МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

ПО ИЗУЧЕНИЮ ГОНАДОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ГИГИЕНИЧЕСКОМ НОРМИРОВАНИИ В ВОДЕ ВОДОЕМОВ.

Москва, 1981 г.

gost.e-ecolog.ru

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ СССР

ГЛАВНОЕ САНИТАРНО-ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ УПРАВЛЕНИЕ

«УТВЕРЖДАЮ»
Начальник Главного
санитарно-эпидемиологического
управления Минздрава СССР
В. Е. Ковшило
5 ноября 1981 г.
№ 2492-81

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ ПО ИЗУЧЕНИЮ ГОНАДОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ ПРИ ГИГИЕНИЧЕСКОМ НОРМИРОВАНИИ В ВОДЕ ВОДОЕМОВ.

Москва, 1981 г.

Методические указания предназначены для научно-исследовательских институтов гигиенического профиля, гигиенических кафедр медицинских ВУЗов, отделов и лабораторий по охране окружающей среды различных министерств и ведомств. Они могут быть использованы работниками санитарно-эпидемической службы при оценке возможного влияния загрязнений водоемов на здоровье населения.

Методические указания определяют область применения и использования методов оценки гонадотоксического действия химических веществ для целей повышения надежности исследований по обоснованию ПДК в воде водных объектов этих веществ.

Методические указания разработаны под руководством д. м. н., профессора Г. Н. Красовского коллективом авторов: д. м. н. проф. Г. Н. Красовским, к. м. н. З. И. Жолдаковой, к. м. н. С. П. Варшавской, (Ин-т общей и коммунальной гигиены им. А. Н. Сысина АМН СССР); к. м. н. А. А. Королевым, д. м. н. В. Т. Мазаевым, к. м. н. Т. Г. Шлепниной (I Московский медицинский ин-т им. И. М. Сеченова); к. м. н. Р. А. Рязановой (Московский научно-исследовательский ин-т гигиены им. Ф. Ф. Эрисмана); к. м. н. В. Н. Фоменко, к. м. н. В. И. Глущенко (Ин-т гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР) с использованием материалов следующих авторов: к. м. н. М. М. Авхименко, к. м. н. В. И. Антоновой, к. м. н. Е. Г. Берлинер, д. м н. Т. И. Бонашевской, к. м. н. Л. И. Борисова, м. н. с. А. В. Вотякова, к. б. н. Т. Г. Ламентовой, к. м. н. В. Г. Надеенко, м. н. с. Л. Н. Тишовой, ст. лаб. Л. Б. Троснкиной, д. м. н. Б. М. Штабского, д. м. н., проф. Е. В. Штанникова.

Методические указания подготовлены для публикации инспектором — врачом ГСЭУ МЗ СССР Б. М. Кудрявцевой.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время в СССР разработана научно обоснованная система методических приемов установления ПДК, в которой изучению отдаленных последствий действия химических веществ уделяется особое внимание. Экспериментальное изучение отдаленных последствий воздействия на организм химических веществ стало необходимым элементом их токсиколого-гигиенической оценки.

Поражения половых желез могут приводить к нарушению оплодотворяющей способности, способности к зачатию, к изменениям нормального внутриутробного развития плода и развития последующего поколения, а также к появлению мутаций как в соматических, так и в зародышевых клетках, что и является критерием безусловного вредного действия химических веществ на теплокровный организм.

В литературе в настоящее время имеется достаточно данных, свидетельствующих о возможности вредного влияния химических веществ на гонады (И. В. Саноцкий, В. Н. Фоменко; Г. Н. Красовский с савт.; Е. М. Чиркова и др.). Это может быть следствием как общетоксического действия химических веществ, так и проявлением специфического гонадотоксического эффекта. Поэтому для выявления потенциальной и реальной опасности гонадотоксического действия химических веществ при их гигиеническом нормировании требуется проведение соответствующих исследований.

Однако при выполнении этих исследований нередко возникают трудности методического характера (выбор тест-объекта, доз, продолжительности эксперимента, количественная оценка возникающих изменений и т. д.), успешному преодолению которых и призваны способствовать «Методические указания».

Подготовка настоящих указаний была обусловлена также специфическими особенностями гигиенического нормирования в области гигиены воды. Поэтому, несмотря на то, что за последние годы вышел ряд документов по данной проблеме

(«Методические указания по гигиенической оценке новых пестицидов, Киев, 1969»; «Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования» № 1744-77, М., 1978), требовалось создание самостоятельного документа, поскольку принцип этапности, используемый при гигиеническом изучении нормируемых веществ (по органолептическому, общесанитарному и токсикологическому признакам вредности), позволяет в ряде случаев существенно сократить или вообще отказаться от проведения длительных токсикологических исследований, в том числе и изучения гонадотоксического действия.

В соответствии с этим же принципом предусмотрено деление рекомендуемых методов на обязательные, дополнительные и специальные. Кроме того, специально выделен раздел изучения влияния химического фактора воды на состояние репродуктивной функции у людей.

Настоящие методические указания, составленные на основе накопленного опыта последних лет, должны способствовать внедрению в практику гигиенического нормирования химических веществ в воде водных объектов современных методов выявления гонадотоксического эффекта изучаемых соединений и унификации схемы исследований, что обеспечит получение сравнимых результатов.

I. ОБЩИЕ ТРЕБОВАНИЯ К ПРОВЕДЕНИЮ ИССЛЕДОВАНИЙ ПО ОЦЕНКЕ ГОНАДОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ.

При экспериментальном обосновании ПДК химических веществ в воде водных объектов наряду с изучением общетоксического действия обязательным элементом исследований является оценка гонадотоксического действия веществ. Исследования по оценке общетоксического действия химических веществ осуществляются в соответствии с «Методическими указаниями по разработке и научному обоснованию ПДК вредных веществ в воде водоемов» (М., 1976).

1.1. Принципы изучения гонадотоксического действия химических веществ.

При изучении гонадотоксического действия химических веществ при их гигиеническом нормировании необходимо руководствоваться следующими принципами:

— возможность моделирования гонадотоксического эффекта на лабораторных животных;

— зависимость в проявлении гонадотоксического эффекта от дозы и времени воздействия вещества;

— пороговость гонадотоксического действия химических веществ;

— этапность исследований при сочетании функциональных, биохимических и морфометрических методов оценки гонадотоксического действия химических веществ;

— приоритетность выбора методов оценки гонадотоксического действия химических веществ на основе следующей классификации: обязательные, дополнительные и специальные для углубленных исследований.

Допустимо в качестве критерия вредности гонадотоксического действия химических веществ использовать косвенные показатели морфо-функционального состояния гонад.

1.2. Выбор адекватной модели для изучения гонадотоксического действия химических веществ.

Несмотря на известную ограниченность данных относительно правомерности межвидовых экстраполяций, вопрос о возможности и допустимости переноса результатов экспериментальных исследований на животных по оценке гонадотоксического действия химических веществ на человека следует считать решенным положительно. Основанием для такого вывода является:

— сходный механизм действия химических веществ на гонады животных и человека;

— однотипный характер функциональных, биохимических и морфометрических изменений в гонадах животных и человека.

В качестве адекватной модели могут быть использованы спонтанно овулирующие животные, такие как мыши (SHK, гибридные мыши) и крысы (Wistar, беспородные).

II. ЭТАПНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЙ И ВЫБОР МЕТОДОВ ОЦЕНКИ ГОНАДОТОКСИЧЕСКОГО ДЕЙСТВИЯ ХИМИЧЕСКИХ ВЕЩЕСТВ.

Поскольку в комплексе исследований по гигиеническому нормированию раздел изучения гонадотоксического действия химических веществ требует значительной затраты сил и средств, необходимо определить в каких случаях и в каком объеме следует проводить такие исследования.

Эти исследования необходимы:

— для химических веществ, способных в повышенных количествах накапливаться в ткани половых желез;

— для групп соединений, среди которых неоднократно обнаруживались вещества, оказывающие влияние на функцию гонад (тяжелые металлы, органические окиси и перекиси, галлоидопроизводные, фталаты, нитро-аминосоединения, органические растворители и т. д.);

— для мутагенов или близких к ним по химическому строению соединений;

— для новых или малоизученных классов химических соединений.

2.1. Этапы изучения гонадотоксического действия химических веществ.

При проведении исследований следует помнить, что в большинстве случаев гонадотоксическое действие химических веществ есть одна из форм проявления из общетоксического действия. И лишь небольшое число соединений избирательно влияет на функцию гонад. Поэтому изучение гонадотоксического действия рекомендуется проводить в три этапа, из которых первый является обязательным, а два других — дополняющими и уточняющими (таблица 1).

Если при проведении обязательных исследований с веществом в условиях подострого опыта (1 этап) с использованием рекомендованных методов оценки (таблица 2) не обнаружено влияние изучаемого вещества на гонады в дозах более чем на порядок превышающих дозу по общетоксическому эффекту, этот раздел исследования из дальнейших экспериментов исключается.

Если в подостром эксперименте действие на гонады выявлено на уровне порога общетоксического действия или в пределах одного порядка выше, осуществляется переход ко 2-му этапу.

Если МНД, установленная в хроническом опыте по гонадотоксическому действию, на порядок или более превышает МНД, установленную по общетоксическому действию, дополнительных исследований по оценке гонад не проводят.

Таблица 1

Схема этапности исследований гонадотоксического действия химических веществ при гигиеническом нормировании.

Этапы исследования	Характер эксперимента	Методы оценки гонад	Назначение эксперимента
I — обязательный	Подострый опыт, 1—1,5* мес.	Функциональные, морфометрические.	Определение степени выраженности общетоксического и гонадотоксического эффекта на основе соотношения пороговых доз подострого эксперимента.
II — дополняющий	Хронический опыт, 5—6 мес.	Функциональные, морфометрические, биохимические.	Установление порогов общетоксического и гонадотоксического действия.
III — уточняющий	Специальный эксперимент не менее 6 мес.	Наряду с физиологическими, морфометрическими используются специальные методы.	Уточнение порогов общетоксического и гонадотоксического действия.

* **Примечание.** Однако есть обоснованное мнение о необходимости проведения исследований после полного цикла сперматогенеза (2—2,5 мес. для крыс; 1—1,5 мес. для мышей).

В случае совпадения этих эффектов по уровню МНД необходимо провести специальные исследования с использованием методов (III этап) и доз, на 1—2 порядка ниже МНД, установленной в хроническом опыте по общетоксическому действию.

Животные, на которых ставят опыты по изучению гонадотоксического действия, должны содержаться на полноценной диете, поскольку проявления авитаминоза (особенно авитаминоза Е) могут привести к искажению результатов эксперимента. Использование проросшего овса, выращенного гидропонным методом, не рекомендуется из-за возможности грибковых заболеваний.

Все функциональные и морфометрические исследования гонад должны проводиться не менее чем на 6 животных (желательно 8—10) из каждой опытной и контрольной группы. Забой животных должен осуществляться последовательно, по одному животному из каждой группы.

2.2. Методы оценки гонадотоксического действия химических веществ.

В зависимости от этапа изучения влияния химических веществ на гонады следует применять различные методы исследования: функциональные, морфометрические, биохимические, специальные.

Рекомендуемые методы оценки гонад приведены в таблице 2.

Таблица 2

Методы оценки гонад.

Семенники	Яичники
1	2
Обязательные методы	
Функиональные	**Функциональные**
1. Подвижность сперматозоидов, мин. 2. Количество сперматозоидов, млн. 3. Осмотическая резистентность (% р-ра NaCl). 4. Кислотная резистентность, pH. 5. Дегенеративные формы, %. 6. Проба с метиленовой синей.	1. Изучение эстрального цикла (цитологическая картина влагалищных мазков).
Морфометрические	**Морфометрические**
1. Масса семенников, гр. 2. Коэффициент массы.	1. Масса яичников, гр. 2. Коэффициент массы.

1	2
Дополнительные методы	
Функциональные	**Функциональные**
1. Оплодотворяющая способность.	1. Определение активности гонадотропных гормонов в крови или гипофизе. 2. Способность к зачатию.
Морфометрические*	**Морфометрические**
1. Индекс сперматогенеза.	1. Примордиальные фолликулы и фолликулы с одним слоем гранулезных клеток.
2. Канальцы со слущенным эпителием, %**.	2. Фолликулы с двумя и более слоями гранулезных клеток.
3. Канальцы с 12-ой стадией мейоза, %.	3. Атретические тела.
4. Нормальные сперматогонии (в абсолютных цифрах)**.	4. Желтые тела.
Биохимические	**Биохимические**
1. Определение активности β-галактозидазы в тканях гонад и в суспензии сперматозоидов, полученной из эпидидимиса.	1. Гистохимические реакции на РНК, ДНК и липиды.
2. Определение суммы нуклеиновых кислот в гомогенатах семенников.	
3. Гистохимические реакции на РНК, ДНК и липиды.	
4. Содержание гиалуронидазы в сперматозоидах.	
Специальные методы	
1. Определение количества релизинг-фактора гипоталямуса (самцы).	1. Определение количества релизинг-фактора гипоталямуса (самки).
2. Люминесцентный анализ сперматозоидов.	2. Гистохимическое изучение специфических (стероидные дегидразы и гидрооксилазы) и неспецифических (щелочная и кислая фосфатазы, АТФ-аза) ферментов.
3. Микрофлуорометрическое определение нуклеиновых кислот в сперматозоидах.	
4. Метод Джексона (последовательного спаривания).	

Исследование состояния потомства 1-го поколения животных.

* В большинстве случаев в эксперименте оказываются более чувствительными, чем функциональные показатели.

** Наиболее чувствительные (Е. М. Чиркова, 1970).

Ниже приводится описание методов оценки гонад, причем более подробно излагаются методы, выполнение которых обязательно во всех случаях изучения гонадотоксического действия химических веществ.

2.2.1. Методы изучения функционального состояния сперматозоидов (Обязательные).

Исследования проводятся по методике Е. К. Милованова (1966), в модификации Г. М. Егоровой, (1966) используя суспензию сперматозоидов, полученную 2-х мин. экстрагированием (ручное помешивание стеклянной палочкой) продольно рассеченного придатка семенника в 10 мл физиологического раствора.

Подвижность сперматозоидов оценивается качественно и количественно. Для качественной оценки возможно использование балльной системы.

0 —движение отсутствует,

1 — колебательные движения на месте,

2 — медленные поступательные движения.

В связи с тем, что сперматозоиды получены из разрезанного эпидидимиса, а не в результате эякуляции, во взвеси отсутствуют или находятся в недостаточном количестве энергетические материалы, обеспечивающие активную и продолжительную подвижность. На основании сказанного при регистрации наблюдается состояние этого показателя, соответствующего 0 и 1 баллам. Число сперматозоидов с подвижностью 2 балла и продолжительность таковой незначительны.

При количественной оценке подвижности проводится регистрация продолжительности двигательной активности. Для этого каплю суспензии наносят на специальное предметное стекло с углублениями и микроскопируют с получасовыми интервалами. Для предупреждения высыхания препарат необходимо помещать во влажную камеру. Обычно оценивается время до полного прекращения движения всех сперматозоидов.

Возможно оценивать время перехода одной стадии движения в другую.

Наблюдения за подвижностью сперматозоидов проводятся каждые 5—7 минут. Цель исследований заключается в определении времени, в течение которого активность сперматозоидов снижается до 1-ой стадии. Длительность изменения подвижности сперматозоидов до 1-ой стадии расчитывается в минутах на основании трех параллельных проб.

Для подсчета **количества сперматозоидов** суспензию набирают в смеситель для лейкоцитов до метки и разбавляют

физраствором в соотношении 1 : 20, заполняют счетную камеру Горяева. В 5-ти больших квадратах подсчитывают количество сперматозоидов, одновременно фиксируя неподвижные сперматозоиды. Некоторые предлагают использовать также целлоскоп или любой счетчик частиц крови типа ЦГ-2 (ГДР).

Подсчет относительного количества **дегенеративных форм сперматозоидов** производят путем нанесения капли суспензии на предметное стекло, подсушивают метанолом и окрашивают в течение 10 мин. по Романовскому-Гимза, промывают водой и микроскопируют с иммерсионным объективом и окуляром×10 (×15), для исследования сперматозоидов животных можно использовать увеличение 15×40. Количество дегенеративных форм просчитывают на 500 сперматозоидов и результат выражают в относительных единицах (в %%).

Определение **кислотной резистентности сперматозоидов** проводится на часовом стекле, на которое помещают 1,5 мл суспензии. Затем по каплям прибавляют 0,1 N раствор соляной кислоты до полной остановки движения сперматозоидов, которая наблюдается под микроскопом. При этом регистрируется реакция pH (с помощью pH-метра с микроэлектродом).

Для определения **осмотической резистентности сперматозоидов** готовится шкала растворов хлорида натрия от 1,5 до 3,75% с интервалом 0,25% (штатив с пробирками). На предметные стекла с лунками помещают по 0,05 мл суспензии и вносят поочередно из каждой пробирки равное количество раствора, устанавливая концентрацию при которой под микроскопом наблюдается полная остановка сперматозоидов.

Проба с **метиленовой синей** проводится путем смешивания 2 капель 0,01% раствора метиленовой синей с 2 каплями суспензии сперматозоидов на предметном стекле. Смесь засасывают в стеклянную трубочку диаметром 1 мм, длиной 20 мм. Трубочки раскладывают на белой бумаге и отмечают время обесцвечивания середины столбика смеси. Время обесцвечивания пропорционально количеству сперматозоидов и интенсивности их дыхания.

2.2.2. Методы изучения функционального состояния яичников. (Обязательные).

Функция яичников определяется показателями, характеризующими состояние экстрального цикла и количественной оценкой структурных элементов. Продолжительность эстрального цикла у белых мышей и крыс составляет 4—6 дней.

Эстральный цикл связан с циклическими изменениями, происходящими в яичниках в связи с развитием фоллику-

лов, овуляцией и образованием желтых тел. Каждой стадии цикла соответствует определенная цитологическая картина влагалищных мазков, по которой можно судить о функциональном состоянии яичников.

Мазки берут глазной пипеткой или глазной палочкой в одно и то же время суток («правило одного часа»), наносят на стекло, фиксируют спиртом, окрашивают азур-эозином (или метиленовой синей), разбавляя 10 мл насыщенного раствора красителя до 100 мл дистиллированной водой) и микроскопируют. Цитологический анализ позволяет определить среднюю продолжительность эстрального цикла, длительность отдельных фаз. Анализируют продолжительность 2-х циклов подряд с 10—20 дневным перерывом (в хроническом эксперименте) во избежания развития вагинитов.

Выделяют 4-е стадии цикла: эструс (течку), метаэструс (послетечку), диэструс (межтечку) и проэструс (предтечку).

Для стадии **эструса** характерны ороговевшие чешуйки, образующие скопления. Ядросодержащие клетки и лейкоциты фактически отсутствуют. Полное отсутствие слизи.

Стадию **метаэструса** характеризует большое разнообразие цитологической картины. Среди дескваминированных безъядерных чашуек обнаруживаются округлые, крупные ядросодержащие клетки и большое количество лейкоцитов, слипшихся в комки, напоминающие виноградные гроздья.

Для стадии **диэструса** характерно обилие слизи. В мазке обнаруживаются большое количество лейкоцитов, умеренное количество ядросодержащих клеток.

В стадии **проэструса** отмечается резкое уменьшение количества слизи, полное отсутствие лейкоцитов. В поле зрения масса ядросодержащих клеток. Для этой фазы характерны своеобразные клетки треугольной формы с эксцентрическим расположением ядра.

Для дифференциальной диагностики овариального и гипофизарного повреждения помимо эстрального цикла следует определять **активность гонадотропных гормонов в гипофизе или крови.**

Активность гонадотропных гормонов определяется методом биологического тестирования. Показателем активности фолликулостимулирующего гормона служит изменение массы матки и яичников у инфантильных животных, а лютеинизирующего—изменение содержания аскорбиновой кислоты в яичниках неполовозрелых животных.

Для оценки гонадотропной активности гипофиза готовят взвесь гомогенатов гипофизов подопытных животных, забитых на стадии диэструса. Гипофизы растирают в ступке с

физраствором из расчета 2—3 мл на 1 гипофиз (хранить в холодильнике), центрифугируют в течение 15 мин. при 3000 об/мин. Центрифугат в количестве 0,5—1,0 мл вводят подкожно в течение 3-х дней неполовозрелым крысам-самкам весом 45—50 г или мышам весом 3,5—4,0 г. Контрольным животным вводят физраствор в аналогичном количестве. Через 24—48 часов после последней инъекции животных забивают, взвешивают матку и яичники. По изменению массы этих органов и наличию блютпунктов судят об активности гонадотропной реакции гипофиза. Контролем служат: 1) животные-реципиенты, получавшие эмульсию от контрольных животных; 2) животные, не получавшие гипофизарной эмульсии.

2.2.3. Методы морфологического (макроскопического) изучения семенников и яичников (Обязательные).

Проводят наружный осмотр гонад с целью выявления нарушений кровообращения, воспалительных изменений, дистрофии (атрофии) и аномалий. Определяются размеры гонад, устанавливается их масса, рассчитываются относительные коэффициенты по отношению к массе тела (в %%).

2.2.4. Морфометрические методы оценки гонад.

Морфометрические методы (табл. 2) фактически позволяют определить пороги вредного действия изучаемых соединений на гонады.

Оценка сперматогенеза.

Для микроскопического исследования сперматогенного эпителия семенники фиксируют в 15% растворе формалина или жидкости Карнуа (ледяная уксусная кислота и этанол 1 : 3), заливают предпочтительно в парафин, делают срезы 6—7 микрон и окрашивают гематоксилин-эозином.

Индекс сперматогенеза* подсчитывается по 4-х балльной системе Фогга и Коуинга (1954). Учитывают в канальцах (увеличение ×140—200 раз) наличие сперматогоний, сперматоцитов 1 и 2-го порядка, сперматид и сперматозоидов. Индекс сперматогенеза высчитывают по формуле: $\frac{A}{100}$, где A — число стадий в каждом канальце, 100 — число подсчитанных канальцев (Н. Н. Нуждин, Н. М. Шапиро, 1959).

* Малочувствительный показатель.

Количество **канальцев со слущенным сперматогенным эпителием** находящимся в просвете канальца, подсчитывают при просмотре 100 канальцев, выражая в % (увеличение× 200—300 раз).

Количество **нормальных сперматогоний** (первый слой клеток, лежащий на базальной мембране) с регистрацией дегенеративных форм сперматогоний подсчитывают в 20 канальцах и дают в абсолютных цифрах в пересчете на 1 каналец (подсчет ведут со специальной насадкой на окуляр микроскопа).

Число **канальцев с 12-ой стадией мейоза** подсчитывается в 100 канальцах и выражается в %.

Оценка овогенеза.

Количественную оценку структурно-функциональных элементов проводят по методике Mondl a. Zuckerman (1952). Для этого яичники подопытных животных фиксируют смесью Ценкера или Карнуа, заливают в парафин и готовят серийные срезы толщиной 6—7 микрон. Препараты окрашивают гематоксилин-эозином (лучше галоцианин и пирофуксин) и под микроскопом (увеличение×500)подсчитывают количество фолликулов, атретических и желтых тел (по Mondl, Zukerman, 1950).

Зрелые фолликулы, с 2-мя и более слоями гранулезных клеток, атретические тела учитываются в каждом 5-ом срезе и результат умножают на 5. Примордиальные фолликулы и фолликулы с одним слоем гранулезных клеток подсчитываются в каждом 10-м срезе (результат умножают на 10). Желтые тела считают в срединном срезе. При подсчете структурно-функциональных элементов яичника учитывают только те фолликулы, которые содержат ядро с ядрышком. Полученные материалы обрабатывают по формуле: $p = \frac{A \cdot M}{M+z}$

где: p — среднее число ядер,

A — количество ядрышек,

M — толщина среза (мк),

z — диаметр ядрышка (по окулярмикроскопу).

Из гистохимических методов можно применять метод определения в семенниках РНК (по Браше) и ДНК (по Фельгену, Пирс) и липидов путем окрашивания суданом черным Б или суданом III (по Гольдману).

2.2.5. Биохимические методы оценки семенников. (Дополнительные).

Поскольку значительная часть патологии связана с нарушением содержания и структуры ДНК и РНК, желательно провести определение нуклеиновых кислот в гомогенатах семенников.

Для этой цели из семенника берут навеску 100 мг, гомогенизируют в 10 мл 0,2 Н хлорной кислоты и проводят раздельное определение ДНК по реакции дезоксирибозы с дифениламином по Barton (1956) и РНК по реакции рибозы с орцином по Dischеu a. Schwarz (1937).

Определение активности фермента β-галактозидазы в ткани семенника и в семенной жидкости является чувствительным тестом, отражающим оплодотворяющую способность сперматозоидов. Активность этого фермента снижается при действии ряда химических веществ (А. В. Вотяков, 1979 и др.).

Определение активности β-галактозидазы в ткани гонад и семенной жидкости проводится методом Sellinger et al. (1960) или А. А. Покровского с соавт., 1969. Метод основан на спектрофотометрическом определении количества р-нитрофенола, освободившегося в результате ферментной реакции гидролиза р-нитрофенил-β-Д-галактопиранозида натрия.

2.2.6. Специальные методы оценки гонад.

В тех случаях, когда литературные данные свидетельствуют о выраженности влияния изучаемого вещества на гонады, или когда пороговая доза в хроническом опыте по гонадотоксическому эффекту оказалась ниже пороговой дозы по общетоксическому действию, желательно провести углубленные, уточняющие исследования, главным образом для выявления механизмов действия, применяя специальные методы оценки гонад. Перечень этих методов дан в таблице 2.

Среди этих методов есть достаточно простые (люминесцентный анализ сперматозоидов по Н. Николову, 1971; гистохимическое изучение специфических и неспецифических ферментов общепринятыми приемами; определение митотической активности эпителиальных клеток слизистой оболочки матки). Есть весьма сложные, требующие наличия высококвалифицированных специалистов в хорошо оснащенных морфологических и биохимических лабораторий (метод Джексона, цитогенетический анализ сперматогенного эпителия; метод доминантных летальных мутаций).

III. ОЦЕНКА И ФОРМА ПРЕДСТАВЛЕНИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ.

При изучении гонадотоксического (как впрочем и любого другого) действия химических веществ большое значение имеет правильная оценка результатов проведенного исследования, поскольку от этого в конечном итоге будут зависить окончательные выводы и рекомендации. Этому же назначению служит и унификация формы представления результатов исследований.

3.1. Оценка результатов исследований.

Полученные результаты анализируются на основе зависимости «доза-эффект» для каждого этапа исследования. Выясняется степень подчиненности дозовой зависимости по каждому изученному показателю. Устанавливается пороговая доза гонадотоксического действия вещества с учетом комплекса использованных методик и их критериальной значимости.

При оценке результатов исследований прежде всего принимается во внимание нарушение репродуктивной функции под влиянием изучаемого вещества (снижение половой активности, уменьшение способности к зачатию, снижение плодовитости и т. д.). Далее проводится оценка выраженности структурно-функциональных нарушений гонад и сперматозоидов на основании характера изменения морфометрических, биохимических и функциональных показателей состояния гонад и сперматозоидов.

Проводится расчет соотношения пороговых доз по общетоксическому и гонадотоксическому действию. Устанавливается преимущественное действие изучаемого вещества (вид биологического эффекта) и величина МНД для решения вопроса о его ПДК в воде. При необходимости проводится классификация нормируемого вещества по степени потенциальной опасности на основе таблицы 3.

Таблица 3

Классификация потенциальной опасности влияния химических веществ на репродуктивную функцию.

Классы опасности	Зона специфического действия*
Чрезвычайно опасные	$>10{,}0$
Высокоопасные	от 10,0 до 1,0
Умерено опасные	от 1,0 до 0,1
Малоопасные	$<0{,}1$

* Зона специфического действия находится путем деления пороговой дозы по общетоксическому действию на пороговую дозу по специфическому (гонадотоксическому) действию.

3.2. Форма представления результатов исследований.

Результаты исследований должны подвергаться математическому анализу общепринятыми методами математической статистики и представляться в виде таблиц.

Таблица

Изменение показателей функционального состояния сперматозоидов.

Доза мг/кг	Характер опыта	Общее количество, млн.	Подвижность, мин.	Осмотическая резистентность, % р-ра NaCl	Кислотная резистентность, pH	Дегенеративные формы, %

Таблица

Морфологические показатели гонад.

Семенники		Яичники	
Вес, гр.	Весовые коэффициенты	Вес, гр.	Весовые коэффициенты

Таблица

Оценка морфометрических показателей семенников.

Доза мг/кг	Характер опыта	Канальцы со слущенным эпителием, %	Нормальные сперматогонии.	Канальцы с 12-ой стадией мейоза, %	Индекс сперматогенеза

В графе «Нормальные сперматогонии» отмечают наличие или отсутствие патологических форм клеток. + есть; — нет.

Таблица

Оценка структурно-функциональных элементов яичников.

Доза мг/кг	Характер опыта	Количество фолликулов				Желтые тела	Атретические тела
		примордиальных	зреющих	зрелых			
				с яйцеклеткой	без яйцеклетки		

Таблица

Итоговая таблица по оценке гонадотоксического действия химических веществ при гигиеническом нормировании.

МНД общетоксическая	МНД специфическая	ПДК

IV. ПРИЛОЖЕНИЕ

4.1. Изучение состояния репродуктивной функции у людей.

Сопоставление результатов эксперимента с натурными наблюдениями необходимо в тех случаях, когда норматив установлен с учетом гонадотоксического эффекта и есть возможность проверить (сопоставить) этот норматив с объективными данными у людей, имеющих контакт с нормируемым веществом.

Для этих целей проводится клиническое (сексологическое) исследование, с использованием «Метода структурного анализа сексуальных расстройств», что позволяет оценить состояние, так называемых составляющих копулятивного цикла (нейрогуморальной, психической, эрекционной, эякуляторной). В начале обследования обязательно проводится заполнение квантификационной шкалы СФМ, связывающей отдельные половые проявления и позволяющей на 1 этапе обследования ориентироваться в наличии или отсутствии расстройств полового акта (Г. С. Васильченко, 1977).

У мужчин также исследуется сперма. При этом и в опытах со спермой человека in vitro могут быть использованы все описанные выше методы. Рекомендуются прежде всего макро- и микроскопическое исследование.

Микроскопическое исследование спермы включает:

— определение вязкости;
— определение pH;
— определение времени разжижения;
— определение кислотно-осмотической резистентности;
— определение объема эякулята (в норме 3—5 мл).

При оценке спермы по объему необходимо учитывать принятую номенклатуру: спермия — нормальный уровень, функциональный асперматизм — отсутствие спермы, гипоспермия — объем <3 мл, гиперспермия — объем >5 мл.

При оценке функционального состояния сперматозоидов приемлема классификация Kühnelt (1953) в модификации С. А. Кагана.

1. НОРМОЗООСПЕРМИЯ — более 60 млн. сперматозоидов в 1 мл эякулянта.

2. ОЛИГОЗООСПЕРМИЯ — I степени — 60—30 млн. сперматозоидов в 1 мл эякулянта; II степени — 30—10 млн, сперматозоидов; III степени — менее 10 млн. сперматозоидов в 1 мл эякулянта.

3. АЗООСПЕРМИЯ — (аспермия), при которой в эякулянте не обнаруживаются сперматозоиды.

4. НЕКРОСПЕРМИЯ — (акинетическая сперма) — все сперматозоиды неподвижны и не могут быть оживлены.

Следует учитывать, что количество сперматозоидов не имеет решающего значения для оценки качества эякулята, однако, в большинстве случаев количественные изменения влекут за собой качественные изменения как сперматозоидов, так и спермоплазмы (С. А. Каган, 1974).

Астеноспермия — уменьшение подвижных сперматозоидов ниже 75%.

Тератоспермия — увеличение патологических форм сперматозоидов более 20%.

Чрезвычайно важным являются биохимические методы оценки состояния эякулята. К ним относятся: определение содержания фруктозы, гиалуронидазы в эякуляте, радиоиммунная оценка тестостерона и эстрадиола, а также гонадотропинов в сыворотке крови с использованием высокоспецифических антисывороток.

4.2. Некоторые показатели нормы у лабораторных животных.

Таблица 4

Морфометрические показатели семенников в норме у беспородных белых крыс. (По И. В. Саноцкому с соавт., 1972).

Показатели	M±2σ
Индекс сперматогенеза	3,72±0,24
Нормальные сперматогонии	28,9±15,2
Канальцы со слущенным эпителием, %	2,62±2,44
Канальцы с 12-ой стадией; мейоза,	3,2±3,0
Подвижность сперматозоидов, мин.	260±80
Весовые коэффициенты семенников	9,8±0,3

Таблица 5

Продолжительность стадий полового цикла в норме у крыс.

Показатели	Дни
Эструс	1.24
Диэструс	1.76
Проэструс	1.00
Метаэструс	1.65
Средняя продолжительность эстрального цикла	4.0 —6.0

Таблица 6

Характеристика стадий эстрального цикла по цитологической картине влагалищного мазка в норме у крыс.

Стадии	Элементы мазка			
	чешуйки	эпителиальные клетки	лейкоциты	слизь
Эструс	+++	—	—	—
Диэструс	—	+	+++	++
Проэструс	—	+++	—	—
Метаэструс	++	+++	++	—

Обозначения:

+++ обилие.
++ в значительном количестве,
+ в малом количестве,
— отсутствие

ЛИТЕРАТУРА

1. **Арсентьева М. А., Бакулина Э. Д., Ландер Е. Я.** Действие ТиоТЭФ на ядра клеток костного мозга и гонады мышей. «Генетика», 1967, № 5, стр. 111—121.

2. **Васильченко Г. С.** Общая сексопатология. М., 1977.

3. **Вотяков А. В.** Экспериментальное исследование активности ферментов различной локализации в клетке при поступлении хлоропрена с питьевой водой. Сб. Тр. НИИ санитарии и гигиены им. Г. М. Натадзе, 1978, стр. 65—67.

4. **Диксон П.** Проблема экстраполяции экспериментальных данных с животных на человека. В кн.: «Матер. I-го Совет.-амер. симп. по проблеме «Гигиена окружающей среды», М., 1975, стр. 73—87.

5. **Каган С. А.** Стерильность у мужчин. М., 1974.

6. **Красовский Г. Н., Юрасова О. И., Чарыев О. Г., Скрыпников А. И., Варшавская С. П.** Прогнозирование гонадотоксического действия тяжелых металлов по первичному эффекту материальной кумуляции. Ж. «Гигиена и санитария», 1977, № 7, стр. 11—16.

7. **Николов Н., Папазов Б. Р.** В кн.: «Бесплодие в семье», — София, М., «Медицина и физкультура», 1971.

8. **Пирс Э.** Гистохимия. Теоретическая и прикладная. М., «Из-во И. Л.», 1962.

9. **Покровский А. А., Понаморева Л. Г., Тутельян В. А.** Метод определения активности β-галактозидазы. В кн.: «Ферментные методы анализа». Под. редак. В. С. Асатиани. М., «Наука», 1969, стр. 471.

10. **Саноцкий И. В.** (ред.). Методы определения токсичности и опасности химических веществ. М., 1970.

11. **Саноцкий И. В., Фоменко В. Н.** Отдаленные последствия влияния химических соединений на организм. М., «Медицина», 1979.

12. Чиркова Е. М. Изучение сперматогенеза при воздействии минимальных концентраций некоторых промышленных ядов (этиленамина, бензола, четыреххлористого угерода). В кн.: «Материалы конференции молодых научных работников института гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР». М., 1969, стр. 143—144.

13. Jackson H., Robert J. L., Lewe P. Antifertility substances. Pharm. Rev., 1959, 11, 135—172.

14. Mandl, Luckerman S. F., Endocrinol., 1952, 84, 343.

15. Kühnelt H. J. Zbl. Gynäk., 1953, 73, 578.

СОДЕРЖАНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 3

I. Общие требования к проведению исследований по оценке гонадотоксического действия химических веществ 4

1.1. Принципы изучения гонадотоксического действия химических веществ 4

1.2. Выбор адекватной модели для изучения гонадотоксического действия химических веществ 5

II. Этапность исследований и выбор методов оценки гонадотоксического действия химических веществ 5

2.1. Этапы изучения гонадотоксического действия химических веществ 6

2.2. Методы оценки гонадотоксического действия химических веществ 8

2.2.1. Методы изучения функционального состояния сперматозоидов. (Обязательные) 10

2.2.2. Методы изучения функционального состояния яичников (Обязательные) 11

2.2.3. Методы морфологического (макроскопического) изучения семенников и яичников (Обязательные). 13

2.2.4. Морфометрические методы оценки гонад (Дополнительные) 13

2.2.5. Биохимические методы оценки семенников (Дополнительные) 15

2.2.6. Специальные методы оценки гонад 15

III. Оценка и форма представления результатов исследований . 16

3.1. Оценка результатов исследований 16

3.2. Форма представления результатов исследований . . 17

IV. Приложение 19

4.1. Изучение состояния репродуктивной функции у людей . 19

4.2. Некоторые показатели нормы у лабораторных животных 20

Литература 22

Л 79271 от 4/XII-1981 г. Зак. 222 Тир. 500
gost.e-ecolog.ru
Типография Министерства здравоохранения СССР