

*М.С. Нечаева, Н.С. Преображенская, Н.Ю. Гудков, Д.Е. Щедрин*  
**ВЛИЯНИЕ АНТИОКСИДАНТОВ  
НА ИНДУКЦИЮ МИКРОЯДЕР В ЭРИТРОЦИТАХ КРОВИ КРЫС  
ПРИ ВОЗДЕЙСТВИИ ГАММА-ОБЛУЧЕНИИ**

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО ВГМУ им. Н.Н. Бурденко Минздрава России, каф. нормальной физиологии

**Резюме.** Исследована возможность косвенной оценки активности протекторных средств на репродуктивную систему с помощью микроядерного теста эритроцитов периферической крови крыс, позволяющей проводить предварительные скрининговые исследования фармакологической активности с наименьшими потерями. Целью исследования явилось сравнение экспериментальных моделей овариального дефицита с помощью микроядерного теста эритроцитов периферической крови крыс. В результате проведенных исследований было показано, что овариальный дефицит, индуцированный облучением, оказывает влияние на генетическую стабильность животных. Так в периферической крови облученных животных было выявлено более высокое содержание эритроцитов с микроядрами, чем в контрольной группе животных, не подвергавшихся облучению. Модулирующего влияния антиоксидантных композиций сложного состава при этом не отмечено. Мы можем рекомендовать микроядерный тест периферической крови, как метод сравнения экспериментальных моделей овариального дефицита крыс.

**Ключевые слова:** микроядра, эритроциты, овариальный дефицит, репродуктивное здоровье, периферическая кровь.

**Актуальность.** Проблема репродуктивного здоровья была и остается одной из самых острых в медицине. Расстройства репродуктивной системы могут проявляться в форме снижения фертильности, приводить к нарушениям менструальной функции, эмбрио- и фетопатиям, патологии беременности и родов, увеличению материнской и детской смертности. Причины снижения активности яичников у женщин до 40 лет сложны, и зачастую представляют собой сочетание психических, токсических, инфекционных, и генетических факторов [1]. Таким образом актуальной является разработка своевременных профилактических и лечебных мероприятий, позволяющих снизить риск, или, в некоторых случаях, избежать необратимых поражений репродуктивной системы.

Различные экспериментальные модели овариального дефицита, вызванные радиационным воздействием, индуцируемые стрессом, алкилирующими и другими токсическими агентами, удобны для изучения воздействия новых лекарственных средств и способов предупреждения развития и лечения овариального дефицита. Оценка эффективности защитного действия различных средств на репродуктивную систему в эксперименте является длительным, комплексным, дорогим и трудоемким процессом. В нашей работе мы изучали возможность косвенной оценки активности протекторных средств, которая позволила бы проводить предварительные скрининговые исследования фармакологической активности с наименьшими потерями.

В качестве метода оценки воздействия исследуемых факторов был выбран микроядерный тест эритроцитов периферической крови. Микроядра – хроматиновые образования, находящиеся внутри клетки. Они могут появляться в результате отставания отдельных хромосом и их фрагментов, могут образовываться также в

результате деструкции ядра и апоптоза клетки или в процессе освобождения клетки от лишнего хроматина, после мутационного воздействия. В микроскопе микроядра видны как небольшие округлые, без острых граней, но с четким контуром, густо окрашенные тельца. Находятся микроядра обычно ближе к периферии в фокусе, когда четко виден контур эритроцитов [2].

Микроядерный тест является общепринятым цитогенетическим методом оценки мутагенного действия агентов различной природы. С его помощью проводится тестирование на мутагенную активность большого числа химических, физических и биологических агентов, тест применяется уже на первом этапе проверки потенциальных мутагенов и канцерогенов. Нашел свое применение данный тест и в различных областях практической медицины, исследований теоретического и прикладного характера [3-7].

Таким образом целью данного исследования явилось сравнение экспериментальных моделей овариального дефицита с помощью микроядерного теста эритроцитов периферической крови крыс.

**Материал и методы исследования.** Все манипуляции с животными выполнялись в соответствии с принципами биоэтики, правилам лабораторной практики (GLP) и этическим нормам, изложенным «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985).

В эксперименте участвовало 54 половозрелых самок крыс породы Wistar массой 155-165 г., которых разделили на 3 группы: 1) контрольная группа, 2) группа, подвергшаяся облучению, 3) группа, подвергшаяся действию циклофосфамида.

Для выявления случайной беременности, крысы прошли 21-дневный карантин. В ходе эксперимента животные находились в условиях стандартного светового режима дня, на классическом пищевом рационе (гранулированный корм), без ограничения доступа к воде. В течение 21 дня карантина и на протяжении всего эксперимента у всех крыс изучали эстральный цикл. Мазок забирали пластиковой пипеткой, содержащей 0,1 мл изотонического раствора натрия хлорида. Троекратный смыв из влагалища наносили на предметное стекло. Мазки 5-6 минут фиксировали смесью (1:1) эфира диэтилового и спирта, и затем окрашивали метиленовым синим. Краситель смывали водой спустя 20 мин, препарат на 1-2 часа оставляли для подсушки на воздухе. Далее под микроскопом (ОАО «ЛОМО», г. Санкт-Петербург) изучали мазок, определяя фазы эстрального цикла по составу клеток содержимого влагалища. Полученные данные сравнивали в фазах ЭЦ проэструс / эструс и диэструс  $\frac{1}{2}$ .

Изучение эстрального цикла крыс до начала эксперимента показало наличие у 80 % животных нормального овуляторного цикла, включающего 4 фазы: диэструс (стадия покоя, или межтечки); проэструс (стадия подготовки к течке, или предтечки); эструс (течка); метэструс (стадия послетечки). Животных с отсутствием регулярного эстрального цикла (6 крыс) исключили из эксперимента. Для воспроизведения

овариального дефицита было выбрано две модели. Для моделирования циклофосфамид-индуцированного дефицита (ЦИОД) животным вводили циклофосфамид внутривентриально однократно в дозе 200 мг/кг в первый день, и затем в дозе 8 мг/кг в день последующие 14 дней.

Альтернативной моделью служил овариальный дефицит, индуцированный облучением животных (ГИОД), на гамма-терапевтическом аппарате Teragam, источник Кобальт-60, однократная доза 3,2 Гр.

Изучаемые антиоксидантные композиции вводились во всех группах животных ежедневно перорально через зонд, в объеме 0,5 мл на протяжении 14 дней до начала моделирования овариального дефицита.

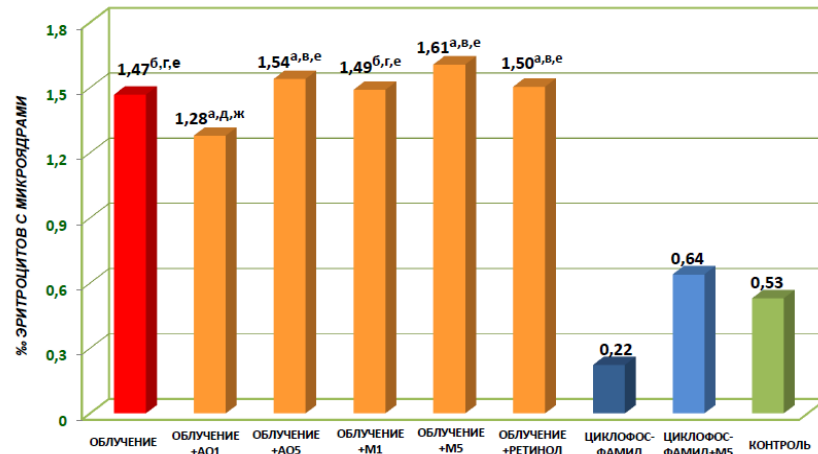
В конечной точке эксперимента животные подвергались эвтаназии, кровь брали из брюшной аорты.

Для оценки генетической стабильности крыс с помощью микроядерного теста взятие периферической крови проводили в остром опыте на крысах. После чего мазок наносился на чистое сухое предметное стекло и фиксировался в 96-% этиловом спирте 1-2 минуты. Окрашивание препарата осуществляли азур-эозином по Романовскому-Гимза. От каждого животного было взято по 2 препарата, то есть опыт проводился в двух повторностях. Препараты анализировали с помощью светового микроскопа при увеличении  $100\times 1,5\times 10$ . На каждом препарате было просмотрено не менее 3000 эритроцитов и вычислена частота встречаемости эритроцитов с микроядрами как отношение числа клеток с микроядрами к общему числу проанализированных клеток (в %) [2].

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета статистических программ «Stadia». Сравнение медиан выборок осуществляли с использованием непараметрического X-критерия Ван-дер-Вардена, так как распределение частоты встречаемости клеток с микроядрами не подчиняется нормальному закону. Процедура группировки данных и их обработка изложены в работе Кулаичева [8].

**Полученные результаты и их обсуждение.** В результате проведенных исследований было показано, что овариальный дефицит, индуцированный облучением животных, оказывает влияние на генетическую стабильность животных. Так в периферической крови облученных животных было выявлено более высокое содержание эритроцитов с микроядрами ( $1,47\pm 0,08$ ), чем в контрольной группе животных, не подвергавшихся облучению ( $0,53\pm 0,04$ ) ( $P<0,01$ ) (рис. 1). Следует отметить, что введение антиоксидантных композиций после облучения не вызвало достоверного снижения частоты эритроцитов с микроядрами. При этом выявлено, что у крыс, подвергавшихся воздействию после облучения антиоксидантной композицией АО1 было меньше эритроцитов с нарушениями ( $1,28\pm 0,20$ ), чем у крыс, которые после облучения подверглись воздействию сложной антиоксидантной композицией М5 ( $1,61\pm 0,08$ ) ( $P<0,05$ ).

Влияния циклофосфида на частоту встречаемости эритроцитов с микроядрами зарегистрировано не было.



**Рис. 2. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови крыс под воздействием различных факторов**

Обозначения:

*а* – различие с частотой встречаемости эритроцитов с микроядрами у группы, подвергшейся воздействию циклофосфида, достоверно ( $P < 0,05$ ); *б* – различие с частотой встречаемости эритроцитов с микроядрами у группы, подвергшейся воздействию циклофосфида, достоверно ( $P < 0,01$ ); *в* – различие с частотой встречаемости эритроцитов с микроядрами у группы, подвергшейся воздействию циклофосфида и антиоксидантной композиции М5, достоверно ( $P < 0,05$ ); *г* – различие с частотой встречаемости эритроцитов с микроядрами у группы, подвергшейся воздействию циклофосфида и антиоксидантной композиции М5, достоверно ( $P < 0,01$ ); *д* – различие с частотой встречаемости эритроцитов с микроядрами в контрольной группе достоверно ( $P < 0,05$ ); *е* – различие с частотой встречаемости эритроцитов с микроядрами в контрольной группе достоверно ( $P < 0,01$ ); *ж* – различие с частотой встречаемости эритроцитов с микроядрами у группы, подвергшейся воздействию облучения и антиоксидантной композиции М5, достоверно ( $P < 0,05$ ).

**Выводы.** Таким образом можно заключить, что гамма-индуцированное облучение оказывает более сильное негативное влияние на генетическую стабильность организма, чем циклофосфамид-индуцированное воздействие. Модулирующего влияния антиоксидантных композиций сложного состава при этом не отмечено. Мы можем рекомендовать микроядерный тест периферической крови, как метод сравнения экспериментальных моделей овариального дефицита крыс.

#### Литература.

1. Джамалудинова, А. Ф. Репродуктивное здоровье населения России / А. Ф. Джамалудинова, М. М. Гонян // Молодой ученый. – 2017. – № 14.2 (148.2). – С. 10-13.
2. Ильинских Н.Н. Микроядерный анализ в оценке цитогенетической нестабильности / Н.Н. Ильинских, А.С. Ксенц, Е.Н. Ильинских и [др.] –Томск. – Изд-во ТГПУ, 2011. – 312 с.
3. Калаев В.Н. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в крови перепела японского (*coturnix japonica*) при разных способах окрашивания / Калаев В.Н., Игнатова И.В., Н.В. Климова // Фундаментальные исследования. – 2013. – № 10 (4). – С. 770-775
4. Ибрагимова М.Я. Генетические эффекты лекарственных препаратов-модуляторов липидного обмена / М.Я. Ибрагимова, В.В. Семенов, Я.Х. Ибрагимов и [др.] // Гены и Клетки. – 2014. Т. 9. № 3-2. – С. 199-203.
5. Ильинских Н.Н. Цитогенетические последствия возрастания содержания дофамина в крови вахтовых рабочих нефтепромыслов севера Сибири / Н.Н. Ильинских, А.Е. Янковская, Е.Н. Ильинских и [др.] // Современные проблемы науки и образования. – 2015. – № 5. – С. 65
6. Калаева Е.А. Метиленовый синий регулирует спонтанный мутационный процесс в

соматических клетках мышей линии C57BL/6. / Калаева Е.А., Калаев В.Н., Ефимова К.А. и [др.] // Вестник Воронежского государственного университета инженерных технологий. – 2017. – Т. 79, №3. – С. 180-186.

7. Томилин Н.В. Оценка генотоксического и цитотоксического действия известных мутагенов (тилметансульфоната, митомицина с и циклофосфамида) с помощью микроядерного теста на лимфоцитах и ретикулоцитах крови человека и белой крысы / Томилин Н.В., Филько О.А., Храброва А.В. и [др.] // Medline.ru. Российский биомедицинский журнал. – 2017. – Т. 18. № 1. – С. 90-101

8. Кулаичев А.П. Методы и средства комплексного анализа данных. – М.: ФОРУМ: ИНФА-М, 2006. – 512 с.

**Abstract.**

**M.S. Nechaeva, N.S.Preobrazhenskaya, N.Yu. Gudkov, D.E. Shchedrin**

**THE INFLUENCE OF ANTIOXIDANTS ON THE INDUCTION OF MICRONUCLEI IN RATS' BLOOD ERYTHROCYTES IN CHEMOTHERAPY AND GAMMA IRRADIATING**

*Voronezh State Medical University named after N.N. Burdenko*

The possibility of indirect evaluation of the activity of means of protection on the reproductive system by means of micronuclear test of rat peripheral blood erythrocytes, which allows preliminary screening studies of pharmacological activity with the least loss has been studied. The goal of research was the comparison of experimental models of ovarian deficiency using a micronuclear test of rat peripheral blood erythrocytes. The result of the studies showed that ovarian deficiency induced by irradiation influences the genetic stability of animals. In the peripheral blood of irradiated animals a higher content of erythrocytes with micronuclei was detected than in the control group of animals that were not exposed to radiation. The modulating effect of antioxidant compositions of complex structure was not observed. We recommend the micronuclear test of peripheral blood as a method of comparing experimental models of rat ovarian deficiency.

**Keywords:** micronuclei, red blood cell, ovarian deficiency, reproductive health, peripheral blood

**References.**

1. Dzhamaludinova, A. F. Reproductive health of the population of Russia / A. F. Dzhamaludinova, M. M. Gonyan // Young scientist. - 2017. - No. 14.2 (148.2). - S. 10-13.

2. Ilyinsky N.N. Micronuclear analysis in the assessment of cytogenetic instability / N.N. Ilyinsky, A.S. Xenz, E.N. Ilyinsky [et al.] –Tomsk. - Publishing House of TSPU, 2011. -- 312 p.

3. Kalaev V.N. The frequency of erythrocytes with micronuclei in the blood of japanese quail (coturnix japonica) at different ways of coloring / Kalayev V.N., Ignatova I.V., N.V. Klimova // Fundamental research. - 2013. - No. 10 (4). - S. 770-775

4. Ibragimova M.Ya. Genetic effects of medicines – lipid exchange modulators / M.Ya. Ibragimova, V.V. Semenov, Y.Kh. Ibragimov [et al.] // Genes and Cells. - 2014. Т. 9. No. 3-2. - S. 199-203.

5. Ilyinsky N.N. Cytogenetic effects of the peripheral blood high dopamine levels in shift workers of oil fields of the northern Siberia/ NN Ilyinsky, A.E. Yankovskaya, E.N. Ilyinsky [et al.] // Modern problems of science and education. - 2015. - No. 5. - S. 65

6. Kalaeva EA Methylene blue regulates spontaneous mutation process in somatic cells of C57BL/6 mice /. [et al.] // Bulletin of the Voronezh State University of Engineering Technologies. - 2017. - Т. 79, No. 3. - S. 180-186.

7. Tomilin N.V. Evaluation of genotoxicity and cytotoxicity of known mutagens (ethylmethanesulfonate, mitomycin c and cyclophosphamide) with the lymphocyte micronucleus cytokinesis-block assay and the reticulocyte micronucleus test in human blood and white rat / Tomilin N.V., Filko O.A., Khrabrova A.V. [et al.] // Medline.ru. Russian Biomedical Journal. - 2017. - Т. 18. No. 1. - S. 90-101

8. Kulachev A.P. Methods and tools for the analysis of complex data. - М.: FORUM: INFA-М, 2006. - 512 p.

**Сведения об авторах:** Нечаева Марина Сергеевна – к.б.н., асс. каф. нормальной физиологии ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, e-mail: msnechaeva2017@gmail.com; Преображенская Наталья Сергеевна – к.м.н., доц. каф. фармакологии ВГМУ им.Н.Н.Бурденко, e-mail: nspre@yandex.ru; Гудков Никита Юрьевич – студент

ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, e-mail: Nikita.gudck@yandex.ru; Щедрин Даниил Евгеньевич – студент ВГМУ им. Н.Н. Бурденко, e-mail: deShchedrin@gmail.com.

Цитировать: Влияние антиоксидантов на индукцию микроядер в эритроцитах крови крыс при воздействии гамма-облучении / М.С. Нечаева, Н.С. Преображенская, Н.Ю. Гудков, Д.Е. Щедрин // Научно-медицинский вестник Центрального Черноземья. – 2020. – № 80. – С.56-61.