
ОСОБЕННОСТИ ВОЗДЕЙСТВИЯ ЗОМАНА НА МУЖСКУЮ РЕПРОДУКТИВНУЮ ФУНКЦИЮ

А.А. Масленников

Научно-исследовательский институт гигиены, токсикологии и профпатологии, г. Волгоград

Экспериментальными исследованиями установлено, что избирательное действие зомана на мужскую репродуктивную функцию обусловлено проявлением его мутагенных свойств. С учетом этого раскрыт механизм развития нарушений в мужских гонадах, понимание которого необходимо при проведении соответствующих лечебных мероприятий, применимых при изучении любых соединений со сходными свойствами.

It is established in experimental researches that soman selective impact on male reproductive system is determined by its mutagenic properties displaying. Taking it into account the mechanism of disorders development was discovered in male gonads. Understanding of this mechanism is necessary during conducting of appropriate medical and preventive treatment activities applicable in studying of different chemical compounds with similar properties damaging gonads.

Введение

Проблема возможного развития отдаленных эффектов у человека при контакте с различными химическими веществами является одной из основных в системе профилактической токсикологии.

Среди различных видов отдаленных последствий нарушения репродуктивной функции и изменения наследственных генетических структур являются наиболее значимыми, поскольку отражаются как на состоянии здоровья непосредственно контактирующего, так и влияют на воспроизводимость и полноценность потомства, что влечет за собой определенные негативные последствия.

Особую актуальность, данная проблема приобретает в связи с реализацией процесса уничтожения химического оружия, осуществляемого в соответствии с международной Конвенцией [1].

Принимая во внимание то обстоятельство, что в процессе его уничтожения занят мужской контингент, при разработке мер профилактики отдаленных последствий основное внимание должно уделяться изучению влияния этих химических веществ именно на мужскую половую функцию.

В предварительных исследованиях отравляющих веществ с позиций возможности проявлять отдаленные последствия было установлено, что наиболее выраженными особенностями в данном аспекте и только в условиях длительного воздействия обладает зоман. При этом особый как научный, так и практический интерес представляло сопоставление минимальных уровней воздействия и ниже по общетоксическим критериям и его способности проявлять в равноэффективных уровнях при наиболее реальных путях поступления гонадотоксические эффекты.

Материалы и методы исследования

В качестве основного пути поступления соединения в организм лабораторных животных избран ингаляционный. При этом подопытных особей ежедневно в течение четырех месяцев подвергали 4-часовому ингаляционному воздействию в условиях динамического поступления вещества в 200 литровых камерах Курляндского.

Кроме того, исходя из практических позиций, оценивали возможность загрязнения веществом технологического оборудования, использованного при его уничтожении.

Методические приемы, примененные в данной серии экспериментов, основывались на моделировании возможных реальных условий. При этом учитывалось, что зоман может попасть на кожные покровы лабораторных животных путем контакта с загрязненными данным соединением металлическими пластинами из тех марок стали, которые ранее использовались при производстве и в дальнейшем при уничтожении высокотоксичных соединений. В этой связи в опытах применяли металлические пластины, изготовленные из стали марки X18 H10T без покрытия (оборудование) и покрытые грунтом А-070 и эмалью ЭП-525-РБ (ремонтный вариант). Образцы представляли собой пластины площадью 16 см², изогнутые аналогично кривизне спины крыс. Боковые концы пластин загибали вверх в виде крючков для подвешивания изделий при высушивании их после смачивания в растворе зомана, а также для закрепления на них резиновых полос, фиксирующих пластины на выстриженных участках кожи спины животных.

Выбор размеров пластин обусловлен тем, что при изучении воздействия химических факторов на кожные покровы, согласно общепринятым подходам, участок аппликации должен составлять 5% поверхности тела, что соответствует площади 16 см² кожи спины животного [2]. Все исследования выполнены на крысах.

Загрязнение пластин проводилось жидкофазным способом путем их погружения в спиртовые растворы зомана определенной концентрации, с последующим высушиванием и дальнейшей фиксацией пластин на спине животных.

Контроль за содержанием вещества в растворе проводился холинэстеразным методом [3].

При изучении отдаленных последствий зомана исходили из положения о том, что вредное влияние любого химического вещества может быть обусловлено его воздействием как на гормональную функцию гонад, которая является отражением нейрогуморальной регуляции в системе «гипоталамус – аденогипофиз – семенники» [4], так и на генеративный эпителий семенников и функциональную активность зре-

лых половых клеток, вследствие цитотоксических и мутагенных проявлений.

Основываясь на данных позициях, специфические эффекты воздействия на гонады исследуемых соединений определяли по трем группам показателей.

Первая группа включала в себя показатели, опосредованно отражающие влияние химагента на репродуктивную функцию через нейрогуморальную систему, которую оценивали по способности самцов к спариванию. Кроме того, детально изучали половое поведение животных [5].

Вторая группа содержала тесты по оценке состояния семенников, развивающихся гамет и активности сперматозоидов, применяемые в данного рода исследованиях [6].

Наряду с перечисленным, оценивали способность самцов к репродукции, а также проводили характеристику плодного материала на наличие тератогенных эффектов [7, 8].

В третью группу включены следующие методы по изучению мутагенной активности вещества: тест Эймса в модификации с преинкубацией (генные повреждения), микроядерная проба и метод доминантных леталей (хромосомные абберации, соответственно, в соматических и половых клетках) [9].

Все исследования выполнены на половозрелых белых беспородных 288 мышах (225 самок и 63 самца) и 294 крысах (154 самки и 140 самцов) с исходной массой тела, соответственно: мыши – 18–22 г, крысы – 180–220 г.

Полученные в процессе исследований результаты обрабатывали с использованием критериев достоверности Стьюдента, Фишера. Различия считали достоверными при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Ингаляционное воздействие. Гонадотоксические свойства зомана оценивались в трех концентрациях. Первая соответствовала порогу хронического действия по общетоксическим показателям – $4,9 \cdot 10^{-4}$ мг/м³, вторая – расчетной величине ПДК ($1,05 \cdot 10^{-5}$ мг/м³), третья – на порядок ниже ее ($1,32 \cdot 10^{-6}$ мг/м³).

Таблица 1. Некоторые показатели состояния репродуктивной функции самцов крыс при хроническом ингаляционном воздействии зомана в концентрации $4,9 \cdot 10^{-4}$ мг/м³

Показатели и единицы измерения	Сроки наблюдения			
	в конце периода воздействия		через 1 месяц восстановительного периода	
	опыт	контроль	опыт	контроль
Относительная масса семенников, г/кг массы тела	6,11±0,53**	8,62±0,37 (6,51÷10,70)	7,11±0,36*	8,72±0,50
Время подвижности сперматозоидов, мин	Показатели не могли быть определены		28,5±4,8	24,1±1,9
Осмотическая резистентность гамет, % NaCl			3,20±0,11	3,40±0,08
Подвижные формы сперматозоидов, %			12,1±3,1	25,0±5,1
Кислотная резистентность сперматозоидов, pH			6,95±0,04	6,81±0,06
Количество сперматозоидов в 50 мг ткани придатка, млн.	3,95±0,78*	13,00±2,36	11,53±1,94	14,93±1,54
Индекс сперматогенеза, усл. ед.	2,53±0,25**	3,47±0,03 (3,33÷3,61)	3,41±0,04	3,42±0,02
Количество нормальных сперматогоний в 20 канальцах, усл. ед.	47,6±5,2**	65,0±1,6 (56,2÷73,8)	60,1±1,7	63,3±0,7
Общая гибель эмбрионов, %	25,2* n = 123	10,7 n = 112	19,4 n = 124	22,2 n = 90

Примечание: в этой и последующих таблицах одной звездочкой (*) отмечены достоверные сдвиги при $P > 0,05$, двумя звездочками (**) – изменения, выходящие за пределы бисигмальных отклонений контроля.

Результаты исследований показали, что зоман к концу периода поступления вызывал резкие изменения в гонадах самцов при воздействии в большей концентрации (табл. 1). У животных отмечалось существенное снижение массы семенников и среднего количества нормальных сперматогоний. Кроме того, в гонадах крыс выявлено наличие атрофий и запустение эпителия семенных канальцев, в результате чего установлено резкое снижение общего количества зрелых гамет в их придатках. Токсическое воздействие вещества в указанной концентрации отразилось и на жизнеспособности сперматозоидов, о чем свидетельствовал факт отсутствия их подвижных форм у большинства подопытных самцов.

Вследствие нарушения процессов сперматогенеза, вызревшие гаметы, по-видимому, не являлись полноценными, что отразилось в увеличении общей эмбриональной смертности потомства, превышающей контрольные показатели в 2,5 раза. Действие зомана на гонады в процессе хронического поступления было столь выраженным, что нарушения спермообразующей функции семенников сохранялось и через 1 месяц после прекращения воздействия. Контакт животных с веществом в двух меньших концентрациях не оказывал токсического влияния на репродуктивную функцию животных.

Перкутанное поступление. В данной серии экспериментов применяли две дозы, одна из которых соответствовала расчетному значению ПДУ и составляла $1 \cdot 10^{-6}$ мг/дм², другая – в 20

Таблица 2. Обобщенная характеристика токсического действия зомана в хронических опытах

Способ воздействия	Уровень воздействия	Наличие (+) или отсутствие (-) эффекта по влиянию:					
		на половую функцию		на АХЭ эритроцитов и других тканей		на другие системы	
		Х	В	Х	В	Х	В
Ингаляция	$4,90 \cdot 10^{-4}$ мг/м ³	+	+	-	-	+	-
	$1,05 \cdot 10^{-5}$ мг/м ³	-	-	-	-	-	-
	$1,32 \cdot 10^{-6}$ мг/м ³	-	-	-	-	-	-
Накожно	$1,96 \cdot 10^{-5}$ мг/дм ²	+	-	-	-	-	-
	$1,08 \cdot 10^{-6}$ мг/дм ²	-	-	-	-	-	-

Условные обозначения: Х – период хронического воздействия; В – восстановительный период.

Примечание: оценка указанных эффектов по каждому веществу проводилась в единых экспериментах на одних и тех животных.

раз выше – $2 \cdot 10^{-5}$ мг/дм². В процессе проведения исследований с пластинами установлено, что зоман к концу периода воздействия в большей из доз оказывал отрицательное влияние на процессы сперматогенеза и функциональную активность сперматозоидов, причем характер изменений и их выраженность по ряду показателей были идентичны ингаляционному пути поступления. В частности, у подопытных животных установлено существенное сокращение, с выходом за пределы бисигмальных отклонений контроля, времени подвижности гамет ($52,5 \pm 20,4$ мин в опыте, при $180,7 \pm 22,4$ мин в контроле – $62,8 \div 299,2$ мин), сохранявшееся до конца восстановительного периода. Кроме того, у данной группы крыс достоверно относительно контроля было понижено значение численности сперматозоидов ($8,25 \pm 1,95$ млн. в 50 мг ткани придатка в 1-й опытной группе, $9,63 \pm 1,37$ млн. в 50 мг ткани придатка во 2-й опытной группе и $18,12 \pm 0,50$ млн. в 50 мг ткани придатка в контроле), также выходявшее за пределы двух сигм контроля ($15,45 \div 20,79$ млн.).

При оценке состояния морфоструктур гонад подопытных особей в 25% случаев в 1-й опытной группе выявлено запустение семенных канальцев, охватывающее до 70% общей их численности и достигавшее слоя клеток, находящихся на ранней стадии развития – сперматид. Кроме того, у животных данной группы отмечалось определенное увеличение численности ка-

нальцев с 12-й стадией мейоза. Вторая доза оказалась недействующей.

Следовательно, у данного соединения эффекты хронического действия при ингаляционном и кожном путях поступления в организм практически совпадают.

Оценивая полученные в работе данные, возникает вопрос о значимости выявленных сдвигов в половой функции животных с позиции общепринятых в токсикологии критериев, то есть является ли их действие на гонады избирательным. С этой целью было проведено сопоставление гонадотоксического эффекта с другими эффектами (в первую очередь, с антихолинэстеразным эффектом) в равноэффективных уровнях, в результате чего установлено отсутствие изменений в других органах и системах (табл. 2). При этом следует отметить, что в реализации гонадотоксической активности зомана антихолинэстеразное действие не могло иметь существенного значения, поскольку специфический эффект при указанных уровнях воздействия отсутствовал. Общетоксические эффекты, при сопоставлении с гонадотоксическими, также были менее выраженными. Необходимо заметить, что все отклонения в восстановительном периоде нивелировались, кроме гонадотоксических.

Следовательно, при хронических интоксикациях этим веществом гонадотоксический эффект является ведущим признаком отравления,

отражая избирательность повреждения семенников, которая в свою очередь может быть объяснена более высокой их чувствительностью к токсическому действию ксенобиотика.

На основании проведенных сопоставлений вполне закономерно возникает и другой вопрос: почему зоман проявляет избирательную гонадотоксичность и что лежит в основе механизма повреждения им половой функции животных?

Теоретический анализ возможных причин поражения гонад показывает, что они могут быть обусловлены тремя факторами: влиянием ядов на гормональную регуляцию семенников, прямым повреждающим действием на половые клетки и мутагенностью.

В действии зомана отмеченные первые два фактора могут быть отвергнуты по следующим обстоятельствам. Во-первых, не обнаружено влияния соединения на гормональную регуляцию семенников при его испытании во всем диапазоне примененных концентраций, что подтверждено данными об отсутствии сдвигов со стороны полового поведения и способности к спариванию. Во-вторых, цитотоксическое действие на половые клетки при отравлении данным химагентом за счет общетоксического влияния также не установлено, поскольку гонадотоксический эффект проявлялся в концентрациях, не вызывающих общетоксических или антихолинэстеразных сдвигов. Поэтому для действия зомана правомочным представляется положение о генетическом факторе, как первоначальном «пусковом звене» развития повреждений в гонадах.

Подтверждением этому могут служить результаты, полученные при испытании соединения в прямых пробах на мутагенность (табл. 3).

Как следует из приведенных данных, зоман проявил мутагенную активность на генном

уровне, оцененную, по существующей классификации степени генетических проявлений различных веществ, как средняя. Помимо отмеченного, химагент оказался универсальным мутагеном, поскольку одновременно индуцировал нарушения наследственного аппарата на уровне хромосом, что подтверждено испытаниями в микроядерной пробе.

Кроме того, в условиях хронических экспериментов, где длительное воздействие вещества охватывало мейотические и постмейотические стадии сперматогенеза, интерпретация многих сдвигов в общей картине гомеостаза репродуктивной функции самцов может быть объяснима с позиции теории мутагенеза. Прежде всего, это увеличение эмбриональной гибели. Особое значение в данной группе занимают показатели, характеризующие жизнеспособность и развитие потомства, поскольку воздействие любого химагента может проявляться только опосредованно, через измененную наследственную информацию сперматозоидов, контактировавших с веществом-мутагеном мужских особей. Это касается численности выживших плодов, прямо зависящей от показателей внутриутробной гибели эмбрионов, а также значений показателей, учитывающих частоту врожденных аномалий развития внутренних органов и формирования костной системы плодов.

Кроме того, с позиции мутагенеза следует расценивать увеличение численности канальцев с 12-й стадией мейоза, основная роль которого, как известно, состоит в элиминации клеток с существенным дисбалансом хромосом [9], снижение значений общей численности сперматозоидов и индекса сперматогенеза, поскольку они могут быть связаны с уменьшением количества развивающихся гамет после прохождения ими через вышеупомянутый «мейозный фильтр».

Помимо этого, при оценке мутагенного воздействия ксенобиотика необходимо принимать во внимание и снижение показателя, характеризующего оплодотво-

Таблица 3. Характеристика мутагенных свойств зомана

Вид эксперимента, наличие (+) или отсутствие (-) эффекта			
однократное воздействие			хронический опыт
тест Эймса	микроядерная проба	метод доминантных леталей	метод доминантных леталей
++	+	-	+

ряющую способность самцов, – индекс оплодотворения, так как мутаген на генном уровне может изменять ДНК гамет.

С учетом изложенного, представляется возможным проанализировать воздействие зомана на гонады крыс-самцов с позиции мутагенеза.

Сопоставляя глубину и обширность генетических повреждений, вызываемых зоманом, с гонадотоксическими проявлениями, указанными выше, можно отметить практически равную по степени выраженности для каждого из рассматриваемых эффектов картину повреждений, то есть там, где выраженнее токсическое воздействие соединения на репродуктивную функцию, там, соответственно, и более распространены мутагенные проявления.

Из всего изложенного следует, что первопричиной развития повреждений в гонадах самцов при воздействии зомана является мутагенный фактор.

С учетом выявленных изменений экспериментальное обоснование ПДК и ПДУ зомана при указанных путях поступления проведено именно по гонадотоксическому эффекту.

Выводы

1. Впервые проведена экспериментальная оценка влияния зомана на половую функцию самцов животных в условиях хронических интоксикаций при разных путях поступления и доказана возможность развития гонадотоксических нарушений при длительном его воздействии.

2. Определена степень мутагенной активности соединения, в соответствии с которой зоман отнесен к мутагенам средней силы.

3. Поражение мужской половой функции при воздействии зоманом обусловлено его мутагенными свойствами

4. Обоснована степень опасности воздействия соединения на репродуктивную функцию самцов животных в системе токсикометриче-

ских параметров при его гигиеническом нормировании (обоснование ПДК, ПДУ). Показано, что для зомана повреждения гонад в условиях хронического ингаляционного и перкутанного воздействия являются лимитирующим признаком вредности.

Литература

1. Конвенция о запрещении разработки, производства, накопления и применения химического оружия и о его уничтожении. ОЗХО, 1996.
2. Оценка воздействия вредных химических веществ на кожные покровы и обоснование ПДУ загрязнения кожи: Методические указания. М., 1979, 24 с.
3. *Панюков А.Н.* О применении метода Хестрина для раздельного измерения активности холинэстераз // *Вопр. мед. химии.* 1966. Т. 12, № 1, с. 88–95.
4. *Науменко Е.В., Осадчук А.В., Серова Л.И., Шишина Г.Т.* Генетико-физиологические механизмы регуляции функции семенников. Новосибирск: Наука, 1983, 195 с.
5. *Кирюхин В.Г., Рыженков В.Е.* Сравнительное изучение влияния центральных М- и Н-холинолитиков на двигательные пищевые условные рефлексы и половое поведение крыс-самцов // *Бюл. эксперим. биол. и мед.* 1972. № 4, с. 59–61.
6. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования: Методические рекомендации / НИИ гигиены труда и профзаболеваний АМН СССР. Сост. И.В. Саноцкий, В.Н. Фоменко, И.С. Сальникова и др. М., 1978, 35 с. Утв. 10.07.77, рег. № 1744-77.
7. *Дыбан А.П., Баранов В.С., Акимова И.М.* Основные методические подходы к тестированию тератогенной активности химических веществ // *Арх. анатомии, гистол. и эмбриол.* 1970. № 10, с. 89–100.
8. *Dawson A.B.* A note on the staining of the skeleton of cleared specimens with alizarin red S // *Stain Technol.* 1926. 1, p. 123–124.
9. Методические указания по изучению мутагенной активности химических веществ при обосновании их ПДК в воде / Сост. В.С. Журков, Г.Н. Красовский, З.И. Жолдакова и др. М., 1986, 41 с. Утв. 12.06.86, рег. № 4110-86.