МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

«УТВЕРЖДАЮ»
Заместитель Главного
Государственного санитарного врача
СССР
А. И. Заиченко
10 июля 1977 г.
№ 1744-77

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО УСТАНОВЛЕНИЮ ПОРОГОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЯДОВ НА ГЕНЕРАТИВНУЮ ФУНКЦИЮ С ЦЕЛЬЮ ГИГИЕНИЧЕСКОГО НОРМИРОВАНИЯ

Методические рекомендации

Москва — 1978 г.

gost.e-ecolog.ru

НИИ гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР

Составители: И. В. Саноцкий — докт. мед. наук, профессор
В. Н. Фоменко — канд. мед. наук
Л. С. Сальникова — канд. биол. наук
Е. М. Чиркова — канд. мед. наук
Г. А. Пашкова — канд. мед. наук
Э. Е. Стрекалова — канд. биол. наук
Л. Д. Катосова — канд. биол. наук

МЕТОДЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ ПО УСТАНОВЛЕНИЮ ПОРОГОВ ДЕЙСТВИЯ ПРОМЫШЛЕННЫХ ЯДОВ НА ГЕНЕРАТИВНУЮ ФУНКЦИЮ С ЦЕЛЬЮ ГИГИЕНИЧЕСКОГО НОРМИРОВАНИЯ

Возможность развития отдаленных последствий при контакте с разнообразными химическими соединениями все больше привлекает внимание медицинской общественности. Особое место при этом занимают разнообразные нарушения репродуктивной функции. При работе с многочисленными химическими веществами отмечены нарушения овариально-менструальной функции, ослабление половой потенции мужчин, бесплодие мужчин и женщин, нарушение беременности и, наконец, поражения плода и серьезные дефекты рожденного потомства от видимых уродов до обнаруживаемого позже снижения умственного развития. Указанные изменения обычно связаны с вторичными явлениями, возникающими при выраженной интоксикации, однако, в ряде случаев они могут быть также обусловлены **специфическим** гонадотропным, эмбриотропным и генетическим действием ядов, которое обнаруживается при воздействии меньших доз и концентраций, чем те, которые вызывают общие признаки отравления.

Анализ данных литературы и опыт работы лаборатории токсикологии Института гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР показывает, что наличие специфического гонадотропного действия яда часто сочетается с мутагенными свойствами, последние в свою очередь сочетаются с эмбриотропным эффектом. Это обстоятельство помогает установить основные классы соединений, возможно обладающие способностью вызывать отдаленные последствия. В настоящее время такая классификация известна для мутагенов. Указанные классификации условны и не всегда строго придерживаются химической природы соединения, однако, для практических целей они удобны.

Ниже приводится подобная условная классификация (табл. 1).

Таблица 1

Основные группы химических мутагенов

Название группы	Представители
1. Эфиры сульфокислот	эфиры ароматических и алифатических сульфоновых кислот, сульфонаты
2. Эфиры серной кислоты	диэтилсульфат
3. Эфиры фосфорной кислоты	триэтилфосфат
4. Эфиры хлорметиловые	метоксидиметилхлорид
5. Галоидные алкиды	йодистый метил изопропилбромид
6. Хлорэтилсульфиды	иприты
7. 2-Хлорэтиламины	2-хлор-н-пропиламин Ди-2-хлорэтиламин
8. Эпоксиды	окись этилена диэпоксибутан
9. Этиленимины и этиленимиды	триэтиленимин этиленимин морфолин
10. Нитро- и нитрозосоединения	азотистая кислота нитрозоамины нитрозоамиды
11. Адельгиды	формальдегид
12. Лактоны	γ-пропиолактон
13. Диазосоединения	диазоэтан
14. Перекиси	третбутилперацетат
15. Гидроксиламины	гидроксиламин
16. Антиметаболиты (в том числе структурные аналоги нуклеиновых кислот)	азагуанин азасерин уретан
17. Соли некоторых металлов переменной валентности	марганца алюминия
18. Акридиновые красители	профлавин, акридиновый оранжевый

Наиболее достоверные данные о реальной опасности химических факторов в плане развития отдаленных последствий могли бы быть получены при наблюдении над генеративной функцией и развитием потомства лиц, контактирующих с промышленными ядами. Однако, такие исследования на практике затруднительны в связи с многочисленностью факторов, воздействующих на рабочего на производстве и в быту, а результаты оказались бы несвоевременными, учитывая профилактическое направление отечественной гигиены. Поэтому весьма актуальным является вопрос о возможности экспериментального изучения указанного действия.

Отсутствие единых подходов и рекомендованных методов для проведения экспериментальной работы в указанной области приводит к тому, что подобные наблюдения или вообще не включаются в программу токсикологических исследований или проводятся при случайно выбранных уровнях воздействия с привлечением малопоказательных или неадекватных методов. Так, например, в последнее время накопился материал, показывающий, что исследования химического мутагенеза на классическом генетическом объекте Drosophila melanogaster практиковавшиеся в ряде токсикологических исследований, являются весьма ориентировочным показателем генетической опасности яда для человека.

В связи с изложенным, на основании обобщения опыта работы лаборатории токсикологии Института гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР считаем возможным рекомендовать основные положения, которые могут быть использованы в токсикологических исследованиях при изучении возможности возникновения отдаленных последствий воздействия профессиональных ядов.

Если общая генетика, тератология, онкология изучают воздействие химического агента обычно в больших дозах и концентрациях, часто на уровне сублетальных, то практической задачей профессиональной токсикологии является определение **порогов вредного действия** ядов на генетический аппарат половых и соматических клеток, на плод и потомство при низких уровнях воздействия, что позволяет выявить избирательность соответствующих эффектов в условиях производства. Таким образом, рекомендуется проведение соответствующих исследований на уровне Lim_{ac} (при изучении специфического действия — ниже Lim_{ac}) и Lim_{ch} установленных по показателям общего токсического действия. В случае, если по окончании хронического опыта на уровне Lim_{ch} отмечаются признаки изменения генеративной функции, необходимо поставить еще один токсикологический эксперимент с меньшей (не менее, чем в 10 раз) концентрацией яда в целях выявления **минимального** или **порогового** эффекта, а также подпороговой концентрации.

Оценка влияния химических соединений на генеративную функцию проводится в модельных опытах на теплокровных лабораторных животных разных видов. Отсутствие каких-либо сведений о наличии видов животных с такой же как у человека или близкой к ней чувствительностью к химическим агентам, обладающих мутагенным, эмбриотропным и гонадотропным эффектом, затрудняет выбор. Целесообразно использовать для изучения влияния промышленных ядов на

репродуктивную функцию прежде всего спонтанно овулирующих животных,— белых крыс, мышей, а также возможно, кошек и кроликов. Для получения достоверных данных очень важным является соблюдение условий содержания лабораторных животных и прежде всего достаточное обеспечение ежедневного рациона токоферолом (см. «Временные методические указания к постановке экспериментальных исследований для обоснования предельно допустимых концентраций вредных веществ в воздухе производственных помещений»), т. е. круглогодовая подкормка проросшим овсом.

Последствия поражения половых желез могут проявиться в нарушении оплодотворяющей способности или способности к зачатию, в нарушении внутриутробного развития плода (гибель, остановка развития на разных стадиях эмбриогенеза, врожденные уродства и др.), а также в последующих поколениях — не всегда — 1-м, а может быть 2-м, 3-м или 4-м. Необходимо учитывать и соматические мутации, ведущие к нарушению генетического гомеостаза, а также указывающие на возможную бластомогенную активность химического соединения.

Только количественная оценка опасности химических соединений и установление порогов вредного действия в реальных условиях может явиться надежной основой для построения системы профилактических мероприятий.

Ниже приводятся методы, позволяющие выявить избирательное гонадотропное, эмбриотропное и цитогенетическое действие промышленных ядов в эксперименте, установив их минимально эффективные количества.

1. Исследование гонадотропного действия промышленных ядов

Изучение гонадотропного действия новых химических веществ в эксперименте на лабораторных животных необходимо начинать на уровне Lim_{ac}, определенного по интегральным показателям, и далее снижать дозы или концентрации яда для выявления специфичности этого эффекта и его порогов при остром и хроническом воздействии.

Для оценки гонадотропного эффекта химического агента обычно используют патоморфологические методы. Однако качественные гистологические методы позволяют выявить лишь грубую патологию и недостаточно чувствительны для установления порогов гонадотропного эффекта. В связи с указанным для целей токсикологии целесообразно применять методы, позволяющие количественно определить нарушения, возникающие в гонадах подопытных животных.

А. ИЗУЧЕНИЕ СОСТОЯНИЯ СПЕРМАТОГЕНЕЗА И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ СПЕРМАТОЗОИДОВ

Исследование гонадотропного действия химических соединений проводят в эксперименте на половозрелых белых крысах — самцах весом 180—200 г. В группу рекомендуется включать не менее 10 животных. С целью определения специфичности действия вещества на гонады определяют порог однократного действия (Lim_{ac}) по перечисленным ниже показателям в сравнении с показателями общетоксического действия. Исследования гонад проводят у животных, забитых декапитацией через 24 часа после однократной 4-х часовой экспозиции. Для оценки возможности поражения гонад при длительном действии малых концентраций промышленных ядов регистрируют их состояние после 4-х месячного воздействия на уровне порога хронического действия (по показателям общетоксического действия).

При изучении гонадотропного действия химических веществ применяют следующие методы:

1. Макроскопическое исследование семенников

а) наружный осмотр с целью выявления патологических отклонений (кровенаполнение, воспалительные изменения, атрофия, и т. д.);

б) вес обоих семенников и отношение веса семенников к весу тела;

в) размеры семенников (длина и объем).

2. Микроскопическое исследование семенников. Морфологические показатели состояния сперматогенного эпителия

Семенники фиксируют в 10% формалине или жидкости Карнуа, заливают в парафин, режут тонкие срезы (6—7μ), окрашивают гематоксилин-эозином.

Морфологическую оценку состояния семяродного эпителия (рис. 1), стадии развития которого классифицировали по Chermont, Leblond, Messier (1959) проводят по следующим количественным показателям:

а) индекс сперматогенеза подсчитывают по 4-х бальной системе Fogg и Cowing, (1951), фиксируют в канальце наличие сперматогоний, сперматоцидов I или II порядка (быстрая смена фаз), сперматид и сперматозоидов, затем вычисляют индекс сперматогенеза $\frac{\Sigma A}{100}$, где А число стадий в каждом канальце, 100 — число подсчитанных канальцев.

б) суммарное количество нормальных сперматогоний (первый на базальной мембране слой клеток) и число дегенеративных форм сперматогоний подсчитывают в 20 круглых канальцах;

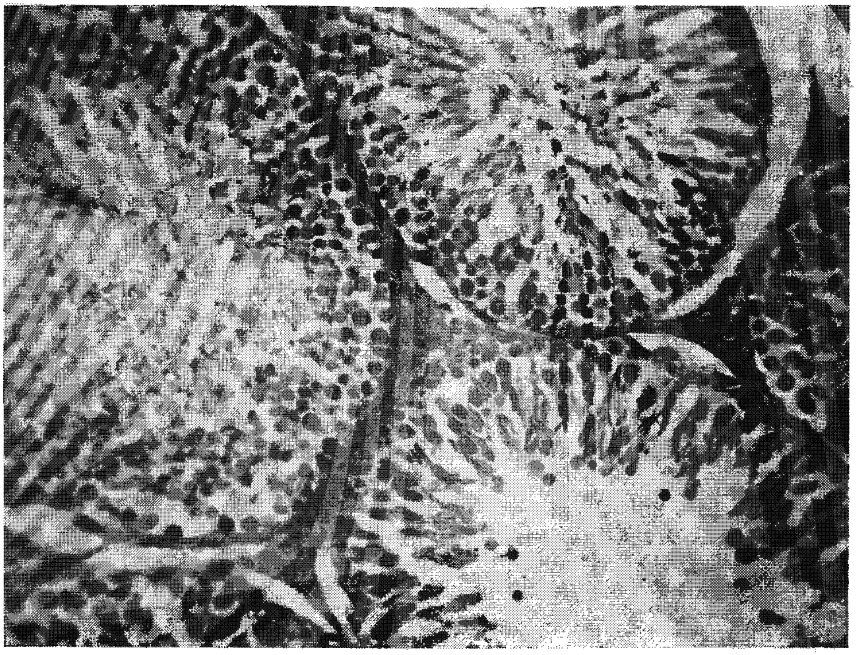


Рис. 1. Поперечный разрез семенных канальцев у белой крысы (норма) (увелич. 300)

в) количество канальцев со слущенным семяродным эпителием подсчитывают при просмотре 100 канальцев. Рис. 2;

г) относительное число канальцев с 12-й стадией мейоза (метафаза 2-го деления созревания) подсчитывают в 100 канальцах.

Одновременно отмечают качественные изменения: отслоение эпителия от базальной мембраны, дегенеративные явления («окна») в семяродном эпителии, наличие гигантских клеток и т. д. Рис. 3.

Для ускоренной оценки выраженности гонадотропного действия химического соединения возможно использование двух показателей нарушения сперматогенеза — суммарное количество нормальных сперматогоний и количество канальцев со слущенным семяродным эпителием.

В хронических опытах на завершающем этапе с целью полного анализа действия вещества производят исследования по всем вышеуказанным показателям.

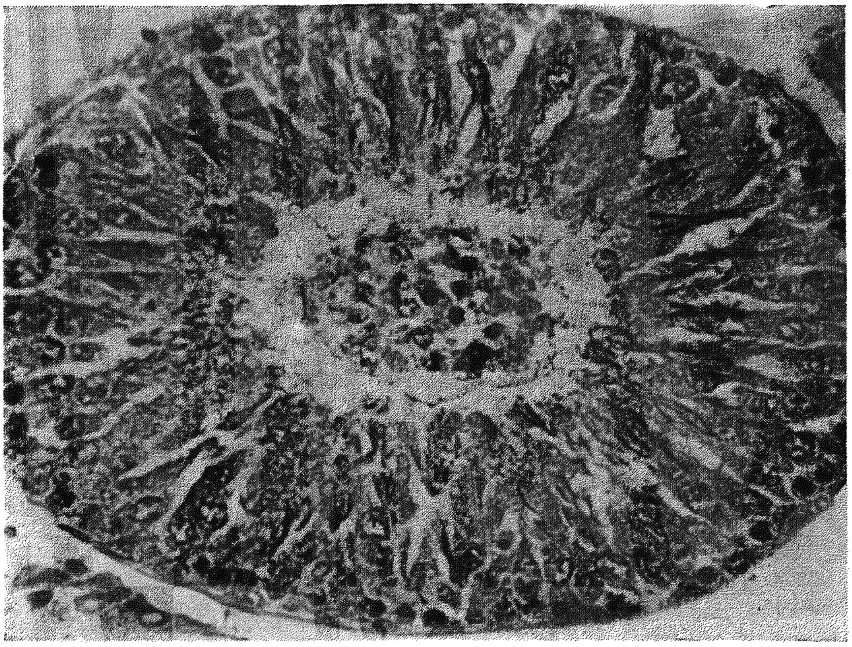


Рис. 2. Слущивание сперматогенного эпителия в семенном канальце белой крысы (увелич. 600)

3. Определение количества нуклеиновых кислот в семенниках (биохимические и гистохимические методы)

Биохимические и гистохимические методы исследования нуклеиновых кислот в семенниках могут быть использованы для раннего выявления тонадотропного действия ядов:

а) биохимическое определение ДНК и РНК проводят в гомогенате семенника по методу Р. Цанева и Г. Маркова (1963);

б) исследование распределения РНК и ДНК в различных генерациях сперматогенного эпителия.

Для выявления РНК применяют метод Браше — окраска метиловым зеленым — пиронином, основанный на одновременном окрашивании двух срезов. При этом один из срезов должен быть предварительно обработан рибонуклеазой. Ма-

териал, окрашивающийся в красный цвет пиронином и исчезающий при обработке рибонуклеазой, представляет собой РНК.



Рис. 3. Резкая атрофия семяродного эпителия и гигантские клетки в семенном канальце белой крысы (увелич. 300)

Для выявления ДНК используют реакцию Фельгена, в основе которой лежит кислотный гидролиз фиксированной ткани, с последующей окраской реактивом Шиффа.

Желательно использовать микроспектрофотометрическую установку МУФ-5 для количественного определения нуклеиновых кислот в различных генерациях семяродного эпителия, что в отличие от биохимических методов дает возможность изучить структуру конкретной тканевой клетки.

4. Функциональное состояние сперматозоидов (физиологические, морфологические и биохимические методы)

а) характер и длительность движения сперматозоидов изучают по методике Е. К. Милованова (1962) в модифика-

ции Г. И. Егоровой, (1966). Используют суспензию сперматозоидов, полученную при продольном разрезании придатка семенника крысы и дозированном (2 минуты) перемешивании его в физиологическом растворе (2 мл) на часовом стекле отрезком трубки (но не стеклянная палочка). Температура раствора 22—23°. Для наблюдения за длительностью движения сперматозоидов капля суспензии наносится на предметное стекло с лунками, которое помещается во влажную камеру (чашка Петри, закрытая обыкновенным стеклом). Последнюю ставят на обогреваемый столик (либо электронагревание, либо присоединение медной трубки на медной площадке с отверстием к водяному ультратермостату) при t—24° и отмечают время полного прекращения движения сперматозоидов. Возможно применение микроскопа с термостатом МБИ-12;

б) для определения относительного количества живых сперматозоидов на предметное стекло наносят 1 каплю суспензии и 1 каплю 0,5% водного раствора эозина, после смешивания в течение 1—2 секунд приготовляют мазок, который немедленно микроскопируют; подсчет проводят на 200 сперматозоидов. Окрашиваются только мертвые сперматозоиды;

в) для подсчета относительного количества патологических форм (деформация, удвоение, набухание или сморщивание как головки, так и шейного и хвостового отрезков сперматозоидов и др.) приготовляют мазки: одну каплю суспензии наносят на предметное стекло, подсушивают на воздухе и окрашивают красителем — щелочным раствором метилового фиолетового (рис. 4). Просчитывают 200 сперматозоидов;

г) для определения жизнеспособности сперматозоидов исследуют их резистентность в отношении химических растворов, соответствующих физиологическим условиям.

При изучении кислотной резистентности к взвеси сперматозоидов постепенно добавляют 0,1N раствор соляной кислоты, одновременно определяя pH среды и подвижность сперматозоидов. Величина pH в момент прекращения движения сперматозоидов свидетельствует об их максимальной кислотной резистентности. Регистрацию pH на pH-метре ЛПУ-01 или приборе Astrup Micro.

Осмотическую резистентность исследуют при добавлении к суспензии сперматозоидов 2,8—5,6% растворов хлористого натрия. Фиксируют минимальную концентрацию хлористого натрия, вызывающую прекращение движение сперматозоидов;

д) концентрацию сперматозоидов определяют путем набора суспензии в меланжер для лейкоцитов и подсчета

в 5 больших квадратах по диагонали в камере Горяева. Возможно использование целлоскопа 202;

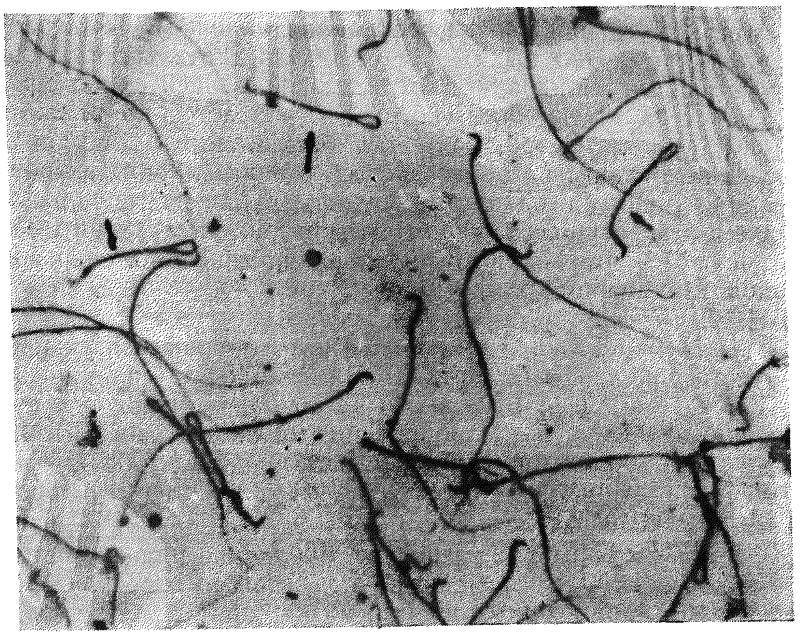


Рис. 4. Патологические формы сперматозоидов (увелич. 200)

е) состояние окислительно-восстановительных процессов в сперматозоидах можно определять методом Варбурга, потенциометрией или методом Н. П. Шергина (1961) основанным на реакции 0,01% раствора метиленовой сини. Скорость обесцвечивания метиленовой сини пропорциональная количеству сперматозоидов и интенсивности их дыхания.

На предметное стекло наносят две капли раствора метиленовой сини и суспензии, смешивают и насасывают в стеклянную трубку диаметром 0,8—1 мм и длиной 2 см. Трубки кладут на белую бумагу и отмечают время обесцвечивания середины столбика (концы остаются голубыми).

В целях исследования функционального состояния сперматозоидов с помощью биохимических методов предлагается использовать метод определения содержания гиалуронидазы в сперматозоидах (фермента, обладающего свойством разъединять клетки лучистого венца яйцевой клетки без их деструкции и, таким образом, делать возможным внедрение

сперматозоидов). Обычно используют вискозиметрический или турбометрический методы.

Следует указать, что решающим для проникновения сперматозоидов в яйцевую клетку является число попавших к яйцевой клетке сперматозоидов и образовавшаяся вокруг нее концентрация гиалуронидазы.

Б. МЕТОДЫ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЯИЧНИКОВ У ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Исследование функционального состояния яичников при действии химических соединений проводится в эксперименте на самках белых крыс весом 180—200 г. Преимущественное использование белых крыс обусловлено тем, что у крыс имеется кратковременный, хорошо изученный половой цикл, крысы относятся к спонтанно-овулирующим животным и обеспечивают возможность быстро получить массовый материал.

Для оценки возможности поражения функции и микроструктуры яичников лабораторных животных проводят испытание химических соединений на уровнях порога хронического действия (по показателям общего токсического эффекта) с установлением порога специфического действия.

В эксперимент отбираются только те животные, которые имеют нормальный эстральный цикл. Установление характера эстрального цикла проводится до опыта примерно в течение 2-х недель и является обязательным.

При изучении функционального состояния яичников применяются следующие методы:

1. Исследование эстрального цикла.
2. Относительный вес яичников и количественная оценка микроструктуры яичника.
3. Определение активности гонадотропной функции гипофиза.

1. Исследование эстрального цикла

Эстральный цикл у животных изучается путем анализа вагинальных мазков, которые осторожно берутся с помощью смоченного в физиологическом растворе ватного тампона, приготовленного на тонкой стеклянной палочке или спичке (можно использовать для этих целей глазные пипетки) и наносятся в капле физиологического раствора на предметное стекло. Мазки можно расшифровывать в живой капле без предварительной окраски. Удобнее проводить расшифровку кольпоцитограмм животных после окраски. Мазки могут быть

окрашены любым способом: гематоксилин-эозином или 1% водноспиртовым раствором метиленового синего.

Определение стадий эстрального цикла проводится по соотношению элементов в вагинальном мазке:

Таблица 2

Стадии	Элементы мазка		
	чешуйки	эпителиальные клетки	лейкоциты
диэструс	слизь		+
проэструс	единичные	+ (много)	
эструс	+ (много)		
метаэструс	единичные	в небольшом количестве	+

Учитывая продолжительность эстрального цикла, длительность отдельных фаз цикла, а также ритмичность чередования фаз цикла.

Продолжительность эстрального цикла у белых крыс в норме колеблется от 4 до 6 дней; фазы эструс — до 1 дня; проэструс — до 12 часов; диэструс — до 2 дней; метаэструс — 6 часов.

Вагинальные мазки исследуются ежедневно в одни и те же часы с учетом правила «одного часа», при хроническом воздействии яда — в течение 2 циклов каждого месяца и подострой интоксикации — по 2 цикла с 10-дневным перерывом. Необходимо начинать исследование с первого дня воздействия вещества с целью уловить начальные изменения в течение эстрального цикла, которые могут в дальнейшем проявиться только к концу хронического опыта или даже в период восстановления.

Длительность взятия мазка обусловлена тем, что этот срок достаточен для характеристики эстрального цикла белых крыс и, кроме того, исключает возможность развития вагинитов.

2. Относительный вес яичников и количественная оценка микроструктуры яичника

По окончании опыта животные забиваются путем декапитации или перерыва спинного мозга в шейном отделе, извлекаются яичники, которые тщательно выделяются из окружающей ткани, взвешиваются на торзионных или аналитических весах. После чего определяется отношение веса обоих яичников к весу тела.

При этом все животные забиваются в одной стадии, рекомендуется проводить забой в стадии эструс или проэструс. Последнее необходимо ввиду дальнейшего подсчета структурно-функциональных элементов в яичнике и оценки активности гонадотропной функции гипофиза.

Следует отметить, что правый и левый яичники по количественному и качественному составу структурных компонентов мало отличаются друг от друга, ввиду чего подсчет структурных элементов производится в одном яичнике.

Яичник фиксируется в жидкости Карнуа в течение 1,5 часов в холодильнике, далее проводятся через серию спиртов и смеси спирта с хлороформом (по общепринятой методике), после чего заливается в парафин. Приготавливаются серийные срезы яичников по типу топографических (через весь орган), толщиной в 6 микрон.

Препараты окрашиваются гематоксилин-эозином. Производится подсчет следующих элементов яичников по Mandl, Zuckerman (1951, 1952, рис. 5, 6):

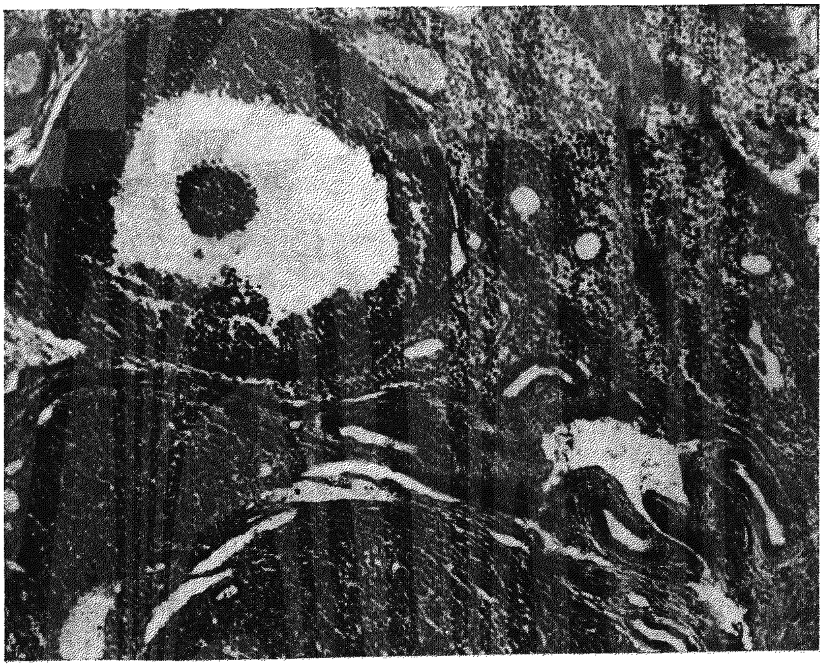


Рис. 5. Обзорный снимок яичника (увелич. 100)

а) примордиальные фолликулы и фолликулы с одним слоем гранулезных клеток;

б) фолликулы с двумя и более слоями гранулезных клеток;

в) зрелые фолликулы (граафовы пузырьки);

г) атретические тела и атрезирующиеся фолликулы;

д) желтые тела;

е) общее количество генеративных форм.



Рис. 6. Примордиальные фолликулы и фолликулы с одним слоем гранулезных клеток (увелич. 500)

Указанные элементы подсчитываются по всей поверхности среза. Зрелые фолликулы, фолликулы с 2-мя и более слоями гранулезных клеток, атретические тела учитываются в каждом пятом срезе и результат умножают на 5. Примордиальные фолликулы и фолликулы с одним слоем гранулезных клеток подсчитываются в каждом 10 срезе (результаты умножают на 10). Желтые тела считаются в срединном срезе. При подсчете структурно-функциональных элементов яичника учитываются только те фолликулы, которые содержат ядро с ядрышком.

Весь полученный материал подвергается статистической обработке по классическому методу с применением критерия Стьюдена-Фишера для сравенения средних величин.

3. Определение активности гонадотропной функции гипофиза

Все процессы развития фолликулов в яичнике, а также характер эстрального цикла находятся под регулирующим влиянием гипоталамо-гипофизарных областей. Исходя из гипоталамо-гипофизарной регуляции полового цикла, определение активности гонадотропной функции гипофиза составляет необходимый элемент при оценке функционалнього состояния яичников. Определение активности гонадотропной функции гипофиза проводится по тесту на самках инфантильных мышей весом 3,5—4,0 г.

Выделенные гипофизы после взвешивания растираются в фарфоровой ступке (раздельно гипофизы от крыс каждой группы) и разводятся в физиологическом стерильном растворе, количество которого в мл соответствует количеству гипофизов. При этом количество инфантильных мышей-реципиентов должно быть на 1 меньше, т. е. если гипофизов получено от 10 крыс, то эмульсию гипофизарную вводят только 9 мышам — реципиентам. Введение гипофизарной эмульсии осуществляют 2 раза в день, в течение 3-х дней, под кожу спинки. На 5-ые сутки мыши-реципиенты забиваются и определяются следующие показатели:

а) открытие половой щели;

б) вес яичников, матки и относительный вес яичников и матки;

в) наличие блютпунктов в яичниках.

Вес яичников и матки определяется на аналитических весах, после тщательного выделения названных органов из окружающих тканей с помощью микроскопа МБС-2.

Увеличение относительного веса матки и яичников самок инфантильных мышей-реципиентов, а также наличие блютпунктов свидетелсьтвует о раннем половом созревании мышей под влиянием введенной типофизарной эмульсии крыс.

Сравнение проводится с двойным контролем: с мышами-реципиентами, получившими эмульсию гипофизов от контрольных крыс и с мышами, не получившими гипофизарной эмульсии.

В. ИССЛЕДОВАНИЕ ОПЛОДОТВОРЯЮЩЕЙ СПОСОБНОСТИ ИЛИ СПОСОБНОСТИ К ЗАЧАТИЮ

Интегральной оценкой воздействия промышленного яда на половую функцию является проверка оплодотворяющей

способности лабораторных животных (самцов) или способности к зачатию (самок).

Указанные исследования предпочтительно проводить после хронической интоксикации, так как различные генерации семяродного эпителия неодинаково чувствительны к воздействию химического агента, в связи с чем, только повторное воздействие изучаемого соединения на все стадии сперматогенеза позволит выявить патологию.

Период сперматогенеза составляет 35 дней у мышей, 48 дней у крыс, кроме того следует учитывать время необходимое для прохождения сперматозоидов через придаток семенника, которое составляет от одной до трех недель. (ВОЗ, 1967).

Самцы (или самки) тотчас после окончания хронической затравки спариваются с интактными самками, имеющими нормальный эстральный цикл (или соответственно со здоровыми самцами) в соотношении 1 : 2. Такая техника подсадки обеспечивает наибольшее количество спариваний. Желательно подсаживать самок в стадии течки. Во время спаривания и всего срока беременности самки не подвергаются воздействию изучаемого соединения.

Началом беременности считают день определения во влагалищном мазке сперматозоидов или наличие влагалищной пробки.

Количество забеременевших самок в группе является основным показателем оплодотворяющей способности самцов или способности к зачатию у самок. Статистическая достоверность различий между результатами опыта и контроля определяется методом χ^2.

На 17—21 день беременности часть самок забивают. Анализ эмбрионального материала можно проводить по показателям, приведенным для изучения эмбриотропного действия ядов (см. далее). Другую половину беременных самок оставляют до родов. Исследование полученного потомства ведут до 2-х месячного возраста с отъемом от матери на 28 день.

Эффект может быть обусловлен как нарушением систем и функций непосредственно в организме потомства, так и дефектами вскармливания или нарушением материнского инстинкта в случае воздействия ядов на самок. Для дифференцирования причин рекомендуется пересадка потомства от подопытных самок к контрольным. Эта пересадка должна осуществляться с осторожностью. Сосунки должны быть погружены на время в подстилку той клетки, куда они подсаживаются, чтобы отбить запах самки, иначе они могут быть съедены приемной матерью.

II. ИССЛЕДОВАНИЕ ЭМБРИОТРОПНОГО ДЕЙСТВИЯ ЯДОВ

При изучении эмбриотропного действия химических веществ большое значение имеет продолжительность воздействия; сроки беременности, на которые приходится это действие; уровни воздействия; выбор экспериментальных животных.

Для промышленной токсикологии, учитывая реальные условия воздействия яда на производстве, практический интерес представляет чувствительность эмбриона:

а) в течение всей беременности;

б) в первый триместр беременности;

в) в отдельные дни беременности (в основном, в период органогенеза).

Следует напомнить, что сроки узловых этапов эмбриогенеза весьма различны для человека и животных. В таблице 3 приведено сравнение сроков узловых периодов эмбриогенеза у человека и у лабораторных животных (крыса, мышь, золотистый хомячок).

Таблица 3

Сроки формирования некоторых органов и систем для человека и для наиболее широко используемых в эксперименте животных (крыса, мышь, золотистый хомячок)

(Y. Robson, F. Sullivan, 1968, Th. Shepard, 1973)

Стадии	Дни беременности			
	человек	крыса	мышь	Золот. хомячок
1	2	3	4	5
Продолжительность беременности	267	21—22	18—20	15,5—16
Центральная нервная система				
Медулярная пластинка и желобок	18	9	6,5	7,5
Закрытие переднего невропора	26	11	9	8,25
Закрытие заднего невропора	28	12	9,5	8,5
Развитие мозгового придатка	33	13	—	—
Появление сосудистого сплетения	35	15	—	—
Глаз и ухо				
Появление зрительного дивертикула	24	11	—	—
Формирование глазного бокала и хрусталика	28	13	—	—

1	2	3	4	5
Формирование зрительных нервов	49	17	—	—
Формирование век	56	15	—	—
Срастание век	70	18	—	—
Формирование слуховых плакод	24	11	—	—
Отсоединение слуховых пузырьков	28	13	—	—
Формирование лабиринта	49	15	—	—
Сердечно-сосудистая система				
Первые сердечные толчки	22	10	—	8
Срастание сердечной трубки	23	11	—	—
Формирование интравентрикулярной перегородки	49	17	—	—
Дыхательная система				
1-я бронхиальная дуга	20	10	8,3	7,7
3-я бронхиальная дуга	26	11,5	9	8,25
Зачатки легкого	28	12	9,6	9
Скелет				
Начало формирования скелета из мезенхимы в основании черепа, позвонков и дуг	30	14	—	—
Хрящ на позвонках	42	15	—	—
Окостенение ключиц и нижней челюсти	42	17	—	—
Окостенение диафизов всех длинных костей	49	20	—	—
Твердое небо				
Формирование небного гребня	56	15	—	—
Срастание небных отростков	63	19	15	12,3
Конечности				
Появление зачатков передних и задних конечностей	28	12	10	8—9
Пластинки рук и ног	38	15	—	—
Окостенение в центре диафизов длинных костей	49	19	—	—
Мочеполовая система				
Первичная гонада	42	—	—	—
Дифференциация пола	49	13	—	—
Первичные фолликулы в яичнике	100	17	—	—
Пронефрос	22	10	—	—

1	2	3	4	5
Мезонефрос	25	11—12	9,5	9
Мезонефрический проток	26	12	11	—
Дифференциация метанефроса	35	12	—	—
Появление мюллерова протока	40	13,5	—	11
Появение уроректальной перегородки	43	17	—	—

Предлагается схема экспериментального исследования специфического эмбриотропного действия ядов (приложение 1).

Фармакологи изучают тератогенную активность лекарств с применением больших доз, превосходящих часто терапевтические.

При гигиеническом нормировании химических соединений использование больших доз и концентраций нецелесообразно: во-первых, большие дозы и концентрации химических продуктов могут вызвать общую интоксикацию и возникшие нарушения в развитии плода не дадут возможности судить о специфике действия химического вещества; во-вторых, проведение эксперимента с использованием больших доз и концентраций, а затем постепенное снижение их очень усложняет, удорожает работу и приводит к большой потере времени. Поэтому исследования специфического эмбриотропного действия целесообразно начинать при воздействии веществ в пороговых концентрациях (преимущественно на уровне Lim_{ch}).

Для практических рекомендаций необходимо определить следующие параметры:

1. Порог общего (интегрального) действия на материнский организм.
2. Порог действия на эмбриогенез.
3. Специфичность эмбриотропного действия.

Меру специфичности определяем по зоне специфического действия:

$$Zsp = \frac{Lim_{integr}}{Lim_{spec}}$$

По мнению группы экспертов ВОЗ, при изучении тератогенной активности химических веществ необходимо проводить эксперимент на трех видах млекопитающих: на эмбрионах крыс, мышей и кроликов (ВОЗ, 1968). У крыс спонтанные уродства обычно полностью отсутствуют. Для мышей характерна высокая частота спонтанных пороков развития. Если опыты на крысах выявили тератогенные свойства химического препарата, дополнительные исследования на мы-

шах лишены особого смысла, так как такие препараты, как правило, будут тератогенами и для мышей.

Отбираются половозрелые самки с нормальным эстральным циклом: крысы весом 180—250 г, мыши 22—26 г. Во второй половине дня самок с циклом на стадии проэструс и эструс подсаживают к самцам в соотношении 2:1. Первый день беременности определяется по наличию сперматозоидов в вагинальных мазках. Кролики имеют преимущество в том, что у них можно точно определить время овуляции, так ка. последняя наступает в момент спаривания.

В каждую подопытную группу рекомендуется отбирать не менее 20—60 животных. Беременные самки начинают подвергаться действию вещества: 1-ая группа — в течение первых 7 дней; 2-ая группа — в течение всей беременности, 3—13-я группы — в течение двух дней в различные сроки беременности.

Для выявления возможного общего токсического действия вещества в конце беременности животные обследуются по интегральным и специфическим для изучаемого соединения показателям.

Показатели функционального состояния материнского организма будут служить основным критерием оценки **специфичности** эмбриотропного действия. Известно, что сама беременность является нагрузкой на организм и ведет за собой изменение некоторых его функций, которые усугубляются под действием яда. Для проверки этого в эксперимент необходимо включать беременных и небеременных самок.

Половина самок забивается на 17—21 сутки беременности. На вскрытии осматриваются рога матки и плацента; при выявлении каких-либо отклонений от нормы проводится гистологическое исследование. Учитывается количество желтых тел беременности в яичнике, вес плаценты, количество мест имплантации, предимплантационная гибель, число живых и мертвых плодов, число резорбций, вес плодов, определение общей эмбриональной смертности. В протокольном журнале описываются уродства, которые были обнаружены у эмбрионов. Наиболее распространены уродства глаз (микрофтальмия, анофтальмия); мозга (гидроцефалия, энцефалия, экзенцефалия уродства спинного мозга (рахишизис, краниорахищизис); уродства лицевого черепа (заячья губа, волчья пасть, отсутствие и укорочение челюстей); уродства, черепа (несращение свода черепа, расщепление черепа); пупочные грыжи; уродства конечностей (микромелия, фокомелия, амелия и т. д.). Относительно часто наблюдаются пороки сердца (незаращение отверстия в перегородках и др.).

Для определения патологии внутренних органов плоды фиксируются в жидкости Буэна в течение 7 дней, потом переносятся в 70° спирт, где они могут сохраняться долгое время. Wilson (1965) разработал метод выявления патологии внутренних органов плодов на серии срезов, сделанных от руки бритвой на расстоянии друг от друга в 1 мм, которые затем тщательно просматриваются под бинокулярной лупой МБС-1 или МБС-2. Указанный метод модифицирован в отделе эмбриологии Института экспериментальной медицины АМН СССР проф. А. П. Дыбаном и соавторами (1970). Авторы предложили делать только 9 срезов: срез параллельно нижней челюсти, срез за вибрисами, срез на уровне центра глаза, срез на уровне темени, срез за ушами, срез над верхними конечностями, срез под верхними конечностями через сердце, срез выше пуповины, ниже пуповины.

Отклонения в тканевой структуре и дифференциации можно обнаружить на обычных гистологических препаратах под микроскопом, используется также метод просветления мягких тканей эмбриона для исследования аномалий скелета и размера костей по A. Dawson (1926). Однако величины участков окостенения плодов 20-дн. возраста беспородных крыс очень вариабельны, в связи с чем очень трудно определить гигиеническую значимость этого показателя. Окостенение диафизов можно изучать с помощью тетрациклина на люминесцентном микроскопе.

Другую половину самок целесообразно довести до родов, чтобы проследить развитие потомства, так как у внешне нормальных плодов иногда можно выявить пониженную жизнеспособность только в постнатальный период развития. Для родов животные должны быть отсажены в отдельные клетки. При наблюдении за потомством необходимо учитывать смертность, коэффициенты выживаемости и лактации, прирост веса в динамике. Другие показатели: время прорезывания глаз, отлипания ушей, покрытие шерстью, открытие половой щели — субъективны. На 28—30 день потомство отсаживается от матерей (раздельно самцы и самки). В возрасте от 1 до 18 месяцев потомство рекомендуется обследовать по интегральным и специфическим показателям с применением различных функциональных и экстремальных нагрузок, с использованием методик, характеризующих поведенческие реакции. У половозрелых животных изучается активность половых желез. В некоторых случаях рекомендуется исследовать возможность трансплацентарной индукции бластомогенеза.

При исследовании механизма эмбриотропного действия веществ большое значение имеет определение проницаемости

плаценты для ядов и их метаболитов. Для решения вопроса о проницаемости плаценты целесообразно исследовать присутствие изучаемого вещества или его метаболитов в крови матери, в гемогенате плаценты и в крови или гомогенате плода.

Таким образом, только параллельное изучение состояния материнского организма, эмбриогенеза и потомства дает возможность выявить опасность **специфического** эмбриотропного действия исследуемого вещества и определить пороговые и недействующие концентрации по этому показателю.

III. ИССЛЕДОВАНИЕ МУТАГЕННОГО ДЕЙСТВИЯ

Мутационный процесс под влиянием химических веществ подразделяется на две основные группы: мутагенез в половых клетках и мутагенез в соматических клетках.

А. ПРЯМАЯ ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ОЦЕНКА НА ПОТОМСТВЕ МЛЕКОПИТАЮЩИХ

Наиболее доступным методом в эксперименте на млекопитающих является обнаружение доминантных летальных мутаций, возникающих в мужских половых клетках при воздействии мутагенных факторов и проявляющихся в первом поколении.

Общий принцип постановки эксперимента заключается в следующем: самцов (не менее 10 особей в группе) подвергают воздействию промышленного яда в течение всего цикла сперматогенеза (см. стр. 178 ВОЗ, 1967). Затем их спаривают в течение недели с интактными самками, имеющими нормальный эстральный цикл, в соотношении 1:2 или 1:3 (животных в это время продолжают подвергать воздействию яда) или через 2—3 месяца после прекращения эксперимента с целью выявления мутагенного действия вещества на стволовые клетки.

Таким образом, в подобном эксперименте используется от 150 до 300 животных обоего пола. Время необходимое для проведения эксперимента зависит от поставленных задач и длится от 4 до 6 месяцев.

Возможно также исследование чувствительных половых клеток на разных стадиях сперматогенеза. Общая продолжительность сперматогенеза и длительность отдельных стадий приведены в докладах ВОЗ (1967).

Возникновение доминантных летальных мутаций определяется по повышенной эмбриональной смертности у беременных самок.

Для количественной оценки мутагенного десйтвия, при анализе эмбрионального материала подсчитывается: количе-

ство живых эмбрионов — А; количество погибших эмбрионов (мест резорбции) — Б; количество желтых тел беременности — В. У каждой самки учитывается:

1. Общая эмбриональная смертность $\frac{В-А}{В} \cdot 100\%$;

2. Доимплантационная смертность $\frac{В-А+Б}{В} \cdot 100\%$;

3. Постимплантационная смертность $\frac{Б}{А+Б} \cdot 100\%$;

4. Изменение общей эмбриональной смертности (этот показатель может быть применен при сравнении эффективности доз или результатов различных сроков наблюдения)

$$I - \frac{А/В \text{ опыт}}{А/В \text{ контр.}}.$$

Статистическая достоверность различий между результатами опыта и контроля определяется по критерию Стьюдента-Фишера (при $P < 0{,}05$) или другими адекватными методами.

Метод доминантных леталей выявляет в основном геномные* и хромосомные мутации* и почти не охватывает большой класс генных мутаций, особенно рецессивных*. Последние, существуя в гетерозиготе*, способны накапливаться в популяции.

Для оценки способности исследуемых веществ вызывать генные мутации используется метод специфических локусов. Он основан на том, что необработанные мутагеном животные, гомозиготные* по ряду рецессивных генов, спариваются с животными, подвергавшимися воздействию изучаемого соединения, гомозиготными по соответствующим доминантным* аллелям. Если в половых клетках обработанных животных нормальный аллель* мутирует в рецессивный или на этом месте появляется делеция*, то это обнаруживается по фенотипическим* изменениям в F_1 потомства.

Однако, для этого метода требуются специальные штаммы мышей и большое количество экспериментальных животных. поэтому тестирование промышленных соединений таким методом в широком плане в институтах гигиенического профиля очень дорого и вряд ли возможно.

В настоящее время для определения точковых мутаций под воздействием химических мутагенов и продуктов их метаболизма используются тесты in vivo — метод промежуточного хозяина и in vitro — с и без метаболической активации, а также определение мутагенных метаболитов химических

---

* Краткий словарь генетических терминов приведен в конце текста.

веществ в моче и крови подопытных животных. В качестве индикаторного организма, определяющего генные мутации, используют микроорганизмы. Более перспективным оказался метод, основанный на инкубации микроорганизмов с гомогенатами тканей млекопитающих в системе с ко-факторами, необходимыми для работы ферментов, осуществляющих процессы метаболических превращений. Это объясняется тем, что многие химические соединения непосредственно не вызывают мутагенный эффект. В качестве лабораторных животных обычно используются мыши дигибриды.

Генетическая активность промышленных ядов может быть также изучена на соматических клетках, что само по себе имеет существенное значение в отношении возможности возникновения онкологических заболеваний и может служить прогностическим тестом в отношении зародышевых клеток. Цитогенетические методы требуют меньших затрат и при определенном навыке работы вполне выполнимы в условиях токсикологических лабораторий гигиенических институтов.

Б. ЦИТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

а) Цитогенетические исследования на культурах клеток человека (эмбриональные фибробласты и лимфоциты периферической крови) позволяют учесть характер и частоту изменения нормального набора хромосом под влиянием промышленного яда в условиях in vitro. Кариотипирование и учет хромосомных аберраций в соматических клетках проводится по рекомендации Н. П. Бочкова с соавт. (1972).

Принцип постановки культуры крови основан на следующем: добавление фитогемагглютинина (ФГА) в среду для выращивания лейкоцитов ведет к превращению их в бластоподобные клетки, обладающие высокой митотической активностью. Последующее введение в культуру колхицина вызывает остановку митозов на стадии метафазы. Введение гипотонического раствора в среду вызывает набухание клеток и отделение хромосом друг от друга.

На стадии метафазы хромосомы представлены в виде четких структур, что дает возможность обнаружить изменения кариотипа * (количество хромосом в ядре) и хромосомные аберрации.

В большинстве случаев результаты, полученные в условиях in vitro являются ориентировочным показателем генетической опасности яда, так как в указанных условиях не могут быть учтены барьерные системы и реакции защиты организма, а также метаболизм яда, поэтому следует рассматривать культуру ткани как модель или аналог нормальной

ткани, некоторые свойства и функции которой можно воспроизвести достаточно точно, другие воспроизвести невозможно по самой природе метода.

Однако, метод цитогенетического анализа культуры лейкоцитов периферической крови человека представляет определенную ценность при клиническом обследовании рабочих химических производств.

б) Цитогенетический анализ в условиях in vivo проводится на хорошо регенерирующих тканях лабораторных животных, подвергавшихся воздействию промышленного яда по обычной программе постановки токсикологического эксперимента.

Объектом для цитогенетических исследований целесообразнее всего выбирать: костный мозг и семенники—ткани, обладающие высокой митотической активностью. Для них характерна практически стабильная митотическая активность на всем протяжении суток *.

Митотический индекс в клетках костного мозга крыс в норме составляет около 2%.

Метод изучения хромосомных аберраций является наиболее адекватным, так как позволяет выявить реакцию целостного организма на взаимодействие с химическим соединением.

Для анафазного анализа извлекают бедренные кости у животных, забитых методом декапитации, и фиксируют в ацетоуксусном спирте (1 : 3) в течение 3—4 часов при температуре около +3° с последующей проводкой через 96° спирт и хранением в 70° этиловом спирте. В дальнейшем клетки костного мозга окрашивают 1% ацетокармином и готовят временные давленные препараты.

Для получения препаратов из семенников необходимо снять тунику с обоих семенников и измельчить пинцетами в нескольких каплях гипотонического раствора цитрата натрия (2,2%) при температуре 37°, центрифугировать 30 сек. при 700 об/мин. Слить надосадочную жидкость в центрифужную пробирку и центрифугировать 5 мин. 30 сек., вновь слить надосадочную жидкость и добавить к осадку 1% раствор цитрата натрия подогретого до 37° и выдержать 10 минут в термостате при 37°. Затем центрифугировать 5 мин.

---

* Имеется ряд других тканей с высокой митотической активностью, например, митотический индекс эпителия кишечника у крыс достигает 5,0%, двенадцатиперстной кишки, 2,1 ± 0,1%. Однако, деление клеток в этих тканях подчинено строгому суточному ритму, что делает эти ткани менее удобными для цитогенетического анализа, особенно в тех случаях, когда возникает необходимость взятия материала в разное время суток. Что касается митотической активности других тканей, то она сравнительно невелика.

30 сек. Слить надосадочную жидкость и добавить по каплям фиксатор — метанолуксусный спирт (3 : 1); тщательно взболтать и отцентрифугировать (5 мин. 30 сек). Слить надосадочную жидкость и выдержать в новом фиксаторе 10 минут, затем центрифугировать 5 мин. 30 сек. Слить надосадочную жидкость и добавить фиксатор в количестве необходимом для приготовления препаратов. Препараты красят лактоорсеином.

На препаратах при анафазном анализе учитывают частоту цитогенетических нарушений (хромосомные и хроматидные мосты, одиночные и парные фрагменты, отдельно подсчитывается количество слипаний и отставания хромосом, количество дегенерирующих клеток). Частота хромосомных перестроек учитывается в хорошо разошедшихся анафазах и ранних телефазах (рис. 7).

С целью получения убедительных данных в материале от каждого животного должно быть проанализировано не менее 300 делящихся клеток. На каждый срок исследования должен браться материал не менее, чем от 8 животных в группе.

Митотический индекс с подсчетом профаз, метафаз, анафаз и телофаз производится на 1 000—1500 клеток, делящихся и неделящихся, в разных частях препарата.

В таблице 4 приведены основные статистические параметры митотической активности и спонтанного уровня хромосомных повреждений в костном мозге, полученные в нашей лаборатории (включая истинные аберрации хромосом и слипания) Этот анализ проведен на животных 2-х — 6-ти месячного возраста в зависимости от времени года.

Для метафазного анализа клеток костного мозга удобно использовать модифицированный метод Форда и Воллама.

Подопытным животным за 1 час 15 минут до забоя внутрибрюшинно вводят 0,04% раствор колхицина из расчета 0,01 мл/г на каждое животное. При забое вычленяют бедренную кость, срезают эпифизы и шприцем, наполненным предварительно нагретым в термостате до 37° хлористым калием вымывают костный мозг в центрифужную пробирку и помещают на 10 минут в термостат, затем в холодильник с последующим центрифугированием при 500—1000 об/мин. в течение 3-х минут. После отсасывания пастеровской пипеткой надосадочной жидкости добавляют фиксатор—метанолуксусный спирт (3 : 1) и, проведя через t°=0+3° (10 минут), вновь центрифугируют. Сливают надосадочную жидкость и ресуспензируют осадок со свежим фиксатором. Затем капли суспензии раскапывают на охлажденные стекла. Стекла прово-

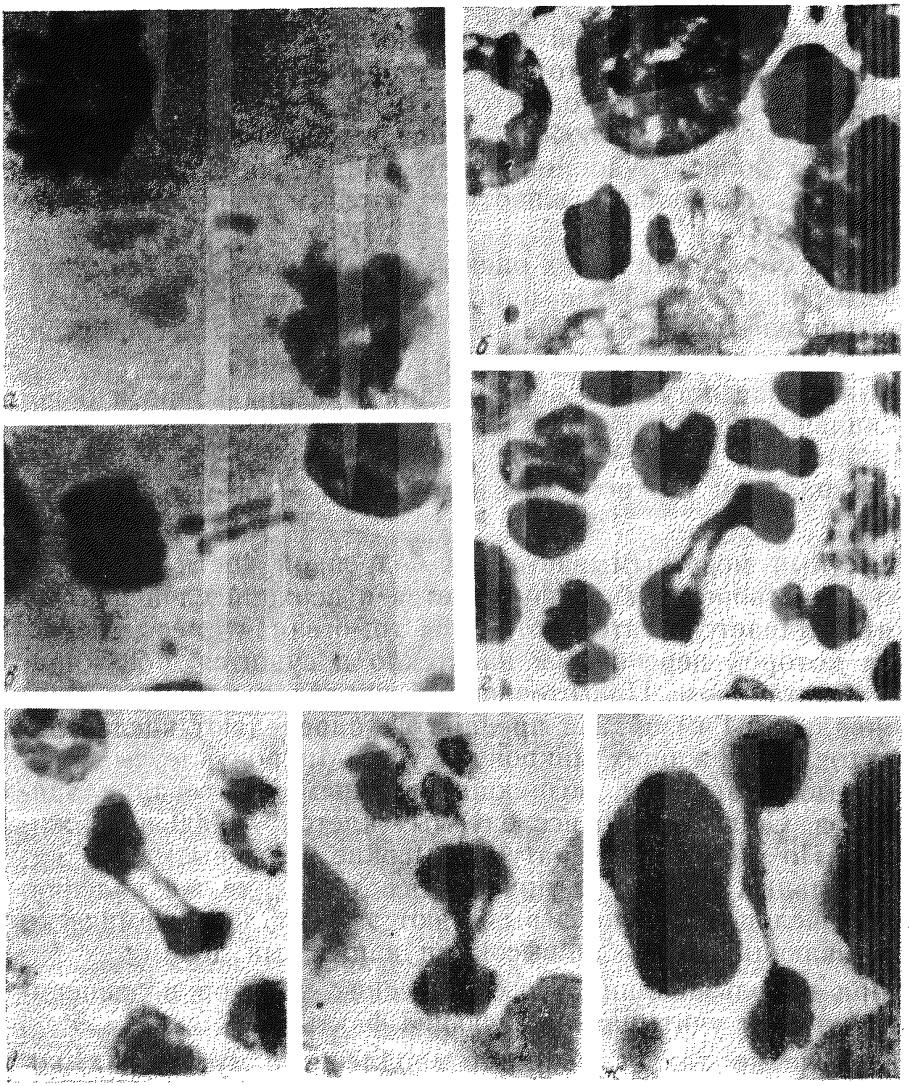


Рис. 7. Различные типы ядерных нарушений в клетках костного мозга мышей при воздействии химического агента: а) фрагменты; б) хромосомный конгломерат; в) отставание хромосом; г, д, е) хромосомные мосты; ж) слипание.

дят над горелкой до полного сгорания фиксатора и окрашивают ацетоорсеином.

Для того, чтобы не использовать в эксперименте лишнюю партию животных возможно вносить колхицин в хлористый калий (5γ колхицина на 100 см^3 KCl) и этим раствором вымывать костный мозг, однако при такой модификации количество метафазных пластинок уменьшается.

При метафазном анализе учитывают нарушения хроматидного и хромосомного типов.

Для профилактической токсикологии анафазный анализ удобен, благодаря простоте и малой затрате времени при приготовлении препаратов, что позволяет провести исследования практически на любом количестве животных. Метафазный метод более трудоемок; требует отдельной партии подопытных и контрольных животных, в связи с введением колхицина.

Таким образом, в целях оценки мутагенного действия анафазный анализ наиболее приемлем. Применение метафазного анализа в промышленной токсикологии целесообразно для уточнения уровней пороговых концентраций.

Одним из доступных методов для решения вопроса о потенциальной опасности химических мутагенов является метод «Mikronucleus test». Микронуклеарный метод проводится с использованием костного мозга мышей 4—6 недельного возраста.

Костный мозг вымывается из бедренной кости гипотоническим раствором, центрифугируется и верхний слой центрифугата сливается. Затем готовится гомогенная смесь клеток, капля которой переносится на стекло и сушится, обезжиривается метанолом. Приготовленный препарат красится Май-Грюнвальдом-Гимзой. На препаратах определяют число эритроцитов, содержащих микронуклеусы. Микронуклеусы—хромосомные фрагменты, возникшие во время созревания эритроцитов. Общее число исследуемых клеток — 2000 на 1 животное. По данным литературы высокие дозы вызывают парадоксальный эффект, а при низких дозах те же явления, что и у человека, средние вызывают эффект логарифмически укладывающийся между высокими и низкими дозами.

При использовании цитогенетических методов в эксперименте следует учитывать следующие факты:

1. Явление так называемого продленного мутагенеза, когда выход хромосомных перестроек наблюдается не сразу после однократного воздействия ,а в отдаленные периоды (через 3—14 дней);

2. При хроническом воздействии к концу эксперимента может наблюдаться нормализация цитогенетических показателей при резко выраженной мутагенной активности в ранние сроки интоксикации. Срок наиболее выраженного цитогенетического эффекта индивидуален для каждого яда и уровня воздействия, но обычно приходится на первую половину хронического воздействия. Из сказанного следует, что цитогенетический эффект; подобно показателям токсического действия,

должен исследоваться в динамике. Схема изучения мутагенного действия представлена в приложении № 2.

Таблица 4

Спонтанный уровень хромосомных повреждений в клетках костного мозга белых крыс при цитогенетическом анализе (на стадии ана-телофазы)

Сезоны	Количество животных	Количество проанализированных клеток	Кол-во клеток с истинными аберрациями	Колич-во клеток со слипаниями	Общее количество клеток с нарушениями (аберрации + слипания)	Митотический индекс
	n	n	M±m	M±m	M±m	M±m
Зима	106	31 800	—	—	3,44±0,13	1,86±0,05
Весна	49	14 700	—	—	3,67±0,18	1,58±0,08
Лето	62	18 600	—	—	3,38±0,17	1,67±0,09
Осень	43	14 900	—	—	4,7±0,21	1,85±0,07
Среднегодовая	260	80 000	2,76±0,09	1,43±0,04	3,79±0,09	1,72±0,03

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, общим принципом построения эксперимента при исследовании отдаленных типов воздействия следует считать принцип одновременного исследования подопытных животных, как по показателям специфического, так и по показателям токсического действия химических соединений.

Изучение химического мутагенеза с позиций гигиенического нормирования должно внести вклад в решение проблем онкологической заболеваемости и старения человека; в предупреждение опасности воздействия на репродуктивную функцию человека и развитие потомства.

Для решения вопроса о гигиенической значимости полученных результатов необходимо проведение комлексных исследований мутагенного и гонадотропного действия изучаемого соединения.

При изучении эмбриотропного действия химических веществ обязательным является исследование состояния материнского организма с помощью интегральных и специфических методов для данного яда. Методы определения до-, пост- и общей эмбриональной смертности, веса и размера плодов, изучение эмбрионов с помощью метода Вильсона достаточно хорошо позволяют оценить влияние яда на развитие яйцеклетки и плода. Изучение постнатального развития

потомства также представляется важным, так как пороки развития и функциональная неполноценность различных органов и систем часто выявляется после рождения.

Рассмотренные принципы не охватывают все стороны изучения гонадотропного, эмбриотропного и мутагенного действия промышленных ядов с целью их гигиенического нормирования. Дальнейшее развитие указанной области исследований представляется весьма перспективным.

СЛОВАРЬ ТЕРМИНОВ
(по М. Е. Лобашеву, 1967)

1. Аллель — один из двух (или нескольких) генов, расположенных в одном и том же локусе гомологичных хромосом и детерминирующих один и тот же наследственный признак.
2. Ген — участок хромосомы, несущей информацию, соответствующую определенному наследственному признаку.
3. Геном — совокупность генов в гаплоидном наборе (гаплоидным набором хромосом называют такой набор, в котором из каждой пары гомологичных хромосом представлена одна).
4. Генотип — совокупность генов данного организма.
5. Гомозигота — константные формы, по данному признаку не дающие расщепления в последующих поколениях.
6. Гетерозигота — формы по данному признаку, дающие расщепление в последующих поколениях.
7. Гомологичные (хромосомы) — парные хромосомы, одна из которых происходит от материнского организма, а другая от отцовского, как правило, морфологически не отличимые.
8. Делеция — аберрация, в результате которой происходит потеря части хромосомы.
9. Доминантность—рецессивность — альтернативное состояние одного и того же гена, где доминантный проявляющийся признак подавляет признак рецессивный, последний может проявить свое действие только в гомозиготном состоянии.

10. Кариотип — совокупность особенностей хромосомного комплекса, касающихся числа и формы хромосом.

11. Локус — определенное, строго фиксированное вдоль по хромосоме месторасположение гена.

12. Мутация — наследуемое изменение какого-либо свойства живого организма, возникающее в результате изменения первичной структуры определенных участков ДНК. Мутация возникает либо спонтанно, либо в результате воздействия различных химических веществ или физических факторов.

13. Рецессивность — см. доминантность.

14. Фенотип — совокупность свойств организма, обусловленных проявлением генотипических признаков в определенных условиях среды.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Н. П. Бочков, Ю. С. Демин, Н. В. Лучник.** Генетика. 1972, 5, 133.

2. ВОЗ., 1967. Серия технических докладов, 333. Химия и физиология гамет. Женева, 1968.

3. ВОЗ., 1967. Серия технических докладов № 364. Принципы испытания лекарственных средств на тератогенность. Женева, 1968.

4. **Дыбан А. П., Баранов В. С., Акимова И. М.** Архив анат., гист., эмбр., 1970, 10, 89.

5. **Егорова Г. М., Иванов Н. Г., Саноцкий И. В.** В кн.: Токсикология новых промышленных химических веществ, в 8, Л., 1966, 33.

6. **Лобашов М. Е.** Генетика. ИЛУ, 1967.

7. **Милованов В. К.** Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. М. Г. ИСХЛ, 1962.

8. **Цанев Р. Г., Марков Г. Г.** Биохимия клеточного деления, М. 1963.

9. **Шергин Н. П.** Цит. по **В. К. Милованову.** Биология воспроизведения и искусственное осеменение животных. М., 1962, 462.

10. **Clermont J., Leblond C. P., Messier B.** Arch. Anat. Mier., Morphol. exper., 1959, 48, 37—56.

11. **Dawson A. B.** Stain. Technol., 1926, 1, 123.

12. **Fogg L. C., Coming R. F.** Cancer Res., 1951, 11, 23.

13. **Ford E. H. R., Wallam D. H. M.** Stain Tehnology, 1963, 38, 5, 271.

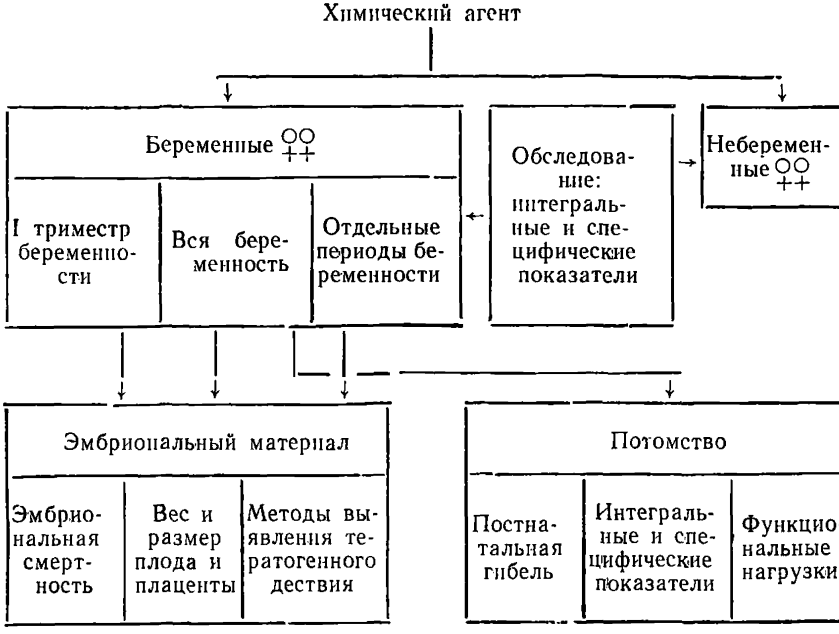
14. **Mandl, Zuckerman S. F.** Endocrinol., 1952, 84, 343.

15. **Mandl, Zuckerman S. F.** Endocrinol., 1951, 7, 2, 103.

16. **Robson I. M., Sullivan F. M.** Teratology. In the bock: Modern Trend in Toxicology. (Editors by E. Boyland and B. Coulding). New York, 1968.

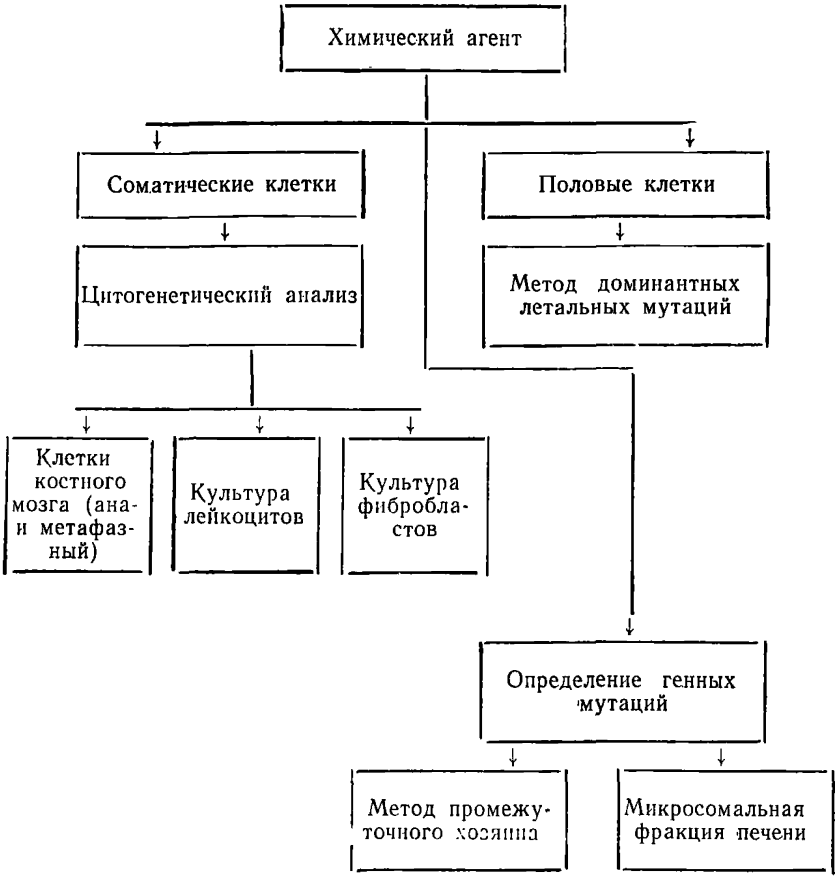
17. **Wilson I.** Teratology. Principles and Techniques. New York, 1965.

Схема изучения эмбриотропного действия *



* Цитировано: Л. С. Сальникова, Г. А. Шевелева, В. Н. Фоменко, 1972 г.

Схема изучения мутагенного действия промышленных ядов



[illegible] 16/XI-1977 г. Зак. 270 Тир. 500

Типография Министерства здравоохранения СССР

gost.e-ecolog.ru