	ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России ЛАБОРАТОРИЯ ТОКСИКОЛОГИИ НАУЧНОГО ЦЕНТРА ИННОВАЦИОННЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ С ОПЫТНО-ПРОМЫШЛЕННЫМ ПРОИЗВОДСТВОМ		
СОП №:	Номер версии:	Число страниц:	
IV/2П-006-2022/3	3	9	
	Дата начала действия версии СОП:	Дата окончания действия версии СОП	
	01.06.2022	01.06.2024	
Наименование СОП:	**Изучение эстрального цикла у крыс самок**		
Составлено/ Пересмотрено:	_____ подпись	25.07.2020/ 25.05.2022_ дата	Т.Д. Денисова
Проверено: Руководитель СОК	_____ подпись	27.05.2022__ Дата	В.Н. Перфилова
Утверждено: Руководитель лаборатории	_____ подпись	30.05.2022__ дата	Л.И. Бугаева
Форма обучения:	чтение ✓	практические занятия	

1. НАЗНАЧЕНИЕ

1.1. ЦЕЛЬ: описание метода определения регулярности и продолжительности эстрального цикла и его фаз у лабораторных животных.

1.2. ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ:

СОП - предназначена научным сотрудникам, выполняющим исследования по репродуктивной токсикологии и является обязательным для изучения.

2. НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

2.1. ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЗАКОН №61-ФЗ «ОБ ОБРАЩЕНИИ ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ» (с изменениями и дополнениями ФЗ от 13.07.2015 N 241-ФЗ и ФЗ от 22.12.2014 N 429-ФЗ в редакции от 13.07.2015)

2.2. Межгосударственный стандарт ГОСТ 33044-2014 «Принципы надлежащей лабораторной практики» (Приказом Федерального агентства по техническому регулированию и метрологии от 20 ноября 2014 г. № 1700-ст межгосударственный стандарт ГОСТ 33044—2014 введен в действие в качестве национального стандарта Российской Федерации с 1 августа 2015 г. Настоящий стандарт идентичен международному документу OECD, Guide 1:1998 (“OECD principles of good laboratory practice”, IDT)).

3. ОТВЕТСТВЕННОСТЬ

За выполнение данной процедуры несет ответственность научный сотрудник (исследователь) лаборатории токсикологии, имеющий соответствующие знания и опыт работы, прошедший обучение по данной СОП.

4. ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

Данная процедура применяется для проведения исследований влияния на функцию яичников у крыс-самок. Эстральный цикл связан с циклическими изменениями секреции гонадотропных гормонов (ЛГ и ФСГ), что обеспечивает протекание в яичниках ритмически повторяющихся процессов – рост и развитие фолликулов, овуляция и образование желтых тел. Каждой стадии цикла соответствует определенная цитологическая картина влагалищных мазков, по которой можно судить о функциональном состоянии яичников (рисунок 1).

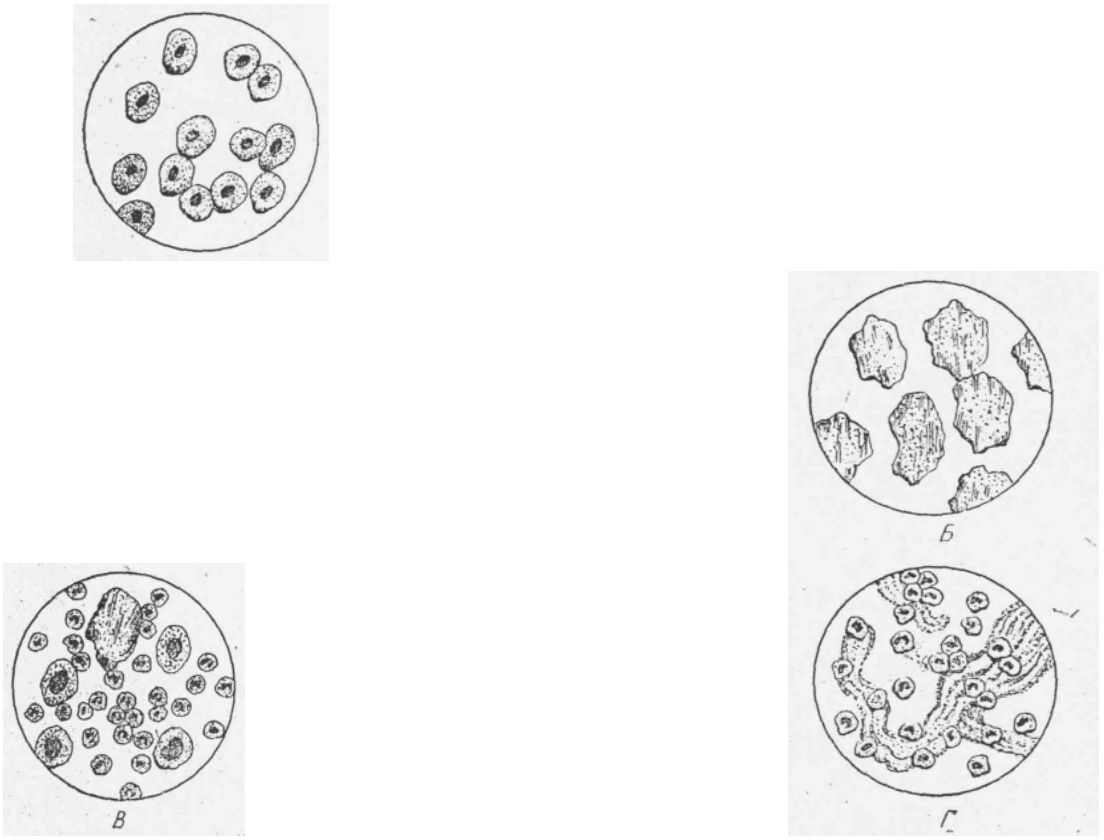

Рис. 1. Картина влагалищного мазка крысы в разные фазы полового цикла:
А – проэструс; Б – эструс; В – метаэструс; С – диэструс

Функция яичников определяется показателями, характеризующими состояние эстрального цикла и количественной оценкой структурных элементов. Выделяют 4 стадии цикла: **эструс (течку), метаэструс (послетечку), диэструс (межтечку) и проэструс (предтечку).** Каждой фазе полового цикла свойственны характерные

синхронные изменения во всём организме самки и, в особенности, в половом аппарате (яйцеводах, матке и влагалище). Изменения строения стенки влагалища резко отражаются на влагалищном содержимом. Поэтому во время каждой фазы полового цикла вагинальные мазки имеют характерный клеточный состав, по которому можно определить фазу цикла.

Для стадии **эструса** характерны ороговевшие безъядерные чешуйки неправильной формы, образующие скопления. Ядросодержащие клетки и лейкоциты фактически отсутствуют. Полное отсутствие слизи. Средняя продолжительность – 27-36 часов.

Стадию **метаэструса** характеризует большое разнообразие цитологической картины. Среди десквамированных безъядерных чешуек обнаруживаются округлые, крупные ядросодержащие клетки в небольшом количестве и большое число лейкоцитов, слипшихся в комки, напоминающие виноградные гроздья, т.е. встречаются все три вида клеток. Средняя продолжительность – 6 часов.

Для стадии **диэструса** характерно обилие слизи. В мазке обнаруживаются большое количество лейкоцитов, умеренное количество ядросодержащих клеток. Продолжительность этой фазы значительно варьирует 24-48 часа (составляет приблизительно около половины продолжительности всего цикла).

В стадии **проэструса** отмечается резкое уменьшение количества слизи, полное отсутствие лейкоцитов. В поле зрения масса ядросодержащих клеток одинаковой величины, расположенных поодиночке или небольшими группами. Для этой фазы характерны своеобразные клетки треугольной формы с эксцентрическим расположением ядра. Средняя продолжительность – 12-24 часа. Продолжительность эстрального цикла у белых мышей и крыс составляет 4 - 6 дней.

Определение регулярности и продолжительности эстрального цикла и его фаз у лабораторных грызунов позволяет косвенно судить о содержании половых гормонов у самок, а также об эндо- и экзогенном влиянии на их половую функцию. Нарушения эстральной функции, вызванные химическими веществами, оценивают как гонадотоксический эффект, относят к категории специфических видов токсичности и рассматривают как свидетельство безусловно вредного действия хемотоксиканта.

5. ТЕРМИНЫ И ОПРЕДЕЛЕНИЯ

Принципы надлежащей лабораторной практики (Good Laboratory Practice (GLP): Систем обеспечения качества, имеющая отношение к процессам организации, планирования, порядку проведения и контролю исследований в области охраны здоровья человека и безопасности окружающей среды, а также оформления, архивирования и представления результатов этих исследований

Стандартные операционные процедуры; СОП (standard operating procedures; SOPs): Документированные процедуры, содержащие описание процессов проведения испытаний или другой деятельности, как правило, не представленные детально в планах исследования или руководствах по методам проведения испытаний.

6. СПИСОК СОКРАЩЕНИЯ

ЛГ - лютеотропный гормон гипофиза;
ФСГ - фолликулостимулирующий гормон гипофиза;
СОП – стандартная операционная процедура

7. ПРИМЕНЯЕМОЕ ОБОРУДОВАНИЕ/ИНСТРУМЕНТЫ/РЕАКТИВЫ

7.1. Бинокулярный микроскоп

7.2. Предметные стёкла

7.3. Тонкие стеклянные палочки, с ватным наконечником.

7.4. Стакан с теплым (37-38°) 0,9% раствором NaCl

7.5. Шариковые ручки

7.6. Журнал регистрации данных

8. ПРОЦЕДУРА ВЫПОЛНЕНИЯ

8.1. Поместить крысу самку на ровную поверхность (например – стол).

8.2. Затем, одной рукой зафиксировать заднюю часть тела, приподнимая ее хвост.

8.3. Другой рукой взять стеклянную палочку с ватным наконечником (предварительно смочить в теплом 0,9% растворе NaCl);

8.4. Осторожно вращательными движениями ввести влажный ватный наконечник палочки в отверстие влагалища.

8.5. Палочку с ватным наконечником извлечь из влагалища, крысу самку поместить в клетку.

8.6. Полученное вагинальное содержимое нанести на предметное стекло и сделать мазок.

8.7. Исследовать пробу под микроскопом в слегка затемнённом поле под небольшим увеличением (7×8**).**

8.8. На основании анализа наблюдающейся цитологической картины вагинального мазка определить фазу эстрального цикла.

8.9. Обнаружение сперматозоидов в вагинальном мазке у крысы самки считается первым днем ее беременности.

8.9. Полученный результат занести в журнал регистрации данных (Приложение А).

8.10. Эстральный цикл необходимо исследовать в течение двух недель **ежедневно**, в одни и те же часы, строго соблюдая «правило одного часа».

9. СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

9.1. Гормональная регуляция размножения у млекопитающих; Пер. с англ. /Под ред. К. Остина, Р. Шорта. – М.: Мир, 1987. – 305 с.

9.2. Методы экспериментального исследования по установлению порогов действия промышленных ядов на генеративную функцию с целью гигиенического нормирования:

9.3. 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.

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

9.5. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств// Под общей редакцией д.м.н. А.Н.Миронова. Москва, 2012. Часть первая. С.80-93.

9.6. Саноцкий И.В., Фоменко В.Н. Отдалённые последствия влияния химических соединений на организм. – М.: Медицина, 1979. – 232 с.

10. ПРИЛОЖЕНИЕ

ПРИЛОЖЕНИЕ А

Лаборатория токсикологии

НЦИЛС ФГБОУ ВО ВолгГМУ Минздрава России

СОГЛАСОВАНО
Руководитель СОК
_____ В.Н. Перфилова
«___» _____20___г.

УТВЕРЖДАЮ
Руководитель ИЦ
_____Л.И. Бугаева
«___» _____20___г.

Журнал регистрации первичных данных

по изучению эстрального цикла у крыс самок

Место хранения: 400087, г. г. Волгоград, ул. Новороссийская, д. 39 Помещение №____

Начат	
Окончен	

Список сотрудников, допущенных к заполнению журнала регистрации первичных данных по изучению эстрального цикла у крыс самок.

№ п/п	Должность	Ф.И.О.	Подпись
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			
6.			
7.			
8.			

Карта регистрации первичных данных по изучению эстрального цикла у крыс самок

Код исследования: _____

Дата проведения эксперимента_____ Время _____

Группа_____ Вещество _____ Доза _____Путь введения_____

Вид ТС_____ Линия ТС _____Пол ТС _____

№ п/п	Номер самки	День исследования													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1															
2															
3															
4															
5															
6															
7															
8															
9															
10															
11															
12															
13															
14															
15															
Примечание: для обозначения фаз эстрального цикла использовать условные обозначения: Пр – проэструс; Э – эструс; М – метаэструс; Д - диэструс															

Исполнитель: _____ **/ Ф. И. О.**_____/
Дата подпись расшифровка подписи

Исполнитель: _____ **/ Ф. И. О.**_____/
Дата подпись расшифровка подписи

Руководитель исследования: _____ **/ Ф. И. О.**_____/
Дата подпись расшифровка подписи

Лист регистрации изменений от «25» мая 2022 в СОП № IV/2П-006-2022/3 версия 3

№ изм.	№ страницы	№ пункта	Внесенные изменения
1	1		Логотип ВолгГМУ Старого образца. **изменено на** Логотип нового образца
2	1		Согласно СОП 1/1П-001-2021 на титульном листе **убраны** графы: дата утверждения, дата пересмотра. **Добавлено**: составлено/пересмотрено. Графа- Дата начала действия **изменена** на Дата начала действия версии СОП. **Добавлено** – Дата окончания действия версии СОП. Номер СОП IV/1П-1.002-2020 **изменен на** СОП № IV/2П-006-2022
3	1	1	Заголовок п.1 Назначение и область применения **изменена** на Назначение
4	1	1	В п.1 Назначение фраза «**ЦЕЛЬ** данной стандартной операционной процедуры описать метод определения регулярности и продолжительности эстрального цикла и его фаз у лабораторных грызунов, что позволяет косвенно судить о содержании половых гормонов у самок и эндо- и экзогенных влияниях на их половую функцию.» **изменена на** **1.1.«ЦЕЛЬ:** описание метод определения регулярности и продолжительности эстрального цикла и его фаз у лабораторных животных». Подпункт 1.1. СОП – предназначен сотрудникам, выполняющим исследования по репродуктивной токсичности. **изменены на** **1.2.ПРЕДНАЗНАЧЕНИЕ:** СОП - предназначена для научных сотрудников, выполняющим исследования по репродуктивной токсичности и является обязательным для изучения.
5	1	2	**НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ** 2.2. ОБ УТВЕРЖДЕНИИ ПРАВИЛ ЛАБОРАТОРНОЙ ПРАКТИКИ (МЗ и СР РФ, приказ № 708н от 23 августа 2010 г.) - **Удален**
6	2		колонтитул из 4-граф **изменен** на 3 графы (убрано- начало действия)
7	2	3	П.3 Общие положения **удалены**. **Добавлена** п. Ответственность

8	2	4	П.4 Ответственность за выполнение работ по процедуре **удалена.** **Добавлен** п. Область применения
9	3		Термины и определения **присвоен** п.5
10	3		Список сокращений **присвоен** п.6
11	4	5	П.5 Применяемое оборудование/инструменты **изменен** на п.7 В п.7 **добавлено:** 4. Бумага 5. Шариковые ручки 6. Журнал регистрации данных
12	4	6	Процедура выполнения **изменена** на п.8
13	4	7	Ссылки **изменен** на п.9 Список использованных источников
14	5	8	п. 8 Приложения **изменено** на п.10 Карта регистрации первичных данных – **удалена** Вместо нее **добавлен** журнал регистрации данных по изучению эстрального цикла у крыс самок

Руководитель лаборатории:

«30» мая 2022 г _____/ Бугаева Л.И./

дата подпись расшифровка