

Метиленовый синий регулирует спонтанный мутационный процесс в соматических клетках мышей линии C57BL/6

Елена А. Калаева	¹	kalaevae@gmail.com
Владислав Н. Калаев	¹	dr_huixs@mail.ru
Ксения А. Ефимова	¹	xenia.ephimova@gmail.com
Оксана Ю. Мальцева	²	ksenia2002@list.ru

¹ Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия

² Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия

Реферат. Поиск и тестирование соединений, обладающих антиоксидантной, антимутагенной, противоопухолевой активностью, малотоксичных, эффективных и недорогих является актуальной задачей. Одним из веществ, удовлетворяющих этим требованиям, является метиленовый синий. Он применяется в качестве антисептика, антидота при отравлениях цианидами, оксидом углерода, сероводородом, нейтропротектора, фотосенсибилизатора, антиоксиданта, регулятора активности ферментов. Целью работы явилось исследование влияния метиленового синего на частоту встречаемости микроядер в эритроцитах крови мышей с помощью микроядерного теста. Применение метиленового синего способствовало снижению уровня спонтанного мутагенеза в эритроцитарных клетках у мышей: в контрольной группе частота встречаемости микроядер составила $4,78 \pm 0,58$ ‰, пероральное введение метиленового синего в дозе 15 мг/кг в течение 60 дней приводило к снижению исследуемого показателя до $2,99 \pm 0,34$ ‰. Антимутагенное действие метиленового синего, очевидно, основано на его способности связывать свободные радикалы и защищать генетический материал клеток от повреждений. Выявление механизмов действия и дозозависимых эффектов метиленового синего требует проведения дополнительных исследований

Ключевые слова: метиленовый синий, микроядерный тест, спонтанный мутагенез, эритроциты

Methylene blue regulates spontaneous mutation process in somatic cells of C57BL/6 mice

Elena A. Kalaeva	¹	kalaevae@gmail.com
Vladislav N. Kalaev	¹	dr_huixs@mail.ru
Kseniya A. Efimova	¹	xenia.ephimova@gmail.com
Oksana Yu. Maltseva	²	ksenia2002@list.ru

¹ Voronezh state university, Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia

² Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia

Summary. The search and testing of compounds with antioxidant, antimutagenic, antitumor activity, low toxicity, efficacy and low cost is actual task. One of the substances that meet these requirements is methylene blue. It is used as antiseptic, antidote for poisoning with cyanides, carbon monoxide, hydrogen sulphide, neuroprotective agent, photosensitizer, antioxidant, regulator of enzyme activity. The aim of the work was to investigate the effect of methylene blue on the frequency of occurrence of micronuclei in erythrocytes of blood of mice using a micronucleus test. The use of methylene blue contributed to decrease in the level of spontaneous mutagenesis in erythrocyte cells in mice: in the control group, the incidence of micronuclei was 4.78 ± 0.58 ‰, oral administration of methylene blue at a dose of 15 mg/kg for 60 days led to the decrease of the study parameter up to 2.99 ± 0.34 ‰. The antimutagenic effect of methylene blue is obviously based on its ability to bind free radicals and protect the genetic material of cells from damage. The detection of mechanisms of action and dose-dependent effects of methylene blue requires additional studies.

Keywords: methylene blue, micronuclear test, spontaneous mutagenesis, erythrocytes

Введение

Интенсивное антропогенное воздействие на окружающую среду, загрязнение воды, воздуха и почвы токсическими соединениями, нарушение биологических ритмов, несоблюдение правил здорового питания, низкая физическая активность, избыточная информационная нагрузка, постоянная психоэмоциональная

напряженность существенным образом сказываются на качестве жизни и состоянии здоровья человека. Вследствие совокупного воздействия неблагоприятных факторов на организм частота возникновения онкологических заболеваний, сердечно-сосудистых, респираторных, нервно-психических и других патологий ежегодно возрастает.

Для цитирования

Калаева Е.А., Калаев В.Н., Ефимова К.А., Мальцева О.Ю. Метиленовый синий регулирует спонтанный мутационный процесс в соматических клетках мышей линии C57BL/6 // Вестник ВГУИТ. 2017. Т. 79. № 3. С. 180–186. doi:10.20914/2310-1202-2017-3-180-186

For citation

Kalaeva E.A., Kalaev V.N., Efimova K.A., Maltseva O.Yu. Methylene blue regulates spontaneous mutation process in somatic cells of C57BL/6 mice. *Vestnik VGUIT* [Proceedings of VSUET]. 2017. vol. 79. no. 3. pp. 180–186. (in Russian). doi:10.20914/2310-1202-2017-3-180-186

В связи с этим актуальной является проблема поиска и тестирования соединений, обладающих антиоксидантной, антимуtagenной, противоопухолевой активностью, малотоксичных, эффективных и недорогих.

Одним из веществ, удовлетворяющих этим требованиям, является метиленовый синий (N,N,N',N'-тетраметилтионина хлорид) (рисунок 1).

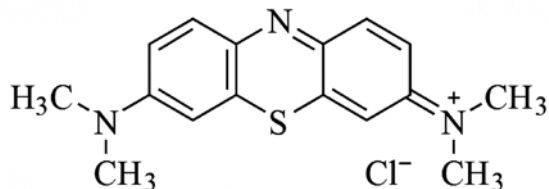


Рисунок 1. Структурная формула N,N,N',N'-тетраметилтионина хлорида

Figure 1. Structural formula of N,N,N',N'-tetramethylthionine chloride

Впервые это соединение было получено Г. Каро в 1876 г.

Метиленовый синий представляет собой темно-зеленый кристаллический порошок или темно-зеленые с бронзовым блеском кристаллы. Трудно растворим в воде (1:30), мало – в спирте. Водные растворы имеют синий цвет. В медицинской практике 1–3% спиртовые растворы метиленового синего применяют наружно в качестве антисептического средства при ожогах, пиодермии, фолликулитах и т. п. Метиленовый синий обладает окислительно-восстановительной активностью и в зависимости от условий среды может играть роль акцептора или донора ионов водорода; на этом основано его использование в качестве антидота. Растворы метиленового синего вводят внутривенно при отравлениях цианидами, оксидом углерода, сероводородом [11].

Также метиленовый синий представляет интерес с точки зрения исследования его нейропротекторного, фотосенсибилизирующего, мутагенного или антимуtagenного действия на организм.

Нейропротекторное действие метиленового синего было показано в ряде работ [26, 27, 30], в частности, была установлена его способность защищать астроциты от глюкозного голодания путем интенсификации процессов клеточного дыхания [19].

Известно, что под действием неблагоприятных факторов внешней среды наблюдаются признаки преждевременного старения организма. При этом возрастает риск развития нейродегенеративных расстройств, одним из проявлений которых является болезнь Альцгеймера. Характерной чертой данного заболевания

является наличие в цитоплазме нейронов спирально скрученных нейрофиламентов, которые образованы избыточно фосфорилированными тау-белками [2]. Метиленовый синий способен проникать через гематоэнцефалический барьер и ингибировать агрегацию тау-белков с терапевтическими препаратами, повышая тем самым эффективность лечения [18, 23].

Помимо лечения нейродегенеративных заболеваний, метиленовый синий активно используется в качестве фотосенсибилизатора в фотодинамической терапии. Фотодинамическая терапия (ФДТ) как метод лечения в первую очередь разрабатывалась для онкологии, но впоследствии область ее применения значительно расширилась: ФДТ используется для лечения вялотекущих воспалительных процессов в дерматологии, стоматологии, гинекологии, урологии и т. д. Так, например, разработан и апробирован метод лечения острых воспалительных заболеваний гортани и их гнойных осложнений методом фотодинамического воздействия с использованием в качестве фотосенсибилизатора метиленового синего [9]. При этом наблюдается хороший терапевтический эффект и даже в процессе длительного лечения микроорганизмы не утрачивают чувствительности к препарату, как это случается при применении антибиотиков [8].

Учеными из Национальной лаборатории Сандия (США) установлено, что при действии лазерного луча, инициирующего радикальную реакцию, метиленовый синий способен «сшивать» между собой протеиновые мономеры, формируя гидрогель. «Сшивание» происходит только в области вокруг фокуса лазерного луча. Это позволяет изолировать отдельные клетки и группы клеток внутри ткани, не нарушая ее целостности [22].

Разработка технологии получения текстильных материалов, используемых в онкологической практике для адресного подведения лекарственных препаратов при проведении лучевой, в том числе фотодинамической терапии, является важной задачей. При адресном (в том числе трансдермальном) введении лекарственного препарата, минуя желудочно-кишечный тракт, удастся избежать нежелательных системных эффектов. В связи с этим исследовано влияние иммобилизации по технологии печати метиленового синего на текстильном материале на его фотодинамическую и цитотоксическую активность по отношению к опухолевым клеткам в сравнении с фотодинамической и цитотоксической активностью субстанции лекарства. Доказано, что иммобилизация соединения не изменяет цито- и фотоактивности метиленового синего, что позволяет рекомендовать для

создания аппликаций с фотосенсибилизатором технологию текстильной печати [4].

Заметная роль в формировании эффектов старения принадлежит митохондриям. Поэтому на сегодняшний день востребованы разработки по поиску веществ, способных влиять на функционирование митохондрий.

Исследователи из Университета штата Мэриленд обнаружили, что метиленовый синий проявляет антиоксидантные свойства в митохондриях и способен исправлять митохондриальные дефекты [31], вызванные старением и некоторыми генетическими заболеваниями, в частности, прогерией.

Обнаружена способность метиленового синего регулировать активность некоторых ферментов. Так, при введении метиленового синего в малых дозах наблюдается повышение активности цитохромоксидазы, ответственной за окисление цитохрома С молекулярным кислородом в митохондриях, что повышает выработку энергии и улучшает работу мозга. Кроме того, данное соединение способно ингибировать железосодержащие ферменты (в частности, ксантиноксидазу), защищая ткани от токсических эффектов активных форм кислорода, и конкурируя с молекулярным кислородом за транспорт электронов [20].

Известна способность метиленового синего блокировать спаянные процессы у женщин в малом тазу, вызванные гинекологическими заболеваниями. Этот эффект обусловлен антиоксидантными и антиангиогенными свойствами метиленового синего, связанными с подавлением активности оксида азота, участвующего в синтезе коллагена, активирующего клеточную пролиферацию и ангиогенез [3].

Способность метиленового синего избирательно накапливаться в подвергнутых злокачественной трансформации клетках находит применение в диагностике онкологических заболеваний.

Так, была показана возможность использования метиленового синего в качестве диагностического маркера при онкологических заболеваниях ротовой полости [24, 28]; на основе данного соединения был создан биочип для определения рака полости рта [25].

Флуоресцентная спектроскопия позволяет идентифицировать опухолевые клетки с помощью метиленового синего, который способен накапливаться в пораженных клетках и при воздействии света определенных длин волн вызывать интенсивную флуоресценцию пораженных участков [1].

Помимо положительного (противовоспалительного, антимуtagenного, антиоксидантного)

воздействия на клетки и ткани [14, 29], метиленовый синий способен проявлять мутагенную и цитотоксическую активность, обусловленную действием свободнорадикальных продуктов его фототрансформации, в частности, гидроксильного радикала $\text{OH}^\cdot$ [15].

Таким образом, в силу своей двойственной природы (способности к генерации и инактивации активных кислородных метаболитов), метиленовый синий способен оказывать как антимуtagenное, так и мутагенное действие на ткани и органы организма человека и животных. Поэтому при его использовании следует контролировать состояние генетического аппарата клетки.

В настоящее время для оценки мутагенной или антимуtagenной активности соединений используют микроядерный тест. В силу своей простоты и возможности быстрого анализа микроядерный тест стал методом *in vitro* и *in vivo* исследований цитогенетической активности различных факторов, в том числе способных вызвать поражение генетического аппарата у человека и животных [5–7, 11, 13, 14, 16, 17].

В связи с изложенным выше целью данной работы явилось исследование влияния метиленового синего на частоту встречаемости микроядер в эритроцитах крови мышей с помощью микроядерного теста.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на самцах мышей линии C57BL/6. Работа с лабораторными мышами осуществлялась согласно Женевской Конвенции 1985 г. «О международных принципах биомедицинских исследований с использованием животных».

В эксперименте животные были разделены на опытную ($n=15$) и контрольную ($n=12$) группы. Животные из опытной группы получали метиленовый синий перорально в течение 60 суток в дозе 15 мг/кг. Животные из контрольной группы получали чистую воду.

Для оценки мутагенного / антимуtagenного действия метиленового синего на организм мышей исследовали частоту встречаемости микроядер в эритроцитах. Забор крови осуществляли из хвостовой вены, затем готовили мазки крови. Кровь наносили на чистое сухое предметное стекло и размазывали с помощью сухого чистого шлифованного стекла, держа его под углом 45° . Препарат высушивали на воздухе и фиксировали в 96-% этиловом спирте 20 мин, сушили, окрашивали неразведенным азур-эозином по Романовскому–Гимза в течение 5 мин. Избыток красителя смывали дистиллированной водой, препарат высушивали на воздухе.

Препараты анализировали на микроскопе БИОМЕД при увеличении $100 \times 1,5 \times 10$. Всего было проанализировано 27 препаратов (15 – опыт и 12 – контроль), на каждом препарате подсчитывали не менее 3000 клеток и вычисляли частоту встречаемости эритроцитов с микроядрами как отношение числа клеток с микроядрами к общему числу проанализированных клеток (%).

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета «Stadia». Сравнение медиан выборок осуществляли с использованием непараметрического X–критерия Ван-дер-Вардена.

Результаты и обсуждение

При анализе микропрепаратов образцов крови мышей из контрольных и опытных групп в эритроцитарных клетках были обнаружены микроядра. Они имели вид округлых образований с ровными краями, окрашенных в темно – синий цвет (рисунок 2).

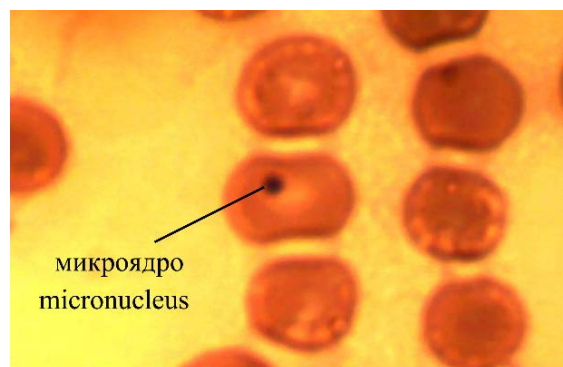


Рисунок 2. Микроядро в эритроците периферической крови мышей

Figure 2. Micronucleus in erythrocyte of mice peripheral blood

В контрольной группе частота встречаемости микроядер составила $4,78 \pm 0,58$ % (таблица 1). Пероральное введение метиленового синего в дозе 15 мг/кг в течение 60 дней приводило к снижению исследуемого показателя до $2,99 \pm 0,34$ % ($P < 0,05$).

Таблица 1.

Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в периферической крови мышей при введении метиленового синего

Table 1.

The frequency of occurrence of erythrocytes with micronuclei in the peripheral blood of mice with the administration of methylene blue

Группа Group	Проанализировано клеток Cells analyzed	Число клеток с микроядрами Number of cells with micronuclei	Доля клеток с микроядрами, % The proportion of cells with micronuclei, %
Опытная группа Experimental group	42174	130	$2,99 \pm 0,34^*$
Контрольная группа Control group	36077	242	$4,78 \pm 0,58$

Примечание: * – различия с контролем достоверны ($P < 0,05$)

Note: * – the differences with the control are significant ($P < 0.05$)

Применение метиленового синего способствовало снижению уровня спонтанного мутагенеза в эритроцитарных клетках у мышей.

Антимутагенное действие метиленового синего, очевидно, основано на его способности связывать свободные радикалы и тем самым защищать генетический материал клеток от повреждений. Кроме того, метиленовый синий способен активировать экспрессию антиоксидантных генов, таких как митохондриальная форма супероксиддисмутазы. Это происходит за счет активации Nrf2/ARE сигнального каскада, который играет ключевую роль в активации экспрессии генов, участвующих

в детоксикации ксенобиотиков и антиоксидантной защите [21]. По всей видимости, это и может являться причиной снижения спонтанного мутагенеза в эритроцитах мышей.

Заключение

Метиленовый синий является перспективным соединением для разработки на его основе диагностических тестов, фотосенсибилизаторов, лекарственных препаратов. Однако выявление механизмов его воздействия на клетку, дозозависимых эффектов требует проведения дополнительных исследований.

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Башкатов А.Н., Генина Э.А., Приезжев А.В., Тучин В.В. Лазерная биофотоника // Квантовая электроника. 2016. Т. 46. № 6. С. 487.
- 2 Болезнь Альцгеймера: патогенез, общие сведения. URL: http://humbio.ru/humbio/har_nevt/00054622.htm (дата обращения 02.11.2017).
- 3 Бурлев В.А., Дубинская Е.Д., Гаспаров А.С., Ильясова Н.А. Антиангиогенная терапия и спаечный процесс в малом тазу: перспективы профилактики и лечения. // Российский вестник акушера-гинеколога. 2010. Т. 10. № 4. С. 25–31.
- 4 Валуева М.И., Олтаржевская Н.Д. Исследования технологических особенностей получения печатных композиций на основе природных полимеров // Вестник Санкт-Петербургского государственного университета технологии и дизайна. Серия 1: Естественные и технические науки. 2013. № 2. С. 12–15.
- 5 Калаев В.Н., Игнатова И.В., Климова Н.В. Частота встречаемости эритроцитов с микроядрами в крови перепела японского (*Coturnix japonica*) при разных способах окрашивания // Фундаментальные исследования. 2013. № 10. Вып. 4. С. 770–775.
- 6 Калаев В.Н., Красножон К.Б., Игнатова И.В. Оценка стабильности генома больных сахарным диабетом 1 типа с использованием микроядерного теста в буккальном эпителии // Фундаментальные исследования. 2012. № 11. Вып. 2. С. 288–295.
- 7 Ковалева О.А., Ясинский Я.С., Безденежных Н.А., Кудрявец Ю.И. Особенности цитогенетических изменений в клетках лимфомы человека линии U-937 при индукции апоптоза фактором некроза опухоли // Цитология. 2014. Т. 56. № 2. С. 110–116.
- 8 Кричевский Г.Е., Олтаржевская Н.Д., Корovina М.А. Инновационные текстильные технологии для получения депо-материалов для направленной доставки лекарств // Физика волокнистых материалов: структура, свойства, наукоемкие технологии и материалы (SMARTEX). 2016. Т.1, № 1. С. 44–49.
- 9 Крюков А.И., Лапченко А.С., Гуров А.В., Кучеров А.Г. и др. Современные возможности применения антимикробной ФДТ в оториноларингологии // Лазерная медицина. 2014. Т. 18. № 1. С. 39–41.
- 10 Курчатова М.Н., Дурнова Н.А., Полуконова Н.В. Влияние экстрактов, содержащих биофлавоноиды, на индукцию микроядер диоксидом в эритроцитах крови беспородных белых мышей // Вестник ВГУ. 2014. № 2. С. 58–65.
- 11 Метиленового синего раствор водный (aqueous methylene blue solution) инструкция по применению. URL: https://www.vidal.ru/drugs/aqueous_methylene_blue_solution_38488 (дата обращения 02.11.2017).
- 12 Панина А.И., Севрюков А.В., Моргуль Е.В., Колмакова Т.С. Оценка стабильности генома детей с аллергическими заболеваниями с помощью микроядерного теста // Сборники конференций НИЦ Социосфера. 2014. № 33. С. 85–87.
- 13 Петрова О.А., Липатов Г.Я., Адриановский В.И., Береснева О.Ю. Результаты оценки антимутагенных свойств различных антиоксидантов // Биологически активные соединения: получение, свойства, структура, функции, применение. URL: <http://econf.rae.ru/article/1152> (дата обращения: 30.10.2017).
- 14 Семенов В.М., Пашинская Е.С., Побяржин В.В., Субботина И.А. и др. Иммуногистохимические и молекулярно-генетические методы диагностики онкологических заболеваний (обзор литературы) // Вестник Витебского государственного медицинского университета. 2017. Т. 16. № 2. С. 15–25.
- 15 Сычева Л.П., Шереметьева С.М., Кривцова Е.К., Журков В.С. и др. Оценка цитогенетической активности метиленового голубого и продуктов его фотодеструкции в полиорганном микроядерном тесте на крысах // Токсикологический вестник. 2007. № 1. С. 18–21.
- 16 Хахулина Н.Н., Курчатова М.Н. Микроядерный тест в оценке антимутагенной активности лекарственных средств // Бюллетень медицинских интернет-конференций. 2014. Т. 4. № 5. С. 786.
- 17 Шахтамиров И.Я., Гайрабеков Р.Х., Мутиева Х.В., Терлецкий В.П. и др. Биоиндикация генотоксичности стойких органических загрязнителей в Чеченской Республике. Сообщение 1. Микроядерный тест в эритроцитах птиц // Медико-биологические проблемы жизнедеятельности. 2014. № 1 (11). С. 65–70.
- 18 Baddeley T.C., McCaffrey J., Storey J.M., Cheung J.K. et al. Complex disposition of methylthioninium redox forms determines efficacy in tau aggregation inhibitor therapy for alzheimer's disease // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2015. V.352. № 1. P. 110–118. DOI: 10.1124/jpet.114.219352.
- 19 Choudhury G.R., Winters A., Rich R.M., Ryou M. – G. et al. Methylene blue protects astrocytes against glucose oxygen deprivation by improving cellular respiration // Plos one. 2015. P. 1–14.
- 20 Gonzalez-Lima F., Bruchey A.K. Extinction memory improvement by the metabolic enhancer methylene blue // Learn Mem. 2004. V. 11. № 5. P. 633–640. DOI: 10.1101/lm.82404.
- 21 Gureev A.P., Syromyatnikov M. Yu., Gorbacheva T.M., Starkov A.A. et al. Methylene blue improves sensorimotor phenotype and decreases anxiety in parallel with activating brain mitochondria biogenesis in mid-age mice // Neuroscience Research. 2016. V. 113. P. 19–27. DOI: 10.1016/j.neures.2016.07.006.
- 22 Harper J.C., Brozik S.M., Brinker C.J., Kaehr B. Biocompatible Microfabrication of 3D Isolation Chambers for Targeted Confinement of Individual Cells and Their Progression // Anal. Chem. 2012. V. 84. № 21. P. 8985–8989. DOI: 10.1021/ac301816c.
- 23 Hochgräfe K., Sydow A., Matenia D., Cadinu D. et al. Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau // Acta Neuropathol. Commun. 2015. P. 1–22. DOI: 10.1186/s40478-015-0204-4.
- 24 Lejoy A., Arpita R., Krishna B., Venkatesh N. Methylene Blue as a Diagnostic Aid in the Early Detection of Potentially Malignant and Malignant Lesions of Oral Mucosa // Ethiop. J. Health. Sci. 2016. V. 26. № 3. P. 201–208.
- 25 McDevitt J., Weigum S.E., Floriano P.N., Christodoulides N. et al. A new bio-nanochip sensor aids oral cancer detection // SPIE Newsroom. 2011. P. 1–5. DOI:10.1117/2.1201102.003547.
- 26 Medina D.X., Caccamo A., Oddo S. Methylene blue reduces $\alpha\beta$ levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity // Brain Pathol. 2011. V. 21. № 2. P. 140–149. DOI: 10.1111/j. 1750-3639.2010.00430.x.
- 27 Rayner B.S., Duong T.T., Myers S.J., Witting P.K. Protective effect of a synthetic anti-oxidant on neuronal cell apoptosis resulting from experimental hypoxia re-oxygenation injury // J. Neurochem. 2006. V. 97. № 1. P. 211–221. DOI: 10.1111/j. 1471-4159.2006.03726.x.
- 28 Riaz A., Shreedhar B., Kamboj M., Natarajan S. Methylene blue as an early diagnostic marker for oral pre-cancer and cancer // Springerplus. 2013. V.2. № 1. P. 95.
- 29 Rodriguez P., Zhao J., Milman B., Tiwari Y.V. et al. Methylene blue and normobaric hyperoxia combination therapy in experimental ischemic stroke // Brain and Behavior. 2016. V. 6. № 7. P. 1–10. DOI: 10.1002/brb3.478.
- 30 Rojas J.C., Bruchey A.K., Gonzalez-Lima F. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue // Prog. Neurobiol. 2012. № 96 (1). P. 32–45. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.10.007.
- 31 Xiong Z.M., Choi J.Y., Wang K., Zhang H. et al. Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria // Aging Cell. 2016. V. 15. № 2. P. 279–290. DOI: 10.1111/accel.12434.

REFERENCES

- 1 Bashkatov A.N., Genina E.A., Priezhev A.V., Turchin V.V. Laser Biophotonics. *Kvantovaya elektronika* [Quantum Electronics] 2016. vol. 46, no. 6. pp. 487. (in Russian)
- 2 Bolezn' Al'tseimera [Alzheimer's disease: pathogenesis, general information] Available at: http://humbio.ru/humbio/har_nevr/00054622.htm (circulation date 02.11.2017). (in Russian)
- 3 Burlev V.A., Dubinskaya E.D., Gasparov A.S., Ilyasova N.A. Antiangiogenic therapy and adhesive process in the small pelvis: the prospects for prevention and treatment. *Rossiiskii vestnik akushera-ginekologa* [Russian bulletin of the obstetrician-gynecologist] 2010. vol. 10, no. 4. pp. 25–31. (in Russian)
- 4 Valueva M.I., Oltarzhevskaya N.D. Investigation of technological features of obtaining printed compositions based on natural polymers. *Vestnik SPbGUTD* [Proceedings of the St. Petersburg State University of Technology and Design. Series 1: Natural and technical sciences]. 2013. no. 2. pp. 12–15. (in Russian)
- 5 Kalaev V.N., Ignatova I.V., Klimova N.V. The frequency of occurrence of erythrocytes with micronuclei in the blood of the Japanese quail (*Coturnix japonica*) with different methods of staining. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental studies]. 2013. no. 10, vol. 4. pp. 770–775. (in Russian)
- 6 Kalaev V.N., Krasnozhan K.B., Ignatova I.V. An estimation of genome stability in patients with type 1 diabetes mellitus using micronucleus test in buccal epithelium. *Fundamental'nye issledovaniya* [Fundamental studies]. 2012. № 11, issue. 2. P. 288–295. (in Russian)
- 7 Kovaleva O.A., YasinskyYa. S., Bezdenezhny N.A., Kudryavets Yu. I. Features of cytogenetic changes in the cells of human lymphoma line U-937 with the induction of apoptosis by tumor necrosis factor. *Tsitologiya* [Cytology]. 2014. pp. 56. no. 2. pp. 110–116. (in Russian)
- 8 Krichivsky G.E., Oltarzhevskaya N.D., Korovina M.A. Innovative textile technologies for obtaining depot materials for targeted drug delivery. *Fizika voloknistykh materialov* [Fibrous materials physics: structure, properties, science-intensive technologies and materials (SMARTEX)] 2016. vol.1. no. 1. pp. 44–49. (in Russian)
- 9 Kryukov A.I., Lapchenko A.S., Gurov A.V., Kucherov A.G., Order R. Ya. Modern possibilities of using antimicrobial PDT in otorhinolaryngology. *Lazernaya meditsina* [Laser medicine]. 2014. vol. 18, no. 1. pp. 39–41. (in Russian)
- 10 Kurchatova M.N., Durnova N.A., Polukonova N.V. The effect of extracts containing bioflavonoids on the induction of micronuclei with dioxydin in blood erythrocytes of nonbred white mice. *Vestnik VGU* [Proceedings of VSU]. 2014. no. 2. pp. 58–65. (in Russian)
- 11 Metilenovogo sinego rastvor [Methylene blue aqueous solution (aqueous methylene blue solution) instructions for use]. Available at: http://www.vidal.ru/drugs/aqueous_methylene_blue_solution__38488 (reference date 02.11.2017). (in Russian)
- 12 Panina A.I., Sevryukov A.V., Morgul E.V., Kolmakova T.S. Evaluation of the genome stability of children with allergic diseases with the help of a micronuclear test. *Sbornik konferentsii NITs* [Proceedings of the SIC Sotsiosfera]. 2014. № 33. P. 85–87. (in Russian)
- 13 Petrova O.A., Lipatov G. Ya., Adrianovsky V.I., Beresneva O. Yu. Results of the evaluation of antimutagenic properties of various antioxidants. *Biologicheski aktivnye soedineniya* [Biologically active compounds: preparation, properties, structure, functions, application] Available at: <http://econf.rae.ru/article/1152> (date of circulation: 30.10.2017). (in Russian)
- 14 Semenov V.M., Pashinskaya E.S., Pobiarzhin V.V., Subbotina I.A. et al. Immunohistochemical and molecular genetic methods for diagnosis of oncological diseases (literature review) *Vestnik Vitebskogo GMU* [Proceedings of Vitebsk State Medical University]. 2017. T. 16. № 2. P. 15–25. (in Russian)
- 15 Sycheva L.P., Sheremeteva S.M., Krivtsova E.K., Zhurkov B.C. et al. Evaluation of the cytogenetic activity of methylene blue and products of its photodestruction in a multi-organ micronucleus test in rats. *Toksikologicheskii vestnik* [Toxicological Herald]. 2007. no. 1. pp. 18–21. (in Russian)
- 16 Khakhulina N.N., Kurchatova M.N. Micronuclear test in the evaluation of antimutagenic activity of drugs. *Bulleten' meditsinskikh internet-konferentsii* [Bulletin of medical Internet conferences] 2014. vol. 4. no. 5. pp. 786. (in Russian)
- 17 Shakhtamirov I. Ya., Gayrabekov R. Kh., Mutieva H.V., Terletskiy V.P. et al. Bioindication of genotoxicity of persistent organic pollutants in the Chechen Republic. Communication 1. Micronuclear test in erythrocytes of birds. *Mediko-biologicheskie problemy* [Medico-biological problems of vital activity]. 2014. no. 1 (11). pp. 65–70. (in Russian)
- 18 Baddeley T.C., McCaffrey J., Storey J.M., Cheung J.K. et al. Complex disposition of methylthioninium redox forms determines efficacy in tau aggregation inhibitor therapy for alzheimer's disease. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2015. vol. 352. no. 1. pp. 110–118. DOI: 10.1124/jpet.114.219352.
- 19 Choudhury G.R., Winters A., Rich R.M., Ryou M. – G. et al. Methylene blue protects astrocytes against glucose oxygen deprivation by improving cellular respiration. *Plos one*. 2015. pp. 1–14.
- 20 Gonzalez-Lima F., Bruchey A.K. Extinction memory improvement by the metabolic enhancer methylene blue. *Learn Mem.* 2004. vol. 11, no. 5. pp. 633–640. DOI: 10.1101/lm.82404.
- 21 Gureev A.P., Syromyatnikov M. Yu., Gorbacheva T.M., Starkov A.A. et al. Methylene blue improves sensorimotor phenotype and decreases anxiety in parallel with activating brain mitochondria biogenesis in mid-age mice // *Neuroscience Research*. 2016. vol. 113. pp. 19–27. DOI: 10.1016/j.neures.2016.07.006.
- 22 Harper J.C., Brozik S.M., Brinker C.J., Kaehr B. Bio-compatible Microfabrication of 3D Isolation Chambers for Targeted Confinement of Individual Cells and Their Progeny. *Anal. Chem.* 2012. vol. 84. no. 21. pp. 8985–8989. DOI: 10.1021/ac301816c.
- 23 Hochgräfe K., Sydow A., Matenia D., Cadinu D. et al. Preventive methylene blue treatment preserves cognition in mice expressing full-length pro-aggregant human Tau. *Acta Neuropathol. Commun.* 2015. pp. 1–22. DOI: 10.1186/s40478–015–0204–4.
- 24 Lejoy A., Arpita R., Krishna B., Venkatesh N. Methylene Blue as a Diagnostic Aid in the Early Detection of Potentially Malignant and Malignant Lesions of Oral Mucosa. *Ethiop. J. Health. Sci.* 2016. vol. 26, no. 3. pp. 201–208.
- 25 McDevitt J., Weigum S.E., Floriano P.N., Christodoulides N. et al. A new bio-nanochip sensor aids oral cancer detection. *SPIE Newsroom*. 2011. pp. 1–5. DOI:10.1117/2.1201102.003547.
- 26 Medina D.X., Caccamo A., Oddo S. Methylene blue reduces $\alpha\beta$ levels and rescues early cognitive deficit by increasing proteasome activity. *Brain Pathol.* 2011. vol. 21, no. 2. pp. 140–149. DOI: 10.1111/j.1750–3639.2010.00430.x.
- 27 Rayner B.S., Duong T.T., Myers S.J., Witting P.K. Protective effect of a synthetic anti-oxidant on neuronal cell apoptosis resulting from experimental hypoxia re-oxygenation injury. *J. Neurochem.* 2006. vol.97. no. 1. pp. 211–221. DOI: 10.1111/j.1471–4159.2006.03726.x.
- 28 Riaz A., Shreedhar B., Kamboj M., Natarajan S. Methylene blue as an early diagnostic marker for oral pre-cancer and cancer. *Springerplus*. 2013. vol.2. no. 1. pp. 95.
- 29 Rodriguez P., Zhao J., Milman B., Tiwari Y.V. et al. Methylene blue and normobarichyperoxia combination therapy in experimental ischemic stroke. *Brain and Behavior*. 2016. vol. 6. no. 7. pp. 1–10. DOI: 10.1002/brb3.478.
- 30 Rojas J.C., Bruchey A.K., Gonzalez-Lima F. Neurometabolic mechanisms for memory enhancement and neuroprotection of methylene blue. *Prog. Neurobiol.* 2012. no. 96 (1). pp. 32–45. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2011.10.007.
- 31 Xiong Z.M., Choi J.Y., Wang K., Zhang H. et al. Methylene blue alleviates nuclear and mitochondrial abnormalities in progeria. *Aging Cell*. 2016. vol. 15. no. 2. pp. 279–290. DOI: 10.1111/acel.12434.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ

Елена А. Калаева к.б.н., кафедра биофизики и биотехнологии, Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия, kalaevae@gmail.com

Владислав Н. Калаев д.б.н., кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия, dr_huixs@mail.ru

Ксения А. Ефимова аспирант, кафедра генетики, цитологии и биоинженерии, Воронежский государственный университет, Университетская пл., 1, Воронеж, 394018, Россия, xenia.ephimova@gmail.com

Оксана Ю. Мальцева к.т.н., кафедра биохимии и биотехнологии, Воронежский государственный университет инженерных технологий, пр-т Революции, 19, г. Воронеж, 394036, Россия, ksenia2002@list.ru

КРИТЕРИЙ АВТОРСТВА

Елена А. Калаева обзор литературных источников, написала рукопись

Владислав Н. Калаев планирование эксперимента, статистическая обработка результатов исследования

Ксения А. Ефимова проведение эксперимента, изготовление и анализ микропрепаратов

Оксана Ю. Мальцева корректировала рукопись до подачи в редакцию и несет ответственность за плагиат

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ПОСТУПИЛА 01.07.2017

ПРИНЯТА В ПЕЧАТЬ 01.08.2017

INFORMATION ABOUT AUTHORS

Elena A. Kalaeva candidate of biological sciences, biophysics and biotechnology department, Voronezh state university, Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia, kalaevae@gmail.com

Vladislav N. Kalaev doctor of biological sciences, genetics, cytology and bioengineering department, Voronezh state university, Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia, dr_huixs@mail.ru

Kseniya A. Efimova graduate student, genetics, cytology and bioengineering department, Voronezh state university, Universitetskaya sq., 1, Voronezh, 394018, Russia, xenia.ephimova@gmail.com

Oksana Yu. Maltseva candidate of technical sciences, biochemistry and biotechnology department, Voronezh state university of engineering technologies, Revolution Av., 19 Voronezh, 394036, Russia, ksenia2002@list.ru

CONTRIBUTION

Elena A. Kalaeva review of literature, wrote the manuscript

Vladislav N. Kalaev experimental planning, statistical processing of the results of the study

Kseniya A. Efimova production and analysis of micropreparations

Oksana Yu. Maltseva correct the manuscript before filing in editing and is responsible for plagiarism

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare no conflict of interest.

RECEIVED 7.1.2017

ACCEPTED 8.1.2017