

о токсическом эффекте трития: активируется апоптоз при действии ОСТ в 1.6 раза, повышается частота многоядерных сперматид в 3 раза при действии НТО и в 5 раз при действии ОСТ (табл. 1). Указанные клеточные показатели почти не исследованы при действии трития, несмотря на то что основной триадой показателей неблагоприятного действия различных факторов на семенники является вакуолизация клеток Сертоли, апоптоз и появление многоядерных сперматид (Anton, 2003; Pirzaman et al., 2023). Гибель сперматогоний и снижение количества покоящихся первичных сперматоцитов при действии ОСТ и НТО показана, причем ОСТ был в 4 раза эффективнее НТО (Lambert, 1969). Активация апоптоза в семенниках при действии трития в дозе, соответствующей 0.3 Гр, привела к снижению сперматогоний у мышей на 50 % (Straume, Carsten, 1993). В нашей работе эффект установлен при более низкой активности соединений трития с помощью визуализации и количественного учета «фигур апоптоза» (рис. 1).

Появление многоядерных сперматид показано на мышках, получавших внутриутробно НТО с активностью 185 МБк/л (Bhatia, 1982). Гистологический анализ проведен у потомства через три недели после рождения. На гистологических срезах выявляют именно «появление» таких клеток при действии различных факторов, поскольку этим методом невозможно определить их частоту (срезы проходят через клетку на разном уровне), в отличие от анализа изолированных клеток. Обсуждение вопроса о появлении многоядерных сперматид при различных неблагоприятных воздействиях рассмотрено в нескольких работах (Holstein, Eckmann, 1986; Anton, 2003), авторы которых характеризуют этот показатель как показатель токсического действия. Использование нашего подхода позволяет увидеть и количественно определить частоту многоядерных сперматид у контрольных животных и при действии разных факторов (Sycheva et al., 2011; Сычева

и др., 2016). Таким образом, метод позволил выявить токсический, но не мутагенный эффект соединений трития в дозах, ненамного превышающих норматив для питьевой воды (Гурьев и др., 2020).

Метод позволяет проводить полиорганное исследование эффекта воздействия различных факторов на организм млекопитающих путем фиксации нескольких органов, в том числе семенников в формалине. Приблизительно через месяц после окончания эксперимента можно использовать зафиксированные органы для приготовления и гистологических, и цитологических препаратов. Такой подход не годится при необходимости быстрой оценки эффекта сразу после окончания эксперимента.

Предлагаемый способ подготовки материала к микроскопическому исследованию удобен, прост в исполнении, экономичен, не требует специального оборудования, позволяет готовить препараты в удобное для исследователя время. Использование пробирок эппендорф сокращает количество используемых реактивов и позволяет концентрировать клеточную массу. Время приготовления препаратов семенников от 24 животных не превышает 3 ч. Фиксация в формалине дает возможность длительно сохранять оставшийся материал для повторного использования.

Таким образом, представлен несложный метод оценки цитогенетического и цитотоксического эффекта различных факторов на семенниках после фиксации органов в формалине. Метод предоставляет широкие возможности параллельной оценки цито- и гистологических препаратов и позволяет на новом уровне качественно и количественно оценивать влияние различных факторов (физических, химических, биологических) на организм, изучать мутагенный эффект, определять трансформированные клетки, что важно для решения проблем бесплодия, наследственной патологии, онкопатологии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Белов Л. Н., Коган М. Е., Леонтьева Т. А., Костырев О. А., Целлариус Ю. Г. 1975. Получение изолированных клеток методом щелочной диссоциации фиксированных формалином тканей. Цитология. Т. 12. С. 1332. (Belov L. N., Kogan M. E., Leontyeva T. A., Kostyrev O. A., Tselarius Yu. G. 1975. Obtaining isolated cells by alkaline dissociation of formalin-fixed tissues. Tsitologiya. V. 12. P. 1332.)
2. Гурьев Д. В., Кочетков О. А., Барчуков В. Г., Осипов А. Н. 2020. Биологические эффекты органических и неорганических соединений трития. Медицинская радиология и радиационная безопасность. Т. 65. Р. 5. (Guryev D. V., Kochetkov O. A., Barchukov V. G., Osipov A. N. 2020. Biological effects of organic and inorganic tritium compounds. Med. Radiol. Radiat. Safety. V. 65. P. 5.)
3. Калистратова В. С., Кочетков О. А., Кабанов Д. И. 2014. Метаболизм трития и биологическое действие соединений трития (История вопроса и современное состояние проблемы). Медицинская радиология и радиационная безопасность. Т. 59. С. 54. (Kalistratova V. S., Kochetkov O. A., Kabanov D. I. 2014. Tritium metabolism and biological effects of tritium compounds (History of the issue and current state of the problem). Med. Radiol. Radiat. Safety. V. 59. P. 54.)
4. Ковалевский К. Л., Метелкин А. И. 1951. Лабораторное животноводство. Практическое руководство по разведению, содержанию и применению лабораторных животных. М.: АМН СССР. 309 с. (Kovalevsky K. L., Metelkin A. I. 1951. Laboratory animal husbandry. Practical guide to breeding, keeping and using laboratory animals. Moscow: USSR Academy of Medical Sciences. 309 p.)

5. *Муравьева Л. В., Журков В. С., Савостикова О. Н., Сычева Л. П., Синецкина О. О.* 2017. Цитомный анализ сперматид мышей: анализ показателей у интактных животных. В кн.: Экологические проблемы современности: выявление и предупреждение неблагоприятного воздействия антропогенно детерминированных факторов и климатических изменений на окружающую среду и здоровье населения. М.: Научный совет РФ по экологии человека и гигиене окружающей среды. С. 340. (*Muravyova L. V., Zhurkov V. S., Savostikova O. N., Sycheva L. P., Sinitsyna O. O.* 2017. Cytome analysis of mouse spermatids: analysis of parameters in intact animals. In: Ecological problems of our time: identification and prevention of adverse impacts of anthropogenically determined factors and climate change on the environment and public health. Moscow: Scientific Council of the Russian Federation on Human Ecology and Environmental Hygiene. P. 340.)
6. *Сычева Л. П., Журков В. С., Рахманин Ю. А., Ревазова Ю. А.* 2007. Применение полиорганного микроядерного теста в эколого-гигиенических исследованиях. В кн.: Полиорганый микроядерный тест в эколого-гигиенических исследованиях. М.: Гениус. С. 287. (*Sycheva L. P., Zhurkov V. S., Rakhmanin Yu. A., Revazova Yu. A.* 2007. Application of the multiorgan micronucleus test in ecological and hygienic studies. In: Multiorgan micronucleus test in ecological and hygienic studies. Moscow: Genius. P. 287.)
7. *Сычева Л. П., Муравьева Л. В., Журков В. С., Михайлова Р. И., Савостикова О. Н., Алексеева А. В., Шереметьева С. М.* 2016. Изучение мутагенного и цитотоксического действия наносеребра и сульфата серебра в половых клетках мышей *in vivo*. Российские нанотехнологии. Т. 11. С. 73. (*Sycheva L. P., Muravyova L. V., Zhurkov V. S., Mikhailova R. I., Savostikova O. N., Alekseeva A. V., Sheremetyeva S. M.* 2016. Study of cytogenetic and cytotoxic effects of nanosilver and silver sulfate in germ cells of mice *in vivo*. Nanotechnol. in Russia. V. 11. P. 256.)
8. *Сычева Л. П., Юрченко В. В., Журков В. С., Ревазова Ю. А., Кияткина М. А.* 2001. Оценка мутагенной активности факторов окружающей среды в клетках разных органов млекопитающих микроядерным методом. Методические рекомендации. М.: Межведомственный научный совет по экологии человека и гигиене окружающей среды РФ. 21 с. (*Sycheva L. P., Yurchenko V. V., Zhurkov V. S., Revazova Yu. A., Kiyatkina M. A.* 2001. Evaluation of mutagenic activity of environmental factors in cells of different mammalian organs by the micronucleus method. Methodical recommendations. Moscow: Interdepartmental Scientific Council on Human Ecology and Environmental Hygiene of the Russian Federation. 21 p.)
9. *Хэм А., Кормак Д.* 1983. Гистология. Т. 5. С. 183. М.: Мир. (Ham A., Cormack D. 1983. Histology. V. 5. P. 183. Moscow: Mir.)
10. *Adler I.-D., Anderson D., Benigni R., Ehling U.-H., Laehdetie J., Pacchierotti F., Russo A., Tates A. D.* 1996. Synthesis report of the step project detection of germ cell mutagens. *Mutat. Res.* V. 353. P. 65.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(95\)00240-5](https://doi.org/10.1016/0027-5107(95)00240-5)
11. *Adler I.-D., Pacchierotti F., Russo A.* 2012. The measurement of induced genetic change in mammalian germ cells. *Methods Mol. Biol.* V. 817. P. 335.
https://doi.org/10.1007/978-1-61779-421-6_16
12. *Anton E.* 2003. Arrested apoptosis without nuclear fragmentation produced by efferent duct ligation in round spermatids and multinucleated giant cells of rat testis. *Reproduction.* V. 125. P. 879.
<https://doi.org/10.1530/rep.0.1250879>
13. *Bhatia A. L.* 1982. Tritium toxicity on postnatally developing mice testes: a qualitative and quantitative evaluation. *Radiobiol. Radiother. (Berl).* V. 23. P. 693.
14. *Hayashi M.* 2016. The micronucleus test—most widely used *in vivo* genotoxicity test. *Genes Environ.* V. 38. P. 18.
15. *Hoyes K. P., Morris I. D.* 1996. Environmental radiation and male reproduction. *Int. J. Andrologia.* V. 19. P. 199.
<https://doi.org/10.1111/j.1365-2605.1996.tb00463.x>
16. *Holstein A. F., Eckmann C.* 1986. Multinucleated spermatocytes and spermatids in human seminiferous tubules. *Andrologia.* P. 18. P. 5.
17. *Kallio M., Sjöblom T., Lähdetie J.* 1995. Effects of vinblastine and colchicine on male rat meiosis *in vivo*: disturbances in spindle dynamics causing micronuclei and metaphase arrest. *Environ. Mol. Mutagen.* V. 25. P. 106.
<https://doi.org/10.1002/em.2850250204>
18. *Kunugita N., Kakihara H., Kawamoto T., Norimura T.* 2002. Micronuclei induced by low dose rate irradiation in early spermatids of p53 null and wild mice. *J. Radiat. Res.* V. 43. Art. ID: s205.
<https://doi.org/10.1269/jrr.43.s205>
19. *Lähdetie J., Parvinen M.* 1981. Meiotic micronuclei induced by X-rays in early spermatids of the rat. *Mutat. Res.* V. 81. P. 103.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(81\)90091-9](https://doi.org/10.1016/0027-5107(81)90091-9)

20. *Lähdetie J., Peltonen K., Sjöblom T.* 1997. Germ cell mutagenicity of three metabolites of 1,3-butadiene in the rat: induction of spermatid micronuclei by butadiene mono-, di-, and diepoxides *in vivo*. *Environ. Mol. Mutagen.* V. 29. P. 230.
[https://doi.org/10.1002/\(sici\)1098-2280\(1997\)29:3<230::aid-em2>3.0.co;2-g](https://doi.org/10.1002/(sici)1098-2280(1997)29:3<230::aid-em2>3.0.co;2-g)
21. *Lambert B. E.* 1969. Cytological damage produced in the mouse testes by tritiated thymidine, tritiated water and X-rays. *Health Phys.* V. 17. P. 547.
<https://doi.org/10.1097/00004032-196910000-00003>
22. *Li H., Yin Y., Liu J., Lu B., Wan H., Yang L., Wang W., Li R.* 2021. Hydrogen-rich water attenuates the radiotoxicity induced by tritium exposure *in vitro* and *in vivo*. *J. Radiat. Res.* V. 62. P. 34.
<https://doi.org/10.1093/jrr/rraa104>
23. *Morita T., MacGregor J. T., Hayashi M.* 2011. Micronucleus assays in rodent tissues other than bone marrow. *Mutagenesis.* V. 26. P. 223.
24. *Nakagawa S., Mori C.* 2003. Detection of mitomycin C-induced testicular toxicity by micronucleus assay in mice. *Reprod. Med. Biol.* V. 2. P. 69.
<https://doi.org/10.1046/j.1445-5781.2003.00023.x>
25. *Pirzaman A. T., Ebrahimi P., Doostmohadian S., Karim B., Almasi D., Madani F., Moghadamnia A., Kazemi S.* 2023. 5-Fluorouracil-induced toxicity in both male and female reproductive systems: a narrative review. *Hum. Exp. Toxicol.* V. 42. Art. ID: 9603271231217988.
<https://doi.org/10.1177/09603271231217988>
26. *Straume T., Carsten A. L.* 1993. Tritium radiobiology and relative biological effectiveness. *Health Phys.* V. 65. P. 657.
27. *Sycheva L. P., Zhurkov V. S., Iurchenko V. V., Daugel-Dauge N. O., Kovalenko M. A., Krivtsova E. K., Durnev A. D.* 2011. Investigation of genotoxic and cytotoxic effects of micro- and nanosized titanium dioxide in six organs of mice *in vivo*. *Mutat. Res.* V. 726. P. 8.
<https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2011.07.010>
28. *Tates A. D., Dietrich A. J., de Vogel N., Neuteboom I., Bos A.* 1983. A micronucleus method for detection of meiotic micronuclei in male germ cells of mammals. *Mutat. Res.* V. 121. P. 131.
29. *Umata T.* 2017. Estimation of biological effects of tritium. *J. UOEH. (Japanese).* V. 9. P. 25.
<https://doi.org/10.7888/juoeh.39.25>
30. *West A., Suutari A., Lähdetie J.* 1995. Detection of germ cell mutagenicity of trophosphamide by the spermatid micronucleus test in the rat. *Mutagenesis.* V. 10. Art. ID: 287.
<https://doi.org/10.1093/mutage/10.4.287>
31. *Xiao Y., Tate A. D.* 1994. Increased frequencies of micronuclei in early spermatids of rats following exposure of young primary spermatocytes to acrylamide. *Mutat. Res.* V. 309. P. 245.
[https://doi.org/10.1016/0027-5107\(94\)90099-x](https://doi.org/10.1016/0027-5107(94)90099-x)