

УДК 57.04:575.224:576.08:576.356:616.018

DOI: 10.7868/S3034606126010069

## МИКРОЯДЕРНЫЙ ТЕСТ НА СПЕРМАТИДАХ КРЫС ПОСЛЕ ФИКСАЦИИ СЕМЕННИКОВ В ФОРМАЛИНЕ

Л. П. Сычева\*, Ю. А. Зрилова, Д. В. Гурьев

Государственный научный центр Российской Федерации – Федеральный медицинский биофизический центр  
имени А.И. Бурназяна, Москва, 123182, Российская Федерация

\* E-mail: lpsycheva@mail.ru

**Аннотация. Обоснование и цель.** Для полиорганной оценки генотоксического (токсического) действия факторов различной природы необходимо исследовать не только соматические, но и половые клетки. Большой интерес представляет анализ клеток семенников, фиксированных в формалине с последующей щелочной диссоциацией клеток. Этот подход позволяет на микроскопических препаратах увидеть отдельно лежащие клетки семенников и количественно учесть частоту сперматид с микроядрами, многоядерных сперматид и клеток в апоптозе. **Материал и методика.** Разработан метод, заключающийся в щелочной диссоциации клеток фиксированного в формалине семенника, приготовления мазков клеток, их окраски и микроскопического анализа. **Результаты.** Метод апробирован в эксперименте на крысах при воздействии трития в виде неорганического (трیتیевой воды, НТО) или в составе органического соединения (<sup>3</sup>Н-тимидина) с удельной активностью 500 ± 50 кБк/л, поступающих в организм с питьевой водой. Метод позволил провести микроскопический анализ клеток семенников крыс и проанализировать по 1000 сперматид. В условиях проведенного эксперимента частота сперматид с микроядрами в опытных группах не отличалась от контроля, выявлено 3—5-кратное повышение частоты многоядерных сперматид, изменение уровня апоптоза. Показано хорошее совпадение показателей частоты клеток с микроядрами, многоядерных сперматид и апоптоза в семенниках интактных животных с данными, представленными в литературе с использованием других методов. **Вывод.** Метод предоставляет возможность сохранения целостности изолированных клеток семенников и их анализа для параллельной оценки цито- и гистологических препаратов, повышает достоверность, информативность и эффективность оценки действия различных факторов на организм.

**Ключевые слова:** сперматиды, микроядра, многоядерные сперматиды, апоптоз, цитогенетический эффект, мутагенный эффект, микроядерный тест на семенниках, оксид трития, <sup>3</sup>Н-тимидин

**Принятые сокращения:** ОСТ — органическое соединение трития; НТО — трیتیевая вода.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках плановых исследований Государственного научного центра РФ — Федерального медицинского биофизического центра им. А. И. Бурназяна (Москва, Россия).

**Соблюдение этических стандартов.** Все эксперименты были проведены в соответствии с положениями Директивы 2010/63/EU Европейского парламента и Совета ЕС по охране животных, используемых в научных целях. Эксперименты одобрены комитетом по этике Государственного научного центра РФ — Федерального медицинского биофизического центра им. А. И. Бурназяна (Москва, Россия; протокол № 28 от 14 ноября 2023 г.).

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Информация о вкладе авторов.** Сычева Л. П.: разработка метода, Гурьев Д. В.: создание модели исследования, Сычева Л. П., Зрилова Ю. А., Гурьев Д. В.: апробация метода экспериментально; Сычева Л. П.: подготовка текста рукописи, таблицы и рисунков; Гурьев Д. В.: редактирование текста.

**Ссылка для цитирования:** Сычева Л. П., Зрилова Ю. А., Гурьев Д. В. Микроядерный тест на сперматидах крыс после фиксации семенников в формалине. Цитология / Cell and Tissue Biology, 2026, том 68, № 1, с. 86. doi: 10.7868/S3034606126010069

Поступила в редакцию 06.08.2025

После доработки 14.10.2025

Принята к публикации 15.10.2025

DOI: 10.7868/S3034606126010069

## Micronucleus Assay on Rat Spermatids after Testis Fixation in Formalin

L. P. Sycheva\*, Yu. A. Zrilova, D. V. Guryev

State Research Center – Burnasyan Federal Medical Biophysical Center of Federal Medical Biological Agency,  
123182, Moscow, Russian Federation

\* E-mail: lpsycheva@mail.ru

**Abstract. Objective:** For multiorgan evaluation of genotoxic/toxic effects of various factors, it is necessary to examine not only somatic but also germ cells. Of great interest is the analysis of formalin-fixed testicular cells. Subsequent cell dissociation allows quantitatively accounting for the frequency of spermatids with micronuclei, multinucleated spermatids and apoptotic cells. **Method:** A method has been developed consisting of alkaline dissociation of formalin-fixed testicular cells, preparation of cell smears and their staining. **Results:** The method has been tested in an experiment on rats exposed to tritium, inorganic (tritiated water HTO) and organic (isotope-labeled thymidine,  $^3\text{H}$ -thymidine) with a specific activity of  $500 \pm 50$  kBq/L, entering the body with drinking water. Under the conditions of the experiment, no mutagenic effect was found, a toxic effect was detected: a 3–5-fold increase in the frequency of multinucleated spermatids, a change in the level of apoptosis. It was made a comparison with literature data of the frequency of cells with micronuclei, multinuclear spermatids and apoptosis in the testes of intact animals. **Conclusion:** The method provides the possibility of preserving the integrity of isolated testicular cells and their analysis along with somatic tissue cells, parallel evaluation of cyto- and histological preparations, increases the reliability, information content and efficiency of assessing the effect of various factors on the body.

**Keywords:** spermatids, micronuclei, multinucleated spermatids, apoptosis, cytogenetic effect, mutagenic effect, micronucleus assay on testes, tritium oxide,  $^3\text{H}$ -thymidine

**Funding.** This work was carried out as part of planned research at the State Scientific Center of the Russian Federation – Burnazyan Federal Medical Biophysical Center (Moscow, Russia).

**Ethics approval and consent to participate.** All experiments were conducted in accordance with Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council on the protection of animals used for scientific purposes. The experiments were approved by the Ethics Committee of Burnazyan Federal Medical Biophysical Center of the Russian Federation (Moscow, Russia; Protocol no. 28 dated November 14, 2023).

**Conflict of interest.** The authors of this work declare that they have no conflicts of interest.

**Author contribution.** Sycheva L.P.: development of the method, Guryev D.V.: creation of the research model; Sycheva L.P., Zrilova Yu.A., Guryev D.V.: experimental testing of the method; Sycheva L.P.: preparation of the manuscript text, tables and figures; Guryev D.V.: editing the text.

**For citation:** Sycheva L. P., Zrilova Yu. A., Guryev D. V. Micronucleus assay on rat spermatids after testis fixation in formalin. *Tsitologiya / Cell and Tissue Biology*, 2026, vol. 68, no. 1, p. 86. doi: 10.7868/S3034606126010069

Received August 06, 2025  
Revised October 14, 2025  
Accepted October 15, 2025

В настоящее время мутагенный эффект различных факторов оценивают преимущественно микроядерным методом на полихроматофильных эритроцитах костного мозга мышей (Hayashi, 2016). Однако существует органная специфичность действия мутагенов/канцерогенов (Сычева и др., 2007; Morita et al., 2011). Генотоксический эффект в соматических органах свидетельствует о возможности развития канцерогенного эффекта, и органная специфичность здесь играет важную роль. Эффект в половых клетках более опасен с точки зрения возможности развития генетической патологии у потомства. Повреждение генетического материала половых клеток может приводить к стерильности или образованию мутаций. В связи с этим анализ половых клеток при тестировании мутагенного действия различных факторов имеет большое значение.

При тестировании эффекта химических соединений считается, что половые клетки семенников защищены лучше других гематотестикулярным барьером. Но при действии ионизирующих излучений эта защита не работает (Hoyes, Morris, 1996). Более того, репарация ДНК в соматических клетках, по-видимому, более активна. Так, было показано (Kunugita et al., 2002), что в лимфоцитах, в отличие от половых клеток, репарация ДНК и p53-зависимый апоптоз, по-видимому, полностью устраняют мутагенные повреждения, вызванные воздействием излучения в малых дозах или с малой мощностью дозы. Эти данные актуализируют вопрос определения мутагенного эффекта в половых клетках лабораторных животных при оценке риска биологического действия различных факторов.

В одной из первых публикаций о микроядерном методе на сперматидях крыс описана суспензионная методика и проанализированы клетки с помощью фазово-контрастной микроскопии (Lähdetie, Parvinen, 1981). В 1983 году разработана методика получения препаратов сперматид с применением среды, содержащей коллагеназу, трипсин и ДНКазу (Tates et al., 1983). В 1996 году опубликованы результаты международного проекта «Определение мутагенов половых клеток» (Adler et al., 1996).

Проект позволил решить несколько важных задач: определить мутагенный эффект ряда химических соединений, провести стандартизацию и верификацию новых методов оценки мутагенного действия, создать базу данных по мутагенности факторов для мужских половых клеток. В этом проекте верификация микроядерного теста на сперматидях мышей и крыс проведена с использованием девяти химических веществ. Установлено, что метод является адекватной процедурой для выявления мутагенов половых клеток и оценки органных и видовых различий. Для проведения микроядерного теста одобрена суспензионная методика *ex tempore* (Xiao, Tates, 1994) без применения ферментов. Мы также в нескольких исследованиях анализировали частоту сперматид с микроядрами с использованием подобного метода *ex tempore*, но в более простой модификации (Sycheva et al., 2011).

Однако пока отсутствует метод приготовления суспензии клеток семенников после их длительной фиксации в формалине, несмотря на то что для других органов он разработан и нашел свое применение (Сычева и др., 2007). Фиксация семенников в формалине удобна в случае проведения полиорганного анализа при отсутствии времени для получения препаратов *ex tempore* от большого количества животных. Кроме того, во многих исследованиях семенники фиксируют в формалине для приготовления гистологических срезов. Такой материал можно использовать для анализа микроядер в сперматидях.

Цель нашей работы — представить микроядерный тест на сперматидях после фиксации семенников в формалине с описанием дизайна исследования, фиксации клеток, щелочной диссоциации, приготовления препаратов, окраски и анализа сперматид.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Факторы.** Метод апробирован при действии на организм мышей <sup>3</sup>H-тимидина в качестве органического соединения трития (ОСТ) или оксида трития в качестве неорганического соединения (трیتیевой воды, НТО). Животные получали раствор <sup>3</sup>H-тимидина (далее ОСТ) или НТО с питьевой водой. Объемная активность каждого из веществ составила  $500 \pm 50$  кБк/л, что соответствует малым дозам радионуклида (Гурьев и др., 2020).

**Животные.** Верификация микроядерного теста на сперматидях крыс после фиксации семенников в формалине проведена в эксперименте на 18 самцах крыс линии Wistar, полученных из питомника лабораторных животных ФИБХ РАН массой 280—400 г. Кроме того, была выделена отдельная группа, включающая пять самцов крыс, для приготовления препаратов *ex tempore*. Всех животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к воде и пище в контролируемых условиях окружающей среды: при температуре воздуха 18—22 °С и относительной влажности 40—60 %. Животные без ограничений пили питьевую воду, содержащую тритий в форме НТО или ОСТ. Контрольные животные получали обычную питьевую воду. Цитогенетические исследования проводили через 10 сут после начала поступления радиоактивных соединений в организм крыс.

**Приготовление препаратов.** Приблизительно половину семенника фиксировали в 10 % формалине («БиоВитрум», Россия) в течение месяца. Промывали в водопроводной воде в течение 1 сут. Кусочек средней части семенника объемом ~ 2—3 мм<sup>3</sup> перенесли в пробирку эппендорф с 50 %-ным водным раствором КОН («Химмед», Россия) выдерживали в течение 40—60 мин при 37 °С. Для отмывания щелочи размягченный материал аккуратно перекладывали в эппендорф с водопроводной водой, выдерживали в течение 30 мин, центрифугировали 7 мин при 1500 об/мин (280 g), надосадочную жидкость удаляли, заливали новую порцию воды, перемешивали пипеткой с пластиковым наконечником. Через 30 мин процедуру повторяли. Надосадочную жидкость удаляли,

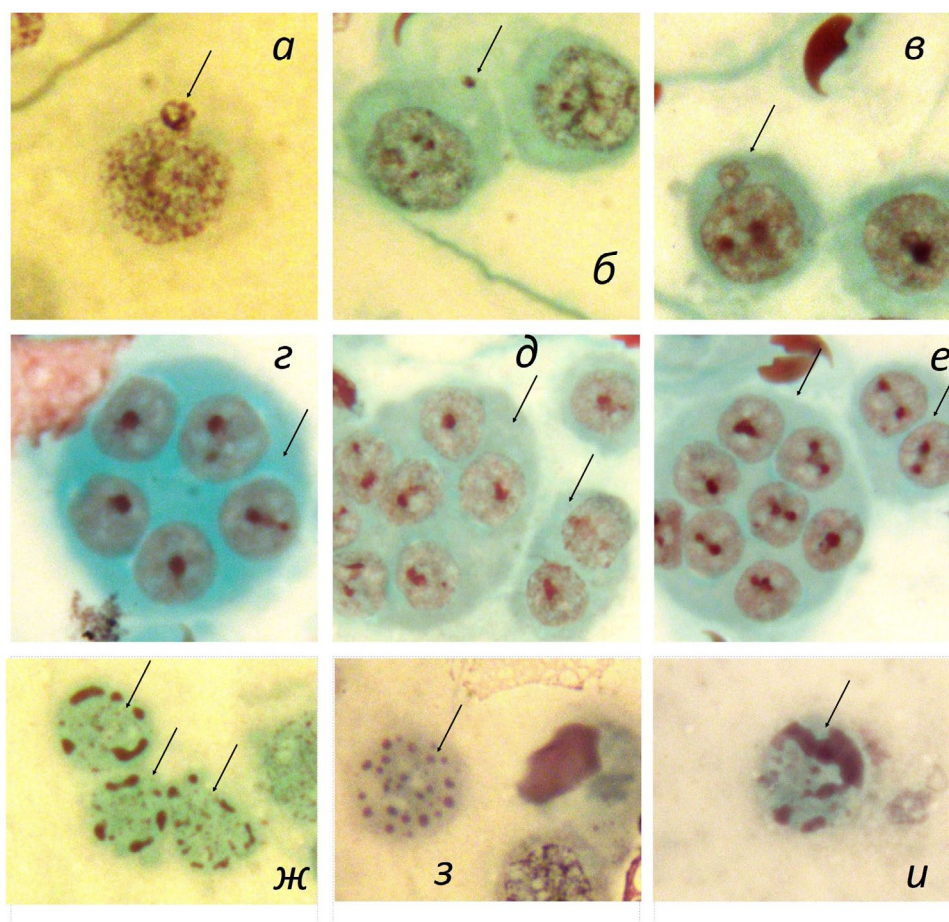
осадок наносили на край сухого предметного стекла пипеткой с пластиковым наконечником и делали мазок.

Такая подготовка препаратов позволяет получить отдельно лежащие клетки семенников с сохранением цитоплазматических мембран. Мазки от всех животных в эксперименте высушивали, фиксировали смесью этанола с уксусной кислотой (3:1) в течение 10 мин. Окрашивали 2%-ным ацетоорсеином (Orcein, Merck, Германия) при 45 °С в течение 2 ч. Промывали дистиллированной водой, цитоплазму докрашивали 1%-ным раствором светлого зеленого (Light Green SF Yellowish; Sigma-Aldrich, США) в течение 1 мин.

Суспензионный метод для приготовления препаратов сперматид контрольных крыс описан в более ранней публикации (Sycheva et al., 2011). Кусочек средней части семенника объемом ~ 2–3 мм<sup>3</sup> вырезали, помещали в каплю физраствора, измельчали ножницами. Полученную суспензию переносили в пробирку эппендорф, содержащую 1 мл физраствора, ресуспендировали пипеткой с пластиковым наконечником, центрифугировали 7 мин при 1500 об/мин (280 g). Надосадочную жидкость удаляли,

к осадку добавляли 2–3 капли свежего физраствора, суспендировали и каплю суспензии наносили на предметное стекло. Делали мазок. Высушенные препараты окрашивали 2%-ным ацетоорсеином (Orcein, Merck, Германия) в течение часа при 37 °С. Цитоплазму докрашивали в течение 1 мин 1%-ным раствором светлого зеленого ((Light Green SF Yellowish, Sigma-Aldrich, USA).

Микроскопический анализ клеток семенников проводили при увеличении объектива 100× с масляной иммерсией. Анализировали по 1 тыс. сперматид от каждого животного, определяли клетки с микроядрами, а также сперматиды с двумя и более ядрами (многоядерные сперматиды); апоптотические клетки учитывали как клетки с фрагментированным ядром на 1000 ядерных клеток. Фрагменты хроматина в апоптотических клетках могут лежать отдельно в виде гранул различного размера или образовывать в центре клетки глыбу неровного «скомканного» пикнотического хроматина в виде деструктивной липшейся массы (рис. 1). Анализ проводили на зашифрованных препаратах.



**Рис. 1.** Изолированные клетки семенников крыс, полученные методом щелочной диссоциации после фиксации формалином: *a–в* — одноядерные сперматиды с микроядром; *г–е* — двуядерные и многоядерные сперматиды; *ж–и* — апоптоз в клетках семенника. Все обозначенные структуры указаны стрелками

**Статистическую обработку** результатов проводили с использованием программ Excel и STATISTICA для Windows. Определяли средние значения показателей, ошибку среднего и стандартное отклонение. Сравнение показателей контрольных и экспериментальных групп проводили с использованием критерия  $\chi^2$ . Отличия считали статистически достоверными при  $P < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ

Предлагаемый способ получения и окраски изолированных клеток позволяет четко определять округлые сперматиды. Идентификацию проводили по форме и размеру клеток. Это самые маленькие округлые ядерные клетки сперматогенеза, ядро имеет характерную светлую окраску с единичными плотными глыбками хроматина. Сперматиды, как видно на рис. 1, хорошо визуализируются морфологически при указанном способе окраски, в них отчетливо видны ядерные структуры, в частности микроядро и одно, два или более ядер. Деструктурированное фрагментированное ядро при сохраненной клеточной оболочке указывает на апоптоз. Сперматиды образуются в результате двух делений мейоза, но сами не делятся. В них можно выявить микроядра, которые образуются из отставших хромосом или фрагментов хромосом. Те, в свою очередь, образуются в результате повреждения ДНК или веретена деления на предыдущих стадиях сперматогенеза.

Результаты анализа сперматид крыс представлены в табл. 1. Всего в эксперименте определили 14 сперматид с микроядрами, из них 3 сперматиды — в контрольной группе, по 5 и 6 сперматид — в экспериментальных группах. Статистически значимые отличия между группами не выявлены. Среднегрупповая частота сперматид с микроядрами не превышала 1 %.

Средняя частота многоядерных сперматид (преимущественно двуядерных) в контроле составила 4.75 %. Отмечено статистически достоверное повышение частоты таких клеток в 3 раза при действии НТО и в 5 раз при действии ОСТ (отличия в обоих случаях статистически значимы).

Показаны статистически достоверные отличия обеих экспериментальных групп от контроля по частоте апоптотических клеток. НТО вызывала снижение уровня апоптоза по отношению к контролю в 1.7 раза, тогда как ОСТ, напротив, активировал апоптоз в 1.6 раза.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Микроядерный тест клеток семенников предусматривает анализ округлых сперматид, формирующихся после второго деления мейоза (Lähdetie, Parvinen, 1981; Tates et al., 1983; Adler et al., 2012). Особенности сперматогенеза и критерии определения сперматид подробно рассмотрены в ряде публикаций (Хэм, Кормак, 1983).

Существенным методическим вопросом проведения микроядерного теста является определение временных параметров: длительности эксперимента и времени получения препаратов после окончания воздействия. Это связано с образованием микроядер только в процессе деления клеток. Полный цикл сперматогенеза крысы до образования сперматозоида происходит в течение 34—35 сут (Ковалевский, Метелкин, 1951). Считают, что появление микроядер в сперматиде при действии фактора за 14—19 сут до забоя отражает повреждение генетического аппарата сперматогониев; за 5—13 сут — сперматоцитов первого порядка и за 1—3 сут — сперматоцитов второго порядка, проходящих мейоз (Nakagawa, Mori, 2003; Adler, 2012; рис. 2). Однако следует учитывать, что сперматогонии или сперматоциты с повреждениями генома могут быть элиминированы в процессе клеточного цикла, и тогда эффект не будет выявлен. Эксперимент с пролонгированным воздействием фактора и фиксацией органа через сутки после окончания воздействия более точно отвечает на вопрос о его мутагенности. В нашей работе соединения трития поступали в организм крыс с питьевой водой в течение 10 сут, т. е. мы исследовали сперматиды, в которых повреждение ДНК могло быть индуцировано на стадии сперматоцитов первого и второго порядка (см. рис. 2).

Важным вопросом является определение особенностей предлагаемого метода. В международном проекте (Adler et al., 1996; Adler et al., 2012) в качестве основного

**Таблица 1.** Результаты анализа клеток семенников крыс при воздействии трития (воды НТО или  $^3\text{H}$ -тимидина) в течение 10 сут

| Условие                                    | Число животных | Сперматиды с микроядрами, % | Многоядерные сперматиды, % | Клетки семенников в апоптозе, % |
|--|----------------|-----------------------------|----------------------------|---------------------------------|
|  |                | M $\pm$ SE (SD)             |                            |                                 |
| Контроль, <i>ex tempore</i>                | 5              | 1.0 $\pm$ 0.55 (1.22)       | 8.04 $\pm$ 1.14 (2.55)     | 13.3 $\pm$ 3.44 (7.69)          |
| Контроль, фиксация формалином              | 4              | 0.75 $\pm$ 0.48 (0.96)      | 4.75 $\pm$ 1.38 (2.75)     | 8.50 $\pm$ 2.70 (5.4)           |
| НТО, фиксация формалином                   | 7              | 0.71 $\pm$ 0.36 (0.95)      | 14.71 $\pm$ 3.45 (9.12)*   | 4.92 $\pm$ 1.20 (3.18)*         |
| $^3\text{H}$ -тимидин, фиксация формалином |                | 0.86 $\pm$ 0.40 (1.07)      | 24.0 $\pm$ 6.70 (17.7)*    | 13.6 $\pm$ 4.20 (11.1)*         |

\* Отличия от показателей контрольной группы (фиксация формалином) достоверны при  $P \leq 0.01$ .

| Время до забоя, сут       |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Оконча-<br>ние<br>воздей-<br>ствия |
|---------------------------|----|----|----|----|----|----|----|----|--|---|---|---|---|---|---|---|---|---|------------------------------------|
| 19                        | 18 | 17 | 16 | 15 | 14 | 13 | 12 | 11 | 10   | 9 | 8 | 7 | 6 | 5 | 4 | 3 | 2 | 1 |                                    |
| Стадии сперматогенеза     |    |    |    |    |    |    |    |    |  |   |   |   |   |   |   |   |   |   | Сперма-<br>тиды<br>(~15 сут)       |
| Сперматогонии<br>(~6 сут) |    |    |    |    |    |    |    |    | Сперматоциты первого и второго порядка (~14 сут) |   |   |   |   |   |   |   |   |   |                                    |

Рис. 2. Длительность стадий сперматогенеза и время воздействия трития (выделено цветом)

метода приготовления препаратов сперматид рекомендована модификация суспензионного метода *ex tempore* (Xiao, Tates, 1994) как более быстрая, дешевая и простая в исполнении. Эта методика не требует применения ферментов, тем не менее это многоэтапная методика с применением многокомпонентных растворов. Среда для выделения семенников включает восемь компонентов, четырехкомпонентный фиксатор готовится на основе хлористой ртути, окрашивающий раствор включает йодную кислоту, реактив Шиффа, препарат докрашивают гематоксилином, проводят дегидратацию в серии растворов этанола и ксилола, заключают в среду DePeX.

Мы в течение ряда лет проводили оценку ряда химических соединений и наноматериалов, используя более простой метод приготовления препаратов *ex tempore* (Sycheva et al., 2011). Для оценки мутагенного и токсического эффекта параллельно в нескольких органах одного и того животного применяли полиорганый микроядерный тест с фиксацией органов в формалине и щелочной диссоциацией клеток (Сычева и др., 2007). Однако для семенников мы не смогли подобрать подходящий временной и температурный режим, поэтому наряду с клетками костного мозга, сперматиды готовили *ex tempore*, что удлиняло время проведения эксперимента.

В основе вариантов микроядерного теста на клетках желудочно-кишечного тракта, печени, легких, мочевого пузыря лежит получение изолированных клеток методом щелочной диссоциации фиксированных формалином тканей (Белов и др., 1975). Этот метод мы модифицировали для каждого из органов, варьируя режим щелочной диссоциации (Сычева и др., 2001). Для микроядерного метода на сперматиде крыс после фиксации семенников в формалине также подобрали временной и температурный режим. Для диссоциации клеток использовали пробирки эппендорф. Дополнительная фиксация и окраска препаратов остались теми же, что и для клеток других органов.

Разработанный нами метод на сперматиде апробирован в эксперименте по воздействию на крыс НТО и ОСТ. Большой интерес представляла контрольная группа, поскольку при внедрении нового метода важным этапом является оценка спонтанного уровня изучаемых

показателей. К настоящему времени у нас накоплен значительный материал по оценке показателей микроядерного теста в разных органах интактных лабораторных животных. Так, средняя частота полихроматофильных эритроцитов с микроядрами, а также клеток легких, преджелудка, желудка, тонкой и толстой кишки, мочевого пузыря не превышает 1–2‰ (Сычева и др., 2001). Частота сперматид с микроядрами в настоящей работе составила  $0.75 \pm 0.48 \text{‰}$ . Этот показатель, а также частота многоядерных сперматид и клеток в апоптозе не отличаются значимо от данных, полученных у интактных крыс методом *ex tempore* (табл. 1). Средняя частота сперматид с микроядрами в экспериментах на мышах с применением метода *ex tempore* (обобщенные данные по 33 животным) составила  $0.18 \pm 0.07 \text{‰}$  (Муравьева и др., 2017). По данным других авторов, частота сперматид с микроядрами у интактных крыс также была в пределах 1–2‰, а именно: 1.3‰ (Lähdetie, Parvinen, 1981),  $1.5 \pm 1.3 \text{‰}$  (Xiao, Tates, 1994),  $0.75 \pm 0.18 \text{‰}$  (Kallio et al., 1995),  $0.67 \pm 0.29 \text{‰}$  (West et al., 1995) или  $1.33 \pm 0.29$  (Lähdetie et al., 1997); у мышей — менее 1‰ (Nakagawa, Mori, 2003).

Таким образом, в нашей работе у интактных крыс частота сперматид с микроядрами, полученных после фиксации органа формалином, хорошо соответствует данным, полученным с использованием других методик. Обобщая данные литературы, можно отметить, что частота клеток с цитогенетическими повреждениями в разных органах интактных животных не превышает 2‰.

В семенниках мышей выявлена самая высокая активность трития (семенники > почки > кишечник > печень > селезенка), которая в 2.5 раза выше, чем в селезенке (Li et al., 2021). Показано, что тритий индуцирует образование хромосомных aberrаций в сперматоцитах и сперматогониях мышей (Lambert, 1969; Калистратова, 2014; Umata, 2017). В связи с этим было важно при оценке действия соединений трития в малых дозах оценить клеточные эффекты именно в этом органе.

При действии обоих соединений с тритием с удельной активностью  $500 \pm 50$  кБк/л, частота сперматид с микроядрами не превышала контрольный уровень. Однако два других проанализированных показателя свидетельствуют

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., Tselariyus 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., Синицына 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](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)