

Министерство образования и науки Российской Федерации
Ярославский государственный университет им. П.Г. Демидова
Кафедра физиологии человека и животных

ЭКОЛОГИЧЕСКАЯ ТОКСИКОЛОГИЯ

Методические указания

Ярославль 2004

ББК Е 081я73
Э 40
УДК 574+615.9

Составитель **Е.В. Рябухина**

Экологическая токсикология: Метод. указания / Сост. Е.В. Рябухина; Яросл. гос. ун-т. Ярославль, 2004. 47 с.

Предназначено для студентов факультета биологии и экологии, обучающихся по специальности 013100 Экология (дисциплина "Экологическая токсикология", блок ОПД), очной формы обучения.

Табл. 3.

Рецензент: кафедра физиологии человека и животных Ярославского государственного университета им. П.Г. Демидова

© Ярославский государственный университет, 2004

© Е.В. Рябухина, 2004

Растворы, необходимые для поддержания жизнедеятельности препарата

Для сохранения жизнедеятельности препарата применяют изотонический раствор хлорида натрия (0,65 %-ный раствор для холоднокровных; 0,9 %-ный раствор для теплокровных). Такие растворы называются физиологическими. Для длительного поддержания жизнедеятельности препарата раствор должен содержать кроме хлорида натрия и другие вещества (табл. 1).

Таблица 1

Растворы, необходимые для поддержания жизнедеятельности препарата

Наименование вещества	Физиологический раствор		Раствор Рингера для холоднокровных	Раствор Рингера - Локка для теплокровных
	для холоднокровных	для теплокровных		
Дистиллированная вода	100 мл	100 мл	100 мл	100 мл
Хлорид натрия	0,65 г	0,9 г	0,65 г	0,9 г
Хлорид калия			0,014 г	0,042 г
Хлорид кальция			0,012 г	0,024 г
Гидрокарбонат натрия	-	-	0,01 г	0,02 г
Глюкоза				0,1 г

Способы обездвиживания животных

Чтобы произвести на лягушке острый опыт, ее необходимо прежде всего обездвижить. Обездвиживание достигается применением наркотических веществ, миорелаксантов, или разрушением центральной нервной системы.

1. Применение наркоза

В качестве наркотических средств используют эфир или алкоголь. Наркотизацию проводят в небольшом эксикаторе, куда помещают лягушку и ватку, смоченную эфиром, либо наливают на дно эксикатора 2%-ный раствор эфира. В случае применения алкоголя 250 - 300 мл 10%-ного раствора спирта наливают непосредственно на дно

эксикатора и опускают животное в раствор на 10 - 15 минут. Миорелаксант (вещество, нарушающее передачу нервных импульсов с нерва на мышцу) в соответствующей дозе, зависящей от свойств выбранного обездвиживающего препарата, вводят в подкожный лимфатический мешок. Расслабление мускулатуры и отсутствие двигательной активности являются показателями действия наркоза.

2. Разрушение головного и спинного мозга

Для выполнения работ по нервно-мышечной физиологии и при изучении деятельности сердечно-сосудистой системы целесообразно обездвиживать лягушку разрушением ЦНС с помощью зонда. Это делают следующим образом. Лягушку берут за спинку большим и указательным пальцами правой руки. Завертывают ее в салфетку, оставляя открытой лишь голову. При этом передние лапки нужно плотно прибинтовать к туловищу, а задние туго спеленать в вытянутом состоянии. Лягушку берут в левую руку спинкой вверх и указательным пальцем нагибают ей голову. Концом препаровальной иглы (зонд) проводят по средней линии головы сверху вниз. Проходя по затылочной кости, зонд соскальзывает в ямку. В этом месте под кожей расположена атлантоокципитальная мембрана. Прокалывают кожу и мембрану и, повернув конец иглы кверху, вводят ее (без усилия) через затылочное отверстие в полость черепа, маятникообразными движениями разрушают головной мозг, сначала одно полушарие, затем другое. После этого слегка извлекают зонд, и, развернув его конец в противоположном направлении, вводят в спинно-мозговой канал. Признаком того, что конец зонда попал в мозг, является общее вздрагивание лягушки. Тщательно разрушают спинной мозг, вращая зонд, несколько извлекая его из канала и снова погружая в него. Общее расслабление мышц лягушки и отсутствие у нее рефлексорных реакций свидетельствует о полном разрушении головного и спинного мозга. Спинной мозг должен быть разрушен особенно тщательно - иначе нервно-мышечный препарат быстро перестанет реагировать на раздражение нерва.

3. Декапитация с последующим разрушением спинного мозга

Можно разрушить ЦНС и другим способом. Для этого завернутую в салфетку лягушку держат в левой руке, вводят ей в рот тупую браншу ножниц и отсекают верхнюю челюсть с черепной коробкой. В открытый спинно-мозговой канал вводят зонд и вращательными движениями разрушают мозг. При таком способе обездвиживания

нервно-мышечный препарат сохраняет возбудимость более длительное время. Однако данный способ более травматичен, так как вызывает значительные потери крови, в связи с чем при работе с сердечно-сосудистой системой метод с декапитацией применяется редко.

Приготовление физиологических препаратов

1. Приготовление препарата задних лапок лягушки

Обездвиженную лягушку держат за задние конечности и перерезают позвоночник на 1 см выше сочленения тазовых костей, отделяют всю свисающую часть туловища и большую часть внутренностей. Захватив большим пинцетом остаток позвоночника, а свободной рукой - край кожи со спины, быстрым движением снимают кожу с обеих лапок, так чтобы она вывернулась наизнанку, подобно чулку. При снятии кожи надо постараться не разорвать ее. Препарат укладывается на чистую сторону препаровальной доски. После этого необходимо тщательно вымыть руки и инструменты. Кожные железы лягушки секретируют слизь, обладающую ядовитым действием на возбудимые структуры. Попадая на мышцы и нервы, она способствует быстрой потере их возбудимости. Поэтому нельзя допускать контакта обнаженных мышц и нервов с кожей и слизью.

После удаления внутренностей с обеих сторон от позвоночника видны седалищные нервные сплетения, выходящие из позвоночника тремя корешками каждый. *Таким образом получают препарат двух задних лапок лягушки.*

2. Приготовление препарата изолированной задней лапки лягушки с седалищным нервом (физиологический реоскоп)

Пинцетом держат край позвоночника так, чтобы лапки висели вниз под прямым углом к позвоночнику, и осторожно большими ножницами вырезают копчиковую кость - уростиль, который при таком положении препарата выделяется кверху. Для этого осторожно подрезают мышцы с обеих сторон уростиля до самого позвоночника. Укладывают препарат на препаровальную доску, смоченную физиологическим раствором. Остаток позвоночника осторожно большими ножницами рассекают по средней линии, разрезают тазовые кости, затем в области тазобедренных суставов разъединяют лапки. Одну лапку помещают в чашку Петри (влажная камера) на фильтроваль-

ную бумагу, смоченную физиологическим раствором (раствором Рингера).

Вторая лапка подвергается дальнейшей обработке. Придерживая лапку пинцетом за кусочки оставшихся позвонков, подводят кончики маленьких ножниц под седалищное сплетение так, чтобы кусочки позвонков остались в соединении с нервом, и перерезают тазовую кость около позвонков. Нерв отпрепаровывают до тазобедренного сочленения и препарат поворачивают на брюшную сторону. На бедре видны полуперепончатая, двуглавая и трехглавая мышцы. В бороздке между полуперепончатой и двуглавой мышцами разрывают фасцию сустава от тазобедренного сочленения до коленного. Двуглавую и полуперепончатую мышцы раздвигают стеклянными крючками. Между ними лежит седалищный нерв и параллельно ему - бедренная артерия. Пинцетом приподнимают нерв за кусочки позвоночника и отпрепаровывают его до коленного сустава. Нерв с кусочком позвоночника отбрасывают на мышцы голени и стопы. Затем большими ножницами срезают мышцы бедра и перерезают бедренную кость. *Таким образом получают изолированную заднюю лапку лягушки с седалищным нервом (физиологический реоскоп).*

3. Приготовление нервно-мышечного препарата

Из изолированной лапки можно приготовить *нервно-мышечный препарат*: седалищный нерв + икроножная мышца.

Для этого лапку берут за стопу и поворачивают икроножной мышцей кверху, сгибают в голеностопном суставе, поверх которого находится ахиллово сухожилие. Сухожилие подрезают ножницами у места его прикрепления к кости (как можно дальше к стопе). Затем, захватив его пинцетом, осторожно отделяют икроножную мышцу до коленного сустава. Кости голени ниже коленного сустава перерезают ножницами. *Получился нервно-мышечный препарат: седалищный нерв с половинкой позвоночника + икроножная мышца с ахилловым сухожилием и коленным суставом.*

4. Приготовление препарата изолированной икроножной мышцы

Для приготовления препарата изолированной икроножной мышцы у обездвиженной лягушки делают круговой надрез кожи бедра одной из задних лапок и, после снятия кожи, не препарируя нервов, пересекают ахиллово сухожилие способом, описанным выше, отделяют мышцу и перерезают кости: голени - ниже коленного сустава,