

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ  
RESEARCH METHODS

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Голубенцева Ю.В., Попов В.Б., Бельтюков П.П.

**Оценка повреждений ДНК в клетках сперматогенного эпителия мышей DBA/2 и C57Bl/6 в условиях изолированного воздействия доксорубина *in vivo* и после прекондиционирования  $\beta$ -нафтофлавоном по данным иммунофлуоресцентного анализа  $\gamma$ H2AX**

ИГП «Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии и экологии человека»

Федерального медико-биологического агентства, 188663, Ленинградский регион, г. п. Кузьмоловский, Российская Федерация

## РЕЗЮМЕ

**Введение.** Доксорубин (Докс) – антрациклиновый антибиотик, цитотоксическое действие которого обусловлено интеркалирующим и алкилирующим эффектами при взаимодействии с ДНК. Последствиями повреждения ДНК являются двунитевые разрывы.  $\beta$ -нафтофлавоны ( $\beta$ NF) – синтетический флавоноид, агонист арилгидрокарбонового рецептора (AhR), способствующий трансактивации цитохромов CYP1A, в том числе CYP1A1 – цитохрома, участвующего в метаболизме полиароматических углеводородов (ПАУ). Активность CYP1A1 определяет скорость образования реакционноспособных метаболитов ПАУ и степень повреждения ДНК в клетках. Считается, что метаболизм Докс происходит с участием многих ферментов, в том числе CYP3A4 и CYP2D6. Инбредные мыши C57Bl/6 и DBA/2 характеризуются особенностями AhR, которые определяют различия ответа животных разных линий на токсическое воздействие ПАУ.

**Цель исследования** – оценка степени повреждений ДНК в клетках сперматогенного эпителия, по данным иммунофлуоресцентного анализа фосфорилированного гистона  $\gamma$ H2AX, у самцов мышей двух инбредных линий, различающихся индуцибельностью AhR, при воздействии агониста AhR ( $\beta$ NF) и Докс.

**Материал и методы.** На самцах мышей линий DBA/2 и C57Bl/6 выполнена оценка токсического воздействия Докс на сперматогенный эпителий после однократного внутрибрюшинного введения (в/б) в дозе 10 мг/кг. Половина экспериментальных животных каждой линии получала  $\beta$ NF (50 мг/кг, в/б) в течение 4 дней, предшествующих введению Докс. Оценка повреждений ДНК в клетках семенника дана по результатам иммунофлуоресцентного анализа на биомаркер  $\gamma$ H2AX.

**Результаты.** По результатам качественной и количественной оценки повреждений ДНК в клетках сперматогенного эпителия, по данным иммунофлуоресцентного анализа биомаркера  $\gamma$ H2AX, показаны различия в ответе мышей двух использованных линий на воздействие Докс. Прекондиционирование животных с использованием  $\beta$ NF способствует статистически значимому росту доли клеток с двойными разрывами ДНК в семенниках самцов линии C57Bl/6, и не оказывает влияния на увеличение доли таких клеток у самцов DBA/2.

**Ограничения исследования.** Исследование выполнено с применением иммунофлуоресцентного анализа для целей качественной и количественной оценки повреждений ДНК в клетках сперматогенного эпителия после воздействия токсических агентов на подопытных мышей *in vivo* и не позволяет учесть все возможные эффекты исследуемых веществ на процессы, протекающие в семенниках мыши.

**Заключение.** Результаты выполненного исследования позволяют говорить о наличии связи между прекондиционированием животных путём введения  $\beta$ NF и ростом доли клеток с повреждениями ДНК в семенниках мышей C57Bl/6. Для линии DBA/2 подобной взаимосвязи не выявлено. Учитывая множественные механизмы действия  $\beta$ NF на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков, выявленные отличия в ответах мышей двух линий на токсическое воздействие Докс после прекондиционирования  $\beta$ NF могут объясняться не только пониженной индуцибельностью AhR, характерной для линии DBA/2, но и неочевидными эффектами, связанными с воздействием  $\beta$ NF на другие белковые мишени у генетически отличающихся животных.

**Ключевые слова:** доксорубин; сперматогенный эпителий; двунитевые разрывы;  $\gamma$ H2AX

**Соблюдение этических стандартов.** Получено положительное заключение комиссии по биомедицинской этике ФГУП НИИ ГПЭЧ ФМБА России (Протокол № 2 от 16 декабря 2022 г.).

**Для цитирования:** Голубенцева Ю.В., Попов В.Б., Бельтюков П.П. Оценка повреждений ДНК в клетках сперматогенного эпителия мышей DBA/2 и C57Bl/6 в условиях изолированного воздействия доxorубина и после прекодиционирования  $\beta$ -нафтофлавоном по данным иммунофлуоресцентного анализа  $\gamma$ H2AX. *Токсикологический вестник*. 2025; 33(5): 372–379. <https://elibrary.ru/edidss> <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2025-33-5-372-379>

**Для корреспонденции:** Голубенцева Юлия Васильевна, e-mail: yul9olub@yandex.ru

**Участие авторов:** Голубенцева Ю.В. – сбор материала, статистический анализ, написание текста; Попов В.Б. – концепция и дизайн исследования, написание текста, редактирование; Бельтюков П.П. – анализ и интерпретация данных, редактирование текста. *Все соавторы* – утверждение окончательного варианта статьи, ответственность за целостность всех частей статьи.

**Финансирование.** Исследование не имело спонсорской поддержки.

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

Поступила в редакцию: 21 августа 2025 / Поступила после исправления: 16 сентября 2025 / Принята в печать: 02 октября 2025 / Опубликовано: 19 ноября 2025

Yulia V. Golubentseva, Vadim B. Popov, Petr P. Beltyukov

## Assessment of DNA damage according to the data of $\gamma$ H2AX immunofluorescence analysis in the spermatogenic epithelium cells of DBA/2 and C57Bl/6 mice under conditions of isolated exposure to doxorubicin *in vivo* and after preconditioning with $\beta$ -naphthoflavone

Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad Region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation

### ABSTRACT

**Introduction.** Doxorubicin (Dox) is an anthracycline antibiotic whose cytotoxic action arises from its intercalating and alkylating effects upon interaction with DNA, leading to double-strand breaks.  $\beta$ -naphthoflavone ( $\beta$ NF) is a synthetic flavonoid, an agonist of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) that promotes the transactivation of cytochromes CYP1A, including CYP1A1 – cytochrome, involved in the metabolism of polyaromatic hydrocarbons (PAHs). The activity of CYP1A1 determines the rate of formation of reactive PAH metabolites and the degree of DNA damage in cells. Dox metabolism is believed to involve multiple enzymes, including CYP3A4 and CYP2D6. Inbred C57Bl/6 and DBA/2 mice are characterized by AhR features that determine the differences in the response of animals of different lines to the toxic effects of PAHs.

*The aim of the study* was to assess the degree of DNA damage in spermatogenic epithelial cells according to immunofluorescence analysis of phosphorylated histone  $\gamma$ H2AX in male mice of two inbred strains differing in AhR inducibility when exposed to an AhR agonist ( $\beta$ NF) and Dox.

**Material and methods.** The toxic effects of Dox on the spermatogenic epithelium after a single intraperitoneal injection (i. p.) at a dose of 10 mg/kg were evaluated in male mice of the DBA/2 and C57Bl/6 strains. Half of the experimental animals of each strain received  $\beta$ NF (50 mg/kg, i. p.) for 4 consecutive days before treatment with Dox. Assessment of DNA damage in testicular cells was performed based on the results of immunofluorescence analysis for the  $\gamma$ H2AX biomarker.

**Results.** According to the results of qualitative and quantitative assessment of DNA damage in the cells of the spermatogenic epithelium, based on the immunofluorescence analysis of  $\gamma$ H2AX biomarker, differences in the response of the two murine strains used to the effects of Dox were shown. Preconditioning of animals using  $\beta$ NF contributes to a statistically significant increase in the proportion of cells with double DNA breaks in the testes of males of the C57Bl/6 strain, and does not affect the increase in the proportion of such cells in males of DBA/2.

**Limitations.** The study was performed using immunofluorescence analysis for the purpose of qualitative and quantitative assessment of DNA damage in the cells of the spermatogenic epithelium after exposure to toxic agents in experimental mice *in vivo* and does not allow taking into account all possible effects of the substances studied on the processes occurring in the mouse testes.

**Conclusion.** The results of the study suggest that there is dependence between preconditioning of animals with  $\beta$ NF and an increase in the ratio of cells with DNA damage in the testes of C57Bl/6 mice. No such relationship was found for the DBA/2 mice. Due to the multiplicity of  $\beta$ NF influence on the activity of the xenobiotic metabolism enzymes, the revealed differences in the response of two different strains to Dox exposure after pre-treatment with  $\beta$ NF can be explained not only by the reduced inducibility of AhR in DBA/2 mice, but also by non-obvious effects associated with the effects of  $\beta$ NF on other protein targets in genetically different animals.

**Keywords:** doxorubicin; spermatogenic epithelium; double-strand breaks;  $\gamma$ H2AX

**Compliance with ethical standards.** A positive conclusion was received from the Commission on Biomedical Ethics of the Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the FMBA of Russia. (Protocol No. 2 dated December 16, 2022).

**For citation:** Golubentseva Yu.V., Popov V.B., Beltyukov P.P. Assessment of DNA damage according to the data of  $\gamma$ H2AX immunofluorescence analysis in the spermatogenic epithelium cells of DBA/2 and C57Bl/6 mice under conditions of isolated exposure to doxorubicin *in vivo* and after preconditioning with  $\beta$ -naphthoflavone. *Toksikologicheskii vestnik / Toxicological Review* 2025; 33(5): 372–379. <https://elibrary.ru/edidss> <https://doi.org/10.47470/0869-7922-2025-33-5-372-379>

**For correspondence:** Yulia V. Golubentseva, e-mail: yul9olub@yandex.ru

**Authors' contribution:** Golubentseva Yu.V. – collecting material, statistical analysis, text writing; Popov V.B. – research concept and design, text writing, editing; Beltyukov P.P. – data analysis and interpretation, text editing. All co-authors are responsible for approving the final version of the article and ensuring the integrity of all parts of the article.

**Conflict of interests.** The authors declare that there is no conflict of interests.

**Funding.** The study had no sponsorship.

Received: August 21, 2025 / Revised: September 16, 2025 / Accepted: October 2, 2025 / Published: November 19, 2025

## Введение

Доксорубин (Докс), как и большинство противоопухолевых химиотерапевтических лекарственных средств, оказывает влияние не только на опухолевые, но и на здоровые клетки, в том числе и на клетки системы репродукции [1, 2]. Цитотоксическое действие Докс обусловлено его интеркалирующим и алкилирующим действием на ДНК. Изменения структуры ДНК приводят к нарушению транскрипции, ингибированию топоизомеразы II, активации белка p53 и, как следствие, могут приводить к образованию двуцепочечных разрывов [3, 4].

В ранних работах по исследованию влияния цитотоксических препаратов, в том числе Докс, было выявлено, что наиболее чувствительными к апоптозу оказались сперматогонии, первичные и вторичные сперматоциты [5]. В 2015 г. S.K. Sah с соавторами [6] показал, что Докс в дозе 10 мг/кг при внутрибрюшинном введении на 14-е и 56-е сутки после воздействия приводит к уменьшению числа клеток базального слоя эпителия семенных канальцев, вакуолизации этих клеток и уменьшению количества сперматозоидов у взрослых крыс. Через 112 сут наблюдали атрофию семенных канальцев. V. Vendramini с соавторами [7, 8] продемонстрировал, что после воздействия доксорубина на препубертатных крыс, в их семенниках увеличивается доля сперматозоидов с высоким уровнем повреждений ДНК.

$\beta$ -нафтофлавоноид ( $\beta$ NF) – синтетический флавоноид, который является агонистом арилгидрокарбонового рецептора (AhR) и опосредованно активирует цитохромы (CYP450), преимущественно CYP1A1, осуществляющие метаболизм полиароматических углеводородов (ПАУ), например, 3,4-бенз[а]пирен, 3-метилхолантрен и подобные им соединения. В результате окислительных реакций ПАУ превращаются в разные продукты, обладающие мутагенными, тератогенными и канцерогенными свойствами. Имеются сведения о способности  $\beta$ NF повышать активность ряда ферментов метаболизма ксенобиотиков, среди которых есть и ферменты, участвующие в превращениях Докс (EC1.6.5.2. – NADPH дегидрогеназа (хинон редуктаза)). Кроме этого, имеются сообщения о синергизме  $\beta$ NF и Докс при воздействии на опухолевые клетки рака лёгкого, который способствует усилению апоптоза [9].

Двунитевые разрывы ДНК (ДР) являются частым явлением после воздействия повреждающих факторов и представляют реальную угрозу для стабильности генома не только соматических, но и половых клеток. Пролиферирующие клетки семенника являются основной мишенью цитотоксических препаратов [9–11], однако механизмы, посредством которых происходит развитие тестикулярной токсичности при действии Докс, нельзя считать в полной мере изученными. Двунитевые разрывы сопровождаются фосфорилированием гистона H2AX по остаткам серина 136 и 139,

<https://doi.org/10.47470/0869-7922-2025-33-5-372-379>  
Оригинальная статья

$\gamma$ H2AX — это фосфорилированный вариант гистона H2AX [12, 13]. Считается, что уровень фосфорилирования гистона  $\gamma$ H2AX (по серину 139) является достаточно точным показателем уровня повреждения ДНК в клетке. Выявление фокусов двуниевых разрывов ДНК возможно путём иммунофлуоресцентного анализа с использованием антител на биомаркер  $\gamma$ H2AX [14–16].

*Цель исследования* — оценка степени повреждений ДНК в клетках сперматогенного эпителия, по данным иммунофлуоресцентного анализа фосфорилированного гистона  $\gamma$ H2AX, у самцов мышей двух инбредных линий, различающихся индуцибельностью AhR, при воздействии агониста AhR ( $\beta$ NF) и Докс.

## Материал и методы

Работа выполнена на самцах инбредных мышей DBA/2 и C57Bl/6, полученных из питомника лабораторных животных Филиала ИБХ РАН в г. Пушкино. Содержание и кормление лабораторных животных, выведение животных из эксперимента осуществляли в соответствии с ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными» от 2016 г.

Масса тела самцов C57Bl/6 в начале эксперимента составляла 20–25 г, самцов линии DBA/2 — 19–23 г. Мыши содержались в клинике экспериментальных животных при температуре  $20 \pm 3$  °C и относительной влажности от 40 до 50% при искусственном освещении в режиме день/ночь — 12/12 ч. При кормлении использовали полнорационный корм для грызунов «Чара», при условии свободного доступа к воде. В одной клетке содержали не более 5 самцов. Выведение животных из эксперимента осуществляли методом цервикальной дислокации.

*Исследуемые вещества и их применение in vivo.* Докс вводили самцам внутрибрюшинно (в/б) в дозе 10 мг/кг однократно. Часть экспериментальных животных до введения Докс в течение 4 предшествующих дней подвергали прекодиционированию путём введения  $\beta$ NF в/б в дозе 50 мг/кг. После заключительной инъекции  $\beta$ NF однократно вводили Докс в указанной выше дозе.

*Экспериментальные группы.* В каждую группу были включены по 9 самцов:

- 1-я группа — интактный контроль C57Bl/6;
- 2-я группа — мыши C57Bl/6 после изолированного воздействия Докс;
- 3-я группа — мыши C57Bl/6  $\beta$ NF+Докс;
- 4-я группа — интактный контроль DBA/2;
- 5-я группа — мыши DBA/2 после изолированного введения Докс;
- 6-я группа — мыши DBA/2  $\beta$ NF+Докс.

Семенники (от 3 самцов из каждой группы) забирали при эвтаназии животных через 1, 9 и 18 сут после воздействия Докс.

Количественный и качественный иммунофлуоресцентный анализ выполняли на клеточной суспензии сперматогенного эпителия, а также на парафиновых срезах семенников. Семенники фиксировали в 10% забуференном формалине. Парафиновые срезы изготавливали по стандартной методике, толщина среза 4 мкм [17]. Цитологические препараты из клеточной суспензии семенников фиксировали 4% раствором формалина в забуференном фосфатом физиологическом растворе (PBS) в течение 15 мин с последующей инкубацией в охлаждённом 70% этаноле (минус 20 °C), 5 мин.

*Непрямой иммунофлуоресцентный анализ на маркер  $\gamma$ H2AX.* Фиксированные препараты отмывали в PBS, обрабатывали 0,5 % Тритоном X-100 в PBS в течение 15 мин и ополаскивали в PBS. Для блокирования неспецифического связывания антител препараты инкубировали в 5% растворе бычьего сывороточного альбумина (BSA, Sigma, США) в PBS в течение 20 мин при комнатной температуре. Антитела растворяли в 1% растворе BSA, между инкубациями стёкла отмывали в течение 15 мин в PBS. Клетки инкубировали с первичными мышинными моноклональными антителами против  $\gamma$ H2AX (Millipore, США, 1:100) в течение 1 ч при 37 °C. Далее инкубировали со вторыми поликлональными антителами (козы антитела к IgG мыши, конъюгированные с Alexa Fluor-488 — Molecular Probes, США, 1:1000) в течение 1 ч при 37 °C. Промывали препараты раствором PBS в течение 15 мин. Далее препарат монтировали под покровное стекло с 10 мкл монтирующей жидкости Vectoshild, содержащей контрастирующий ДНК-связывающий краситель DAPI для выявления клеточных ядер.

По этой же методике окрашивали парафиновые срезы семенников, предварительно проведя этапы депарафинизации и дегидратации, по стандартному протоколу для гистохимического окрашивания парафиновых срезов.

Препараты анализировали на флуоресцентном микроскопе Zeiss AXIO Imager.A2 с использованием фильтров DAPI и Green и программного обеспечения при общем увеличении  $\times 400$ . На каждом препарате анализировали не менее 300 клеток.

Статистическую обработку данных производили на основе сравнения средних значений количественных показателей, определённых для образцов из различных групп, используя непараметрический критерий Манна–Уитни ( $U$ ) и ПО Prizm 5 v.5.04 (GraphPad Software. Inc.).

## Результаты

**Иммунофлуоресцентный качественный анализ клеток сперматогенного эпителия мыши на биомаркер  $\gamma$ H2AX.** По паттерну распределения  $\gamma$ H2AX всю популяцию клеток можно разделить на несколько групп: клетки с единичными фокусами, клетки с большими фокусами, клетки с большим количеством мелких фокусов, сильное гомогенное окрашивание всей клетки (пан-окрашивание) или части клетки (рис. 1, см. на вклейке).

Спонтанные двойные разрывы ДНК в клеточной суспензии семенников контрольных мышей выявлены в небольшой доле клеток (2–7%). Позитивными по фокусам  $\gamma$ H2AX оказались следующие типы клеток: сперматоциты на разных стадиях мейоза (точечные фокусы или половые пузырьки пахитенных сперматоцитов), сперматиды удлинённые и интерстициальные клетки семенных канальцев. Считается, что репарация ДНК возможна при немногочисленных разрывах цепей ДНК.

В клеточной суспензии семенников контрольных мышей линии C57Bl/6 выявлены немногочисленные  $\gamma$ H2AX-положительные ядра, со слабой выраженностью фокусов (рис. 2, а, б, см. на вклейке), что согласуется с литературными данными других исследовательских групп [14, 11].

Через 1 сут после воздействия Докс в клетках сперматогенного эпителия мышей C57Bl/6 наблюдали яркое свечение, характеризующее наличие многочисленных разрывов ДНК. По характеру распределения – диффузное (гомогенное) окрашивание удлинённых сперматид, слабое окрашивание полового пузырька сперматоцитов, пан-окрашивание сперматогоний и удлинённых сперматид (рис. 3, а–в, см. на вклейке). В группах, где воздействию Докс предшествовало введение  $\beta$ -NF, через 1 сут после введения Докс регистрировалось сильное гомогенное окрашивание сперматогоний и прелептотенных сперматоцитов, в канальцах на определённых стадиях развития выявляется пан-окрашивание, в пахитенных сперматоцитах окрашиваются только половые пузырьки. Также наблюдали позитивное гомогенное окрашивание единичных клеток в популяции удлинённых сперматид.

Иными словами, визуальная оценка повреждёний ДНК по маркеру  $\gamma$ H2AX позволяет говорить о существенных различиях между образцами, полученными от мышей C57Bl/6 после обработки  $\beta$ -NF+Докс в сравнении с группой, обработанных только Докс. Анализ клеток в суспензии и срезов семенников мышей линии DBA/2 через 1 сут после воздействия показал схожий характер повреждёний ядер сперматогоний и сперматоцитов.

На 9-е сутки после воздействия Докс у мышей C57Bl/6 ( $\beta$ NF+Докс) выявлялись позитивно окрашенные на  $\gamma$ H2AX клетки с разным характером распределения: клетки с единичными фокусами, с рассеянной флуоресценцией, клетки с пан-ядерным окрашиванием, клетки с апоптотическим кольцом вокруг ядра, с окрашиванием половых тел сперматоцитов I (рис. 4, а, б, см. на вклейке). Значительную часть повреждённых клеток составляют пахитенные сперматоциты, круглые и удлинённые сперматиды с апоптотическим кольцом. В образцах группы Докс (без  $\beta$ NF) этой линии мышей нет клеток с единичными фокусами  $\gamma$ H2AX, при этом в удлинённых сперматиде и в половых пузырьках пахитенных сперматоцитов имеется флуоресценция средней интенсивности при практически полном повреждении ядер. У мышей DBA/2 ( $\beta$ NF+Докс) на этом же сроке, также, как и у C57Bl/6 наблюдается увеличение повреждений мейотических клеток и удлинённых сперматид. У всех животных после введения  $\beta$ NF выявлено отсутствие сперматоцитов всех стадий мейотического деления. В группе мышей C57Bl/6 после  $\beta$ NF наблюдалось более выраженное повреждение оставшихся ядер к этому сроку – сперматиды круглые и удлиняющиеся и клетки Лейдига.

На 18-е сутки после воздействия Докс в клетках семенника мышей линий C57Bl/6 и DBA/2 были выявлены клетки с полным окрашиванием ядер – удлинённые сперматиды с полным окрашиванием ядер. Кроме того, в семенниках мышей C57Bl/6 регистрировали круглые сперматиды с единичными фокусами  $\gamma$ H2AX (рис. 5, а, б, см. на вклейке). У всех животных после преколонизации с использованием  $\beta$ -NF наблюдали отсутствие сперматоцитов всех стадий мейотического деления. У мышей C57Bl/6 ( $\beta$ NF+Докс) к этому сроку наблюдали более выраженное повреждение оставшихся ядер в круглых и удлиняющихся сперматиде и в клетках Лейдига. Наблюдаемые изменения в клетках свидетельствует об апоптотическом характере повреждения. Отмечено появление множественных фокусов в сперматогониях, по-видимому, сформированных *de novo*.

**Иммунофлуоресцентный анализ клеток семенника на биомаркер  $\gamma$ H2AX для количественной оценки доли клеток с повреждениями ДНК.** В таблице приведены результаты подсчёта клеток с повреждениями ДНК в суспензии семенника.

Как видно из таблицы, уже через 1 сут после введения Докс показан значительный рост доли клеток с повреждённой ДНК (по маркеру  $\gamma$ H2AX) как в группе Докс, так и в группе  $\beta$ NF+Докс. При

**Количественная оценка доли клеток с повреждениями ДНК по маркеру  $\gamma$ H2AX**  
**Quantitative evaluation of cell percentage with DNA damage using  $\gamma$ H2AX marker**

Период Period	Группа Group	C57Bl/6, %	DBA/2, %	p (C57Bl vs DBA)
–	Контроль / Control	7.6±1.2	4.5±0.9	0.077
1-е сутки / 1 <sup>th</sup> day	Докс / Dox	11.6±0.8	14.1±1.7	0.500
	$\beta$ NF+Докс / $\beta$ NF+Dox	16.7±0.9	15.8±1.4	0.200
9-е сутки / 9 <sup>th</sup> days	Докс / Dox	11.4±1.7	8.2±0.8	0.134
	$\beta$ NF+Докс / $\beta$ NF+Dox	12.0±0.9**	11.2±1.1	0.234
18-е сутки / 18 <sup>th</sup> days	Докс / Dox	14.2±1.6	13.6±1.2	0.857
	$\beta$ NF+Докс / $\beta$ NF+Dox	17.2±2.1**	10.9±0.7*	0.025

*Примечание.* Статистически значимые различия показаны для следующих групп: \* – DBA/2 Докс vs  $\beta$ NF+Докс (18-е сутки),  $p = 0,0249$ ; \*\* – C57Bl/6 группы  $\beta$ NF+Докс – 18-е сутки vs 9-е сутки; 9-е сутки vs 1 сут,  $p = 0,0249$ .

*Note.* Statistically significant differences are shown for the following groups: \* – DBA/2 Dox vs  $\beta$ NF+Dox (18th day),  $p = 0.0249$ ; \*\* – C57Bl/6 group of the  $\beta$ NF+ Dox – 18<sup>th</sup> day vs 9<sup>th</sup> day; 9<sup>th</sup> day vs 1st day,  $p = 0.0249$ .

этом существенной разницы между линиями экспериментальных животных через 1 сут после введения Докс не выявлено. К концу эксперимента, на 18-е сутки доля клеток, позитивных по биомаркеру  $\gamma$ H2AX в сперматогенном эпителии мышей C57Bl/6, существенно превысила значение, определённое для образцов от мышей DBA/2. При этом визуальная качественная оценка также позволила убедиться в наличии различий.

Для мышей DBA/2 на сроке 18 сут показано, что прекодиционирование  $\beta$ NF приводит к статистически значимому снижению доли клеток, позитивных по  $\gamma$ H2AX, а у мышей линии C57Bl/6, напротив, доля повреждённых клеток в исследованной суспензии семенников возрастает или, по крайней мере, не снижается.

**Обсуждение**

Известно, что мыши C57Bl/6 обладают генетически обусловленной высокой индуцибельностью AhR и, соответственно, опосредованным AhR повышением экспрессии гена *CYP1A1*, поэтому их чувствительность к воздействию ПАУ является существенно более высокой. У мышей DBA/2 имеется генетически обусловленный вариант AhR, обладающий пониженной индуцибельностью, поэтому их чувствительность к ПАУ существенно ниже, чем у C57Bl/6 [18, 19].

Оценка динамики повреждений ДНК на основе иммунофлуоресцентного анализа  $\gamma$ H2AX в клетках сперматогенного эпителия двух инбредных линий мышей показала, что предобработка животных  $\beta$ NF до воздействия Докс приводит к усилению эффекта повреждения

клеточных ядер у самцов линии C57Bl/6, а у мышей DBA/2 эффект может считаться противоположно направленным. Поскольку в нашем эксперименте в качестве цитотоксического агента, вызывающего повреждение ДНК в клетках семенника, был использован Докс, при анализе полученного результата необходимо учитывать сведения как о путях метаболизма Докс, так и о множественности эффектов  $\beta$ NF. По нашему мнению, снижение уровня повреждений ДНК в клетках семенников мышей DBA/2 может быть обусловлено действием  $\beta$ NF на ферменты метаболизма Докс, активация которых не связана с сигнальным путём, опосредованным AhR. Имеющиеся данные о спектре ферментов метаболизма ксенобиотиков, подверженных эффектам  $\beta$ NF не позволяют дать ответ на вопрос, какие из ферментов метаболизма ксенобиотиков обеспечивают пониженную чувствительность линии DBA/2 к воздействию Докс после прекодиционирования  $\beta$ NF. Как известно,  $\beta$ NF способен индуцировать *CYP1A* по механизму, сопряжённому с ускорением транскрипции с участием AhR. Но для него описаны и другие эффекты, связанные с метаболизмом ксенобиотиков. В частности, известно, что  $\beta$ NF способен активировать и ингибировать отдельные изоферменты цитохромов P450, уридинглюкуронил трансфераз и сульфотрансфераз, однако среди них нет ферментов, традиционно рассматриваемых как ферменты метаболизма Докс, а именно, CYP3A4 и CYP2D6. С учётом множественности механизмов действия  $\beta$ NF на целый ряд ферментов, участвующих в метаболизме ксенобиотиков, различающиеся ответы мышей двух линий на

Доки после прекодиционирования  $\beta$ NF могут пока объясняться только на уровне предположения о наличии у этих линий различий не только обусловленных пониженной индуцибельностью AhR, но и с неочевидными особенностями экспрессии потенциальных белковых мишеней  $\beta$ NF [20, 21].

**Ограничения исследования.** Исследование выполнено с применением иммунофлуоресцентного анализа для целей качественной и количественной оценки повреждений ДНК в клетках сперматогенного эпителия после воздействия токсических агентов на подопытных мышей *in vivo* и не позволяет учесть все возможные эффекты исследуемых веществ на процессы, протекающие в семенниках мыши.

## Заключение

Результаты исследования позволяют говорить о наличии связи между прекодиционированием животных путём введения  $\beta$ NF и ростом доли клеток с повреждениями ДНК в семенниках мышей C57Bl/6. Для линии DBA/2 подобной взаимосвязи не выявлено. Учитывая множественные механизмы действия  $\beta$ NF на активность ферментов метаболизма ксенобиотиков, различные ответы мышей двух линий на воздействие Доки после прекодиционирования  $\beta$ NF могут объясняться не только пониженной индуцибельностью AhR у мышей DBA/2, но и неочевидными эффектами, связанными с воздействием  $\beta$ NF на другие белковые мишени у генетически отличающихся животных.

## ЛИТЕРАТУРА

(пп. 1–3, 5–13, 15–16, 20, 21 см. в References)

4. Рамзанов Б.Р., Хуснутдинов Р.Р., Галембикова А.Р., Дунаев П.Д., Бойчук С.В. Роль белка P53 в ATM и PARP-зависимых путях репарации повреждений ДНК, вызванных ингибитором топоизомеразы II типа. *Казанский медицинский журнал*. 2016; 97(2): 245–9.
14. Литвинов С.В. Основные пути репарации двойных разрывов геномной ДНК и взаимодействие между ними. *Цитология и генетика*. 2014; 48(3): 64–77.
17. Kumar L.G., Rudbeck L. *Руководство. Иммуногистохимические методы*. Москва; 2011.
18. Попов В.Б., Протасова Г.А. Экспериментальная эмбриотоксикология химических веществ *in vitro*. В кн.: Рембовский В.Р., Могиленкова Л.А., ред. *Токсикология, гигиена*,

*профпатология при работе с опасными химическими веществами: информационный сборник № 3*. И: Санкт-Петербург: [б. и.] 2009.

19. Сайтгалина М.А., Попов В.Б. Синтез монооксигеназы CYP1A1 в семенниках и яичниках инбредных линий мышей при токсическом воздействии. В кн.: Рембовский В.Р., ред. *Сборник материалов совместного заседания Санкт-Петербургского отделения Всероссийской общественной организации токсикологов и объединенного Ученого совета ФГУП «НИИ ГПЭЧ» ФМБА России и ФГБУН ИТ ФМБА России, посвященного 100-летию со дня рождения профессора С.Д. Заугольников. Актуальные проблемы токсикологии, гигиены, экологии*. СПб: Изд-во Политехнического университета; 2017.

## REFERENCES

1. Meistrich M.L. Effects of chemotherapy and radiotherapy on spermatogenesis in humans. *Fertil Steril*. 2013; 100(5): 1180–6. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.08.010>
2. Shamberger R.C., Sherins R.J., Rosenberg S.A. The effects of postoperative adjuvant chemotherapy and radiotherapy on testicular function in men undergoing treatment for soft tissue sarcoma. *Cancer*. 1981; 47(10): 2368–74. <https://vk.cc/cQwsDD>
3. Yang F., Kemp C.J., Henikoff S. Anthracyclines induce double-strand DNA breaks at active gene promoters. *Mutat Res*. 2015; 773: 9–15. <https://doi.org/10.1016/j.mrfmmm.2015.01.007>
4. Ramzanov B.R., Husnutdinov R.R., Galemnikova A.R., Dunaev P.D., Bojchuk S.V. The role of the P53 protein in ATM and PARP-dependent DNA damage repair pathways caused by a type II topoisomerase inhibitor. *Kazanskiy medicinskiy zhurnal*. 2016; 97(2): 245–9. <https://doi.org/10.17750/KMJ2016-245> (in Russian).
5. Sjöblom T., West A., Lähdtie J. Apoptotic response of spermatogenic cells to the germ cell mutagens etoposide, adriamycin and diepoxylbutane. *Environ Mol Mutagen*. 1998; 31: 133–48. <https://vk.cc/cQwsRR>
6. Sah S.K., Khataiwada S., Chaudhary D., Jha Ch.B., Bhattacharya S. Doxorubicin Induced Histomorphometric Changes in Testes of Albino Rats. *Nepal Journal of Biotechnology*. 2015; 3(1): 10–4. <https://doi.org/10.3126/njb.v3i1.14223>
7. Vendramini V., Robaire B., Miraglia S.M. Amifostine-doxorubicin association causes long-term prepubertal spermatogonia DNA damage and early developmental arrest. *Hum Reprod*. 2012; 27: 2457–66. <https://doi.org/10.1093/humrep/des159>
8. Cabral R.E.L., Okada F.K., Stumpp T., Vendramini V., Miraglia S.M. Carnitine partially protects the rat testis against the late damage produced by doxorubicin administered during pre-puberty. *Andrology*. 2014; 2: 931–42. <https://doi.org/10.1111/andr.279>
9. Hoang D.H., Song M., Kovale L.M., Tran Q.H., Choe W., Kang I., Kim S.S., Ha J. Betanaphthoflavone and doxorubicin synergistically enhance apoptosis in human lung cancer cells by inducing doxorubicin accumulation, mitochondrial ROS generation, and JNK pathway signaling. *Biochem Biophys Res Commun*. 2022; 635: 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2022.10.015>
10. Silva R.C., Brito D.M.C., Wagner de F.P., Brito-Melo G.E.A., Machado Cr.T., Pedreira M.M. Effect of short- and medium-term toxicity of doxorubicin on spermatogenesis in adult Wistar rats. *Reproductive Biology*. 2018; 18(2): 169–76. <https://doi.org/10.1016/j.repbio.2018.03.002>
11. Habas K., Anderson D., Brinkworth M.H. Germ cell responses to doxorubicin exposure *in vitro*. *Toxicology Letters*. 2017; 265: 70–6. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.016>
12. Brilhante O., Okada F.K., Sasso-Cerri Es., Stumpp T., Miraglia S.M. Late morphofunctional alterations of the Sertoli cell caused by doxorubicin administered to prepubertal rats. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 2012; 10: 1–16. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-10-79>
13. Hoeijmakers J.H.J. DNA repair mechanisms. *Maturitas*. 2001; 38: 17–23. [https://doi.org/10.1016/s0378-5122\(00\)00188-2](https://doi.org/10.1016/s0378-5122(00)00188-2)
14. Litvinov S.V. The main ways of repair of double breaks in genomic DNA and the interaction between them. *Cytologiya i genetika*. 2014; 48(3): 64–77. (in Russian)
15. Bächler S. Detection of  $\gamma$ H2AX foci in animal tissue. *Report*. 2012; 1–22.
16. Hamer G., Roepers-Gajadien H.L., van Duyn-Goedhart A., Gademan I.S., Kal H.B., van Buul P.P.W. et al. DNA Double-Strand Breaks and  $\gamma$ H2AX signaling in the Testis. *Biology of reproduction*. 2003, 68: 628–34. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.102.008672>
17. Kumar L.G., Rudbeck L. *Guide. Immunohistochemical methods [Руководство. Иммуногистохимические методы]*. Moscow; 2011. (in Russian)
18. Попов В.Б., Протасова Г.А. Экспериментальная эмбриотоксикология химических веществ *in vitro*. In: Рембовский В.Р., Могиленкова Л.А., ред. *Toxicology, hygiene, occupational pathology when working with dangerous chemicals: an information collection, No. 3. [Токсикология, гигиена, профпатология при работе с опасными химическими веществами: информационный сборник № 3]*. I:S-Pb: St. Petersburg: [b. i.]; 2009, 372. (in Russian)
19. Сайтгалина М.А., Попов В.Б. Синтез CYP1A1 монооксигеназы в семенниках и яичниках инбредных линий мышей при токсическом воздействии. In: b: Рембовский В.Р., ред. *A collection of materials from a joint meeting of the St. Petersburg branch of the All-Russian Public Organization of Toxicologists and the Joint Scientific Council of the FSUE "Scientific Research Institute of the Russian Academy of Medical Sciences" and the Federal State Budgetary Educational Institution IT of the Russian Academy of Medical Sciences, dedicated to the 100th anniversary of the birth of Professor Zaigol'nikov S.D. Current problems of toxicology, hygiene, ecology [V kn: Рембовский В.Р., ред. Сборник материалов совместного заседания Санкт-Петербургского отделения Всероссийской общественной организации токсикологов и объединенного Ученого совета ФГУП "НИИ ГПЭЧ" ФМБА России и ФГБУН ИТ ФМБА России, посвященного 100-летию со дня рождения профессора С.Д. Заугольникова. Актуальные проблемы токсикологии, гигиены, экологии]*. St. Petersburg: PH Polytechnic University. 2017. (in Russian)
20. Volkova M., Palmeri M., Russell K.S., Russell R.R. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by doxorubicin mediates cytoprotective effects in the heart. *Cardiovascular Research*. 2011; 90: 305–14. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvr007>
21. Hsieh T.H., Hsu C.Y., Yang P.J., Chiu C.C., Liang S.S., Ou-Yang F., et al. DEHP mediates drug resistance by directly targeting AhR in human breast cancer. *Biomed. Pharmacother*. 2022; 145: 112400. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112400>

## СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

**Голубенцева Юлия Васильевна** – научный сотрудник, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: [yul90lub@yandex.ru](mailto:yul90lub@yandex.ru)

<https://doi.org/10.47470/0869-7922-2025-33-5-372-379>  
Оригинальная статья

**Попов Вадим Борисович** – доктор биол. наук, ведущий научный сотрудник, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, Ленинградская область, г. пос. Кузьмоловский, Россия. E-mail: [porov@gpoch.ru](mailto:porov@gpoch.ru)

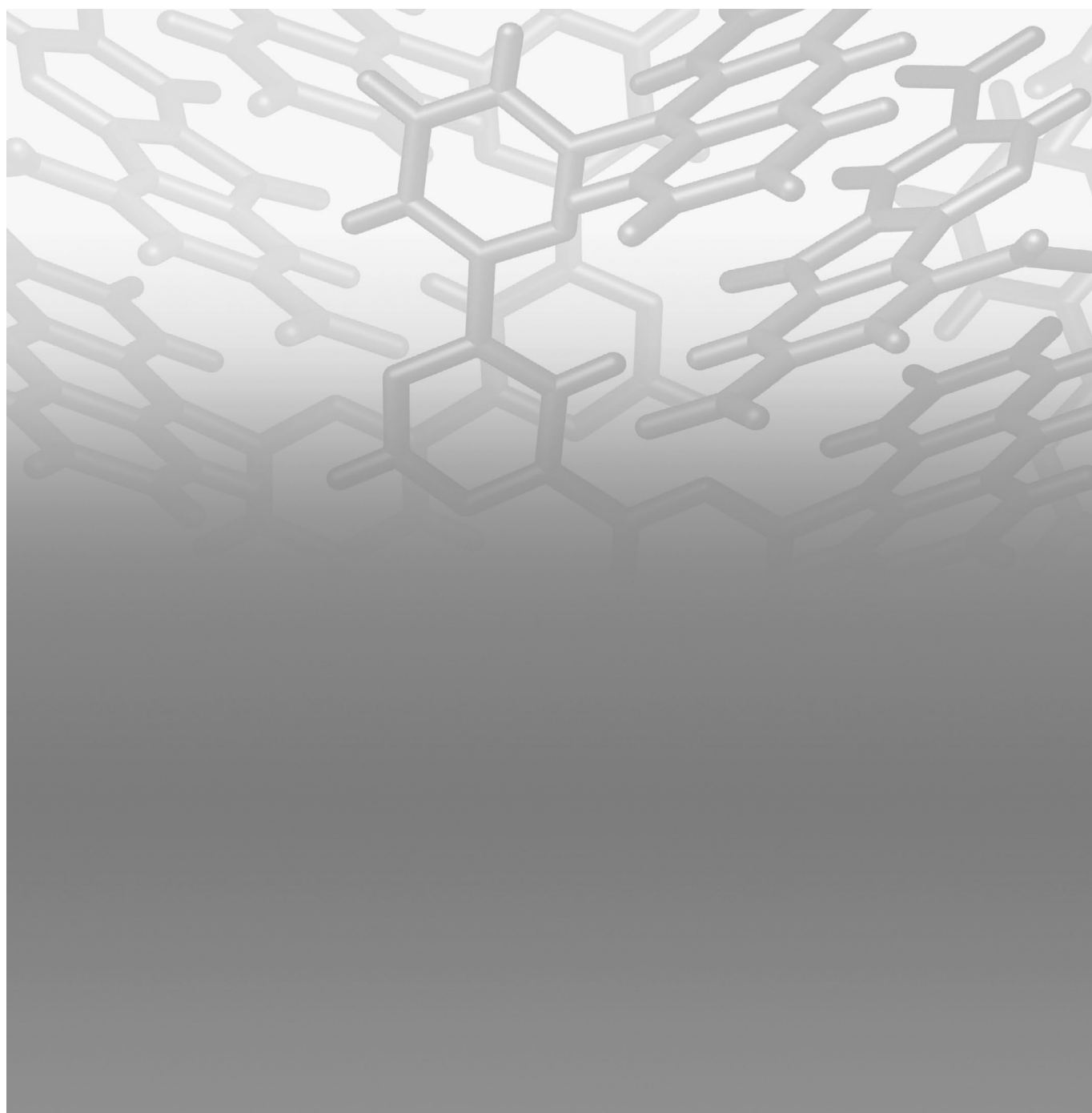
**Бельтюков Петр Петрович** – кандидат мед. наук, ведущий научный сотрудник, ФГУП «НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека» ФМБА России, 188663, г. Санкт-Петербург, Россия. E-mail: [beltiukov@rihophe.site](mailto:beltiukov@rihophe.site)

### INFORMATION ABOUT THE AUTHORS

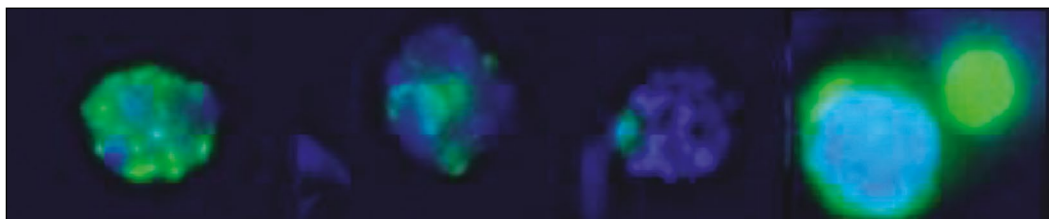
**Yulia V. Golubentseva** – Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad Region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, <https://orcid.org/0009-0007-7814-8100> E-mail: [yul9olub@yandex.ru](mailto:yul9olub@yandex.ru)

**Vadim B. Popov** – Doctor of Biological Sciences, Leading Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad Region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0001-8239-0345> E-mail: [popov@gpoch.ru](mailto:popov@gpoch.ru)

**Petr P. Beltyukov** – Ph.D. of Medical Sciences, Leading Researcher, Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology, of the Federal Medical Biological Agency of Russia, Leningrad Region, Kuzmolovsky urban settlement, 188663, Russian Federation, <https://orcid.org/0000-0003-4050-6172> E-mail: [beltiukov@gpoch.ru](mailto:beltiukov@gpoch.ru)

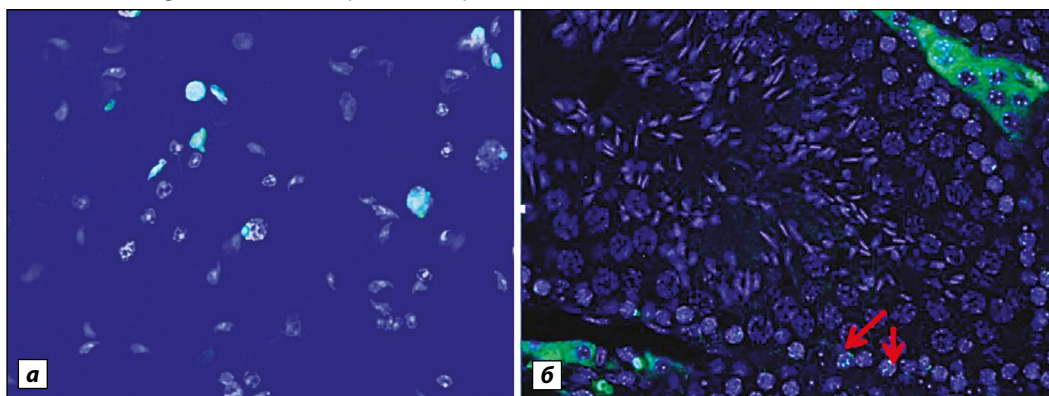


*К статье Ю.В. Голубенцевой и соавт.  
To the article by Yulia V. Golubentseva et al.*



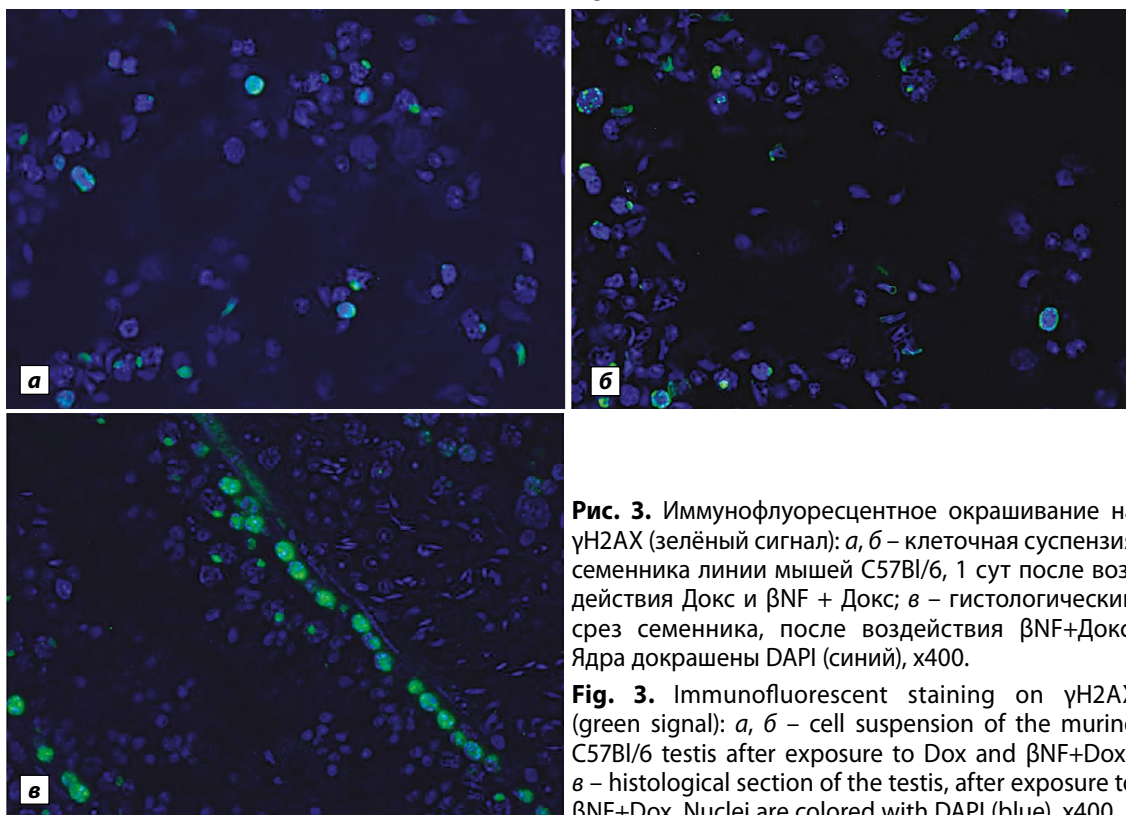
**Рис. 1.** Характер распределения фокусов  $\gamma$ H2AX в клетках семенника мыши C57Bl/6.

**Fig. 1.** Distribution pattern of  $\gamma$ H2AX foci in C57Bl/6 mouse testicular cells.



**Рис. 2.** Иммунофлуоресцентное окрашивание анти- $\gamma$ H2AX антителами клеточной суспензии семенника мыши линии C57Bl/6 контрольных животных (зелёный сигнал); ядра докрашены DAPI (синий), x400: а – клетки семенника; б – гистологический срез семенника.

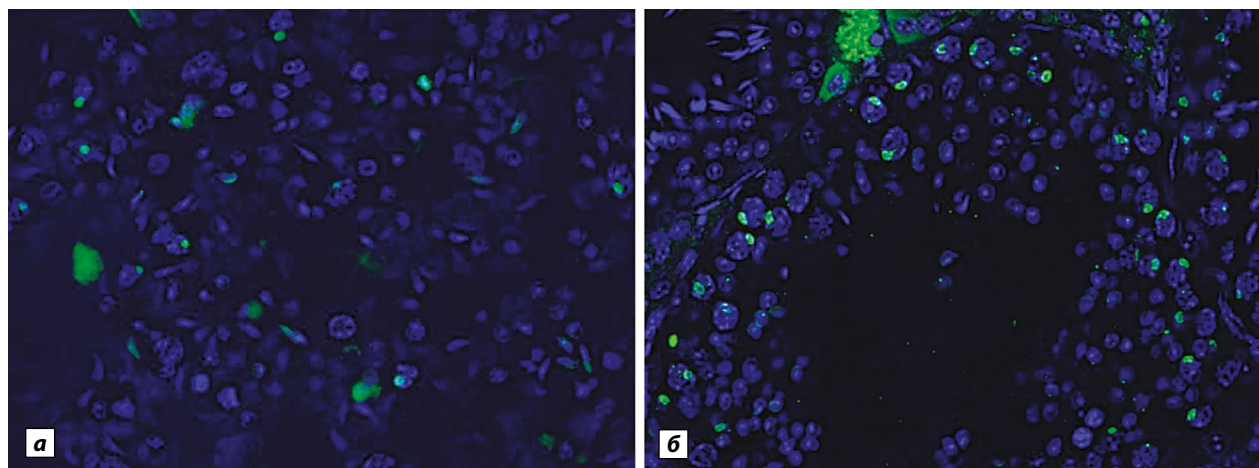
**Fig. 2.** Immunofluorescent staining with anti- $\gamma$ H2AX antibodies in cell suspension of murine C57Bl/6 testis in intact control (green signal); nuclei are colored with DAPI (blue), x400: а – testicular cells; б – histological section of the testis.



**Рис. 3.** Иммунофлуоресцентное окрашивание на  $\gamma$ H2AX (зелёный сигнал): а, б – клеточная суспензия семенника линии мышей C57Bl/6, 1 сут после воздействия Докс и  $\beta$ NF + Докс; в – гистологический срез семенника, после воздействия  $\beta$ NF+Докс. Ядра докрашены DAPI (синий), x400.

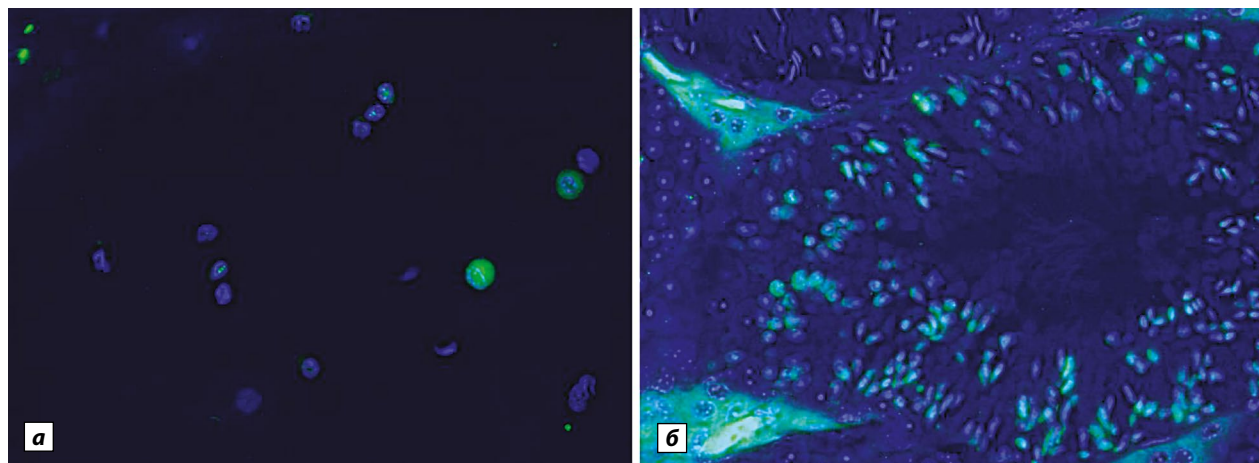
**Fig. 3.** Immunofluorescent staining on  $\gamma$ H2AX (green signal): а, б – cell suspension of the murine C57Bl/6 testis after exposure to Dox and  $\beta$ NF+Dox.; в – histological section of the testis, after exposure to  $\beta$ NF+Dox. Nuclei are colored with DAPI (blue), x400.

*К статье Ю.В. Голубенцевой и соавт.  
To the article by Yulia V. Golubentseva et al.*



**Рис. 4.** Иммунофлуоресцентное окрашивание на  $\gamma$ H2AX (9-е сутки): *a* – клеточная суспензия семенника мышей C57Bl/6 на  $\gamma$ H2AX (зеленый сигнал), Докс. Ядра докрашены DAPI (синий); *б* – гистологический срез семенника мыши C57Bl/6,  $\beta$ NF+Докс, x400.

**Fig. 4.** Immunofluorescent staining  $\gamma$ H2AX (9 days): *a* – testicular cell suspension (C57Bl/6)  $\gamma$ H2AX (green signal), Dox. Nuclei are colored with DAPI (blue); *б* – histological section of testis C57Bl/6,  $\beta$ -NF+Dox, x400.



**Рис. 5.** Иммунофлуоресцентное окрашивание (18-е сутки): *a* – клеточная суспензия семенника,  $\beta$ NF+Докс; *б* – срез семенника,  $\beta$ NF+Докс. Присутствуют фокусы  $\gamma$ H2AX на разных стадиях сперматид – округлых и удлинённых, x400.

**Fig. 5.** Immunofluorescence staining  $\gamma$ H2AX (18 days): *a* – testicular cell suspension,  $\beta$ NF+Dox; *б* – testicular section,  $\beta$ NF+Dox. There are foci of  $\gamma$ H2AX at different stages of spermatids – rounded and elongated, x400.