекса степени повреждения ДНК клетки (% ДНК в хвосте). Значения данного параметра определяют прямо на экране монитора с помощью компьютерной программы Comet IV. Для каждого животного изготавливают два препарата, на которых оценивают относительное содержание ДНК в хвосте не менее чем в 50 нуклеоидах. Для каждого препарата рассчитывают среднюю величину, затем получали среднюю степень повреждения ДНК для животного из двух параллельных препаратов. Сравнение рядов данных между группами животных осуществляют с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни (Mann-Whitney, U-test). Различия считают достоверными, если полученный уровень значимости меньше 0,05.

Животных подвергают цервикальной эвтаназии через 24 ч после последнего введения. Каждая группа должна содержать не менее 5 животных.

Для получения сперматозоидов из каждого животного выделяли эпидидимис, который при комнатной температуре измельчали на мелкие кусочки в 2 мл раствора Хенкса. После небольшого ожидания сперматозоиды выплывают в раствор, который при этом становился молочного цвета. Аккуратно забирают 1 мл суспензии сперматозоидов и центрифугировали при 1000 об/мин в течение 3 мин. 500 мкл супернатанта переносят в 2 мл пробирку Эппендорфа.

Аликвоту объемом 5 мкл смешивали с 95 мкл раствора агарозы с низкой точкой гелеобразования < 30°C (A4018, Sigma), предварительно растворенной на водяной бане при 100°C в фосфатном солевом растворе pH 7,5 и охлажденном до 37°C. 80 мкл суспензии помещают на стекла, предварительно покрытые с одного конца 0,75 %-ным водным раствором агарозы с нормальной точкой гелеобразования – 37°C, и накрывали покровным стеклом. После образования геля стекло удаляют и сверху наносят дополнительный слой 0,5% агарозы. Для каждого животного изготавливают не менее двух препаратов.

Затем препараты лизировались сначала в течение 1 ч при + 4° С в растворе следующего состава: 2,5 моль/л NaCl, 100 ммоль/л Na<sub>2</sub>-EDTA, 1%-ный тритон X-100, 10 ммоль/л триса, 10 mM дитиотреитола, pH 10-10,5, а затем еще 1 ч в растворе такого же состава, в который вместо дитиотреитола добавляют 0,05 мг/мл протеиназы К.

Затем препараты трижды промывали в холодной дистиллированной воде и помещают в камеру, заполненную раствором для электрофореза (300 ммоль/л натрия гидроксида; 1 ммоль/л двунатриевой соли ЭДТА) на 20 минут для денатурации ДНК. Электрофорез проводят при напряженности поля 0,99 В/см и силе тока 300 мА в течение 20 мин. После окончания электрофореза предметные стекла промывают нейтрализующим раствором и затем фиксируют в 70%-ном и 96%-ном спирте. После подсушивания препараты окрашивают водным раствором бромистого этидия.

Степень повреждения (%ДНК в хвосте комет) определяют с помощью компьютерной программы Comet assay IV (Англия).

Для всех групп рассчитывают среднее значение величины повреждения ядерной ДНК и стандартную ошибку. Сравнение полученных данных контрольной и экспериментальных групп выполняют с помощью непараметрического метода U-критерия Манна-Уитни.



## ПРИЛОЖЕНИЕ В

(обязательное)

### Метод определения функционального состояния печени с помощью бромсульфалеиновой пробы

Метод предназначен для оценки глюкуронилтрансферазной активности печени по скорости ретенции красителя бромсульфалеина (БСФ) из кровотока. Экскреторная функция печени оценивается по выведению красителя бромсульфалеина из кровотока за счет конъюгации с глюкуроновой кислотой. В норме уровень БСФ в крови экспоненциально снижается. Патология печени вызывает задержку выведения красителя из кровотока, что измеряется по уровню БСФ через 15 минут после введения. Вычисляется скорость снижения концентрации БСФ в единицу времени.

#### **В.1 Объект испытаний**

Объектом испытаний выступают экотоксиканты.

#### **В.2 Цель испытаний**

Оценить влияние острой и хронической интоксикации экотоксикантами родительских особей на функциональную активность глюкуронилтрансферазной системы гепатоцитов половозрелого потомства.

#### **В.3 Группы животных**

Опыт 1 (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, подвергшихся острой или хронической интоксикации экотоксикантом). Контроль (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, получавших однократно или многократно физиологический раствор).

#### **В.4 Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний**

Перечень рекомендуемого оборудования:

- Набор медицинских инструментов для эвтаназии лабораторных животных.
- Вакуумные пробирки для сбора крови.
- Центрифуга Hermle 350 или аналогичная.
- Набор полуавтоматических пипеток переменного объёма.
- 0,75% раствор бромсульфалеина (БСФ) на изотоническом 0,9% растворе натрия хлорида, прогретый до 38°C.
- Монореагент (КБК с олеинатом натрия, pH 9,0).
- Мультифункциональный ридер микропланшет «Synergy-2» фирмы «BioTek Instruments, Inc.» (США) или аналогичный.
- Лабораторная посуда.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

### **В.5 Описание метода**

Животным (крысы) после 24-часового голодания вводят внутривенно раствор БСФ из расчета 0,2 мл на 100 г массы тела (15 мг/кг). Точно через 15 минут после введения раствора БСФ забирают образцы крови в объеме 1,5-2,0 мл в микропробирки Эппендорфа с 1 каплей раствора гепарина (5000 Ед/мл) и перемешивают не менее 5 раз. Кровь центрифугируют при 3000 об/мин в течение 5 минут и отбирают плазму в чистые пробирки Эппендорфа. Для анализа берут 50 мкл плазмы и 400 мкл монореагента и измеряют абсорбцию при 570 нм.

### **В.6 Регистрируемые показатели**

Регистрируют оптическую плотность проб контрольной и опытной групп, а также стандартных проб для построения калибровочной кривой. По калибровочной кривой рассчитывают результаты.

### **В.7 Оценка результатов**

Вычисляют коэффициент ретенции БСФ согласно по следующей формуле (В.1):

$$K_{\text{рБСФ}} + C^{15} \times 1,75, \quad (\text{В.1})$$

где  $C^{15}$  – концентрация БСФ на 15 минуте после введения препарата в мг%;

1,75 – концентрация БСФ на 1 минуте (согласно данным относительно объема циркулирующей крови крысы (ОЦК) от 40 до 65 мг%).

Расчёт средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с контролем проводят статистическую обработку по параметрическим тестам (t-критерию Стьюдента), при несоответствии выборки параметрам нормальности по критерию Шапиро-Уилка – по непараметрическим тестам (Вилкоксона-Манна-Уитни, Шеллинга – Войфейля, углового преобразования Фишера, X-критерия Ван-дер-Вардена и др).

### **В.8 Отчётность**

Отчётным документом является протокол испытаний.

## ПРИЛОЖЕНИЕ Г

(обязательное)

Иммунологический метод исследования реакции торможения миграции лимфоцитов

Реакция торможения миграции лимфоцитов (РТМЛ) основана на способности сенсibilизированных Т-лейкоцитов в специфических реакциях с антигеном *in vitro* выделять биологически активные субстанции (лимфокины), в том числе факторы, тормозящие миграцию лейкоцитов.

**Г.1 Объект испытаний**

Объектом испытаний выступают экотоксиканты.

**Г.2 Цель испытаний**

Оценить влияние острой и хронической интоксикации экотоксикантами родительских особей на функциональную активность Т-лимфоцитов и клеточноопосредованного иммунного ответа половозрелого потомства.

**Г.3 Группы животных**

Опыт 1 (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, подвергшихся острой или хронической интоксикации экотоксикантом). Контроль (половозрелое потомство (самцы и самки) самок крыс, получавших однократно или многократно физиологический раствор).

**Г.4 Материально-техническое и метрологическое обеспечение испытаний**

Перечень рекомендуемого оборудования:

- Набор медицинских инструментов для эвтаназии лабораторных животных.
- Вакуумные пробирки для сбора крови.
- Центрифуга Hermle 350 или аналогичная.
- Набор полуавтоматических пипеток переменного объёма.
- 96-луночные планшеты для иммунологических исследований.
- 5-ти канальные капилляры для РТМЛ.
- Раствор гепарина (5000 Ед/мл).
- 0,9% изотонический раствор хлорида натрия.
- Раствор конканвалина А (50 мкг/мл) на 0,9% изотоническом растворе натрия хлорида.
- Пластилин.
- Термостат на 37°C Shellab, модель GI2-2 или аналогичный.
- Электронный микроскоп Nikon Eclipse E200 и окулярный микрометр с линейкой 10 мм на 100 делений или аналогичный.
- Лабораторная посуда.

– Центрифуга Hermle 350.

При проведении испытаний должны применяться поверенные средства измерений и аттестованные методики выполнения измерений.

### Г.5 Описание метода

У животных забирают кровь после 24 часового голодания после эвтаназии в пробирки, содержащие натрий-гепарин в качестве антикоагулянта. После забора крови пробирки несколько раз перемешивают. В первую лунку 96-луночного планшета вносят по 0,1 мл гепарина (25 Е/мл), физиологического раствора и 0,3 мл исследуемой крови крыс. Во вторую лунку – по 0,1 мл гепарина (25 Е/мл), конканавалина А (50 мкг/мл) и 0,3 мл исследуемой крови животного. После перемешивания всех реагентов в каждой лунке капилляры заполняют смесью (на каждую лунку минимум 3 капилляра), затыкают со стороны крови пластилином, придерживая другое отверстие пальцем во избежание вытекания пробы. Капилляры помещают в центрифужные пробирки, на дно которых кладут кусочек ватки и центрифугируют при 1000 об/мин в течение 15 минут. Затем их помещают в термостат при 37°C на 24 часа.

### Г.6 Регистрируемые показатели

Учёт проводят под микроскопом. Регистрируют расстояние, на которое мигрируют лейкоциты за 1 сутки в миллиметрах (рисунок Г.1).

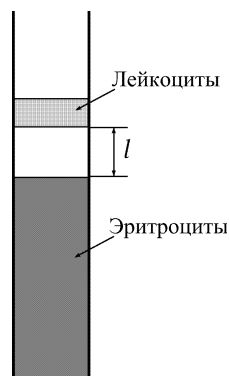


Рисунок Г.1 – Расстояние ( $l$ ), на которое мигрируют лейкоциты за 1 сутки в миллиметрах

### Г.7 Оценка результатов

Учёт результатов проводят по формулам Г.1 и Г.2:

$$Им = L_m : L_k, \quad (Г.1)$$

где Им – индекс миграции,  $L_m$  – длина миграции лейкоцитов с митогеном;

$L_k$  – длина миграции в контроле (без митогена).

$$M\% = Им \times 100\%, \quad (Г.2)$$

где  $M\%$  – процент миграции.

Расчёт средних величин регистрируемых показателей проводят общепринятыми статистическими методами. Для сравнения средних величин и установления достоверности различий с контролем проводят статистическую обработку по параметрическим тестам

(t-критерию Стьюдента), при несоответствии выборки параметрам нормальности по критерию Шапиро-Уилка – по непараметрическим тестам (Вилкоксона-Манна-Уитни, Шеллинга – Войфейля, углового преобразования Фишера, X-критерия Ван-дер-Вардена и др).

**Г.8 Отчётность.** Отчетным документом является протокол испытаний

Министерство здравоохранения Российской Федерации

Федеральное медико-биологическое агентство  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
«Институт токсикологии Федерального медико-биологического агентства»

Система стандартизации в здравоохранении Российской Федерации

Группа 21. Нормы и правила научных исследований в здравоохранении

**Оценка морфофункциональных нарушений у потомства как результата  
воздействия экотоксикантов на организмы родительских особей**

Методические рекомендации

МР ФМБА России 21.45-17

Директор Института, д.м.н.



М.Б. Иванов

Учёный секретарь, к.б.н.

Главный метролог

И.А. Шабунова

И.В. Александрова

Исполнители:

Научный руководитель,  
заведующий лабораторией, д.м.н.

Ответственный исполнитель,  
старший научный сотрудник, к.б.н.

А.В. Носов

Д.С. Лисицкий