

УДК 599:539.1.047+591.463.1

*Г. Г. ВЕРЕЩАКО, Н. В. ЧУЕШОВА, Е. В. АНДРОНОВА*

**ПОСЛЕДСТВИЯ ДЕЙСТВИЯ ЛУЧЕВЫХ ЭФФЕКТОВ В РЕПРОДУКТИВНОЙ СИСТЕМЕ  
КРЫС-САМЦОВ 1-го ПОКОЛЕНИЯ, ПОЛУЧЕННЫХ ОТ САМОК, ОБЛУЧЕННЫХ  
В ДОЗЕ 0,5 ГР**

*Институт радиобиологии НАН Беларуси, Гомель, e-mail: vereschako2@tut.by*

*(Поступила в редакцию 05.12.2013)*

**Введение.** При изучении последствий облучения родителей на потомство основное внимание уделяется анализу повреждений хромосомного аппарата половых и соматических клеток, а также аномалиям развития. Так, например, ранее было показано, что у детей, подвергшихся воздействию ионизирующего излучения в период внутриутробного развития в результате аварии на Чернобыльской АЭС, формируется феномен геномной нестабильности, характеризующейся наличием морфогенетических вариантов с множественными малыми аномалиями развития, увеличением частоты хромосомных aberrаций в соматических клетках [1].

Однако проблема последствий для потомства, полученных от облученных родителей, не ограничивается дестабилизацией наследственных структур. Не менее важно оценить и соматические отклонения от нормы (контроля) в последующих поколениях, родившихся от скрещивания самок и самцов, подвергшихся радиационному воздействию [2]. Решение таких вопросов возможно только путем проведения исследований на животных.

В работах Г.Ф. Пальги и др. [3, 4] рассматривается реализация в эмбриогенезе и раннем постнатальном онтогенезе потомства нескольких поколений изменений, индуцированных у самок после облучения в широком диапазоне доз, начиная с дозы 0,25 Гр. О возможном риске нарушения генеративной функции у потомства от одного или обоих облученных родителей, свидетельствуют данные исследований [5–7]. Не меньший интерес представляет анализ возможных нарушений морфофункционального состояния важнейших систем жизнеобеспечения у потомства, полученного от облученных родителей или одного из них.

Цель настоящего исследования – изучение состояния репродуктивной системы крыс-самцов первого поколения, полученных от облученных в дозе 0,5 Гр самок и необлученных самцов.

**Материалы и методы исследования.** Опыты проводили на белых крысах стадного разведения, которых содержали в стандартных условиях вивария. Самок подвергали общему однократному облучению на установке «ИГУР» ( $^{137}\text{Cs}$ , мощность дозы 43 сГр/мин) в дозе 0,5 Гр в возрасте 3 мес. Через 50 дней после облучения животных спаривали с необлученными самцами такого же возраста в соотношении 1 : 3 для получения потомства 1-го поколения. В возрасте 1 мес у крыс-самцов 1-го поколения анализировали общебиологические показатели (массу тела, общее количество животных, в том числе самцов и самок в контроле и опыте). Эксперименты выполняли на крысах-самцах потомства при достижении возраста 2, 4 и 6 мес.

Перед опытами крыс взвешивали, после декапитации извлекали семенники с придатками, которые взвешивали для последующего расчета их относительной массы. Семенники освобождали от туники и кровеносных сосудов и определенную навеску тестикулярной ткани использовали для получения клеточной суспензии, в которой проводили количественный анализ различных типов сперматогенных клеток методом ДНК-проточной цитометрии (цитофлюориметр Cytomics FC 500, Beckman Coulter, США) при длине волны 488 нм [8]. Основываясь на соответствующей

интенсивности флюоресценции содержания ДНК, клеточные популяции сперматогенных клеток были классифицированы как сперматогонии (2С), сперматоциты I порядка (4С), сперматоциты в S-фазе, круглые сперматиды (1С), удлинённые сперматиды (НС1) и продолговатые сперматиды (НС2). Из эпидидимиса выделяли зрелые половые клетки, число которых подсчитывали в камере Горяева [9] и в них определяли жизнеспособность с помощью окрашивания эозин-нигрозинном [10], продукцию активных форм кислорода (АФК) [11] и индекс фрагментации [12].

Контролем служили крысы-самцы 1-го поколения, полученные от интактных животных аналогичного возраста. Результаты исследований обрабатывали статистически общепринятыми методами с вычислением степени достоверности с использованием *t*-критерия Стьюдента при уровне значимости  $p < 0,05$ .

**Результаты и их обсуждение.** Количество животных, полученных от облученных в дозах 0,5 Гр самок и необлученных самцов, снизилось по сравнению с числом животных, полученных в контроле. От контрольных (интактных) животных родилось 37 животных, из них 20 самцов и 17 самок, в то время как число животных, полученных от облученных самок и необлученных самцов, составило 33, из них 20 самцов и 13 самок, при этом масса тела самцов 1-го поколения в возрасте 1 мес в опыте превышало контрольные значения на 10,0 %, а у самок на 25,7 %.

Анализ абсолютной и относительной массы семенников крыс-самцов 1-го поколения, полученного от облученных самок (доза 0,5 Гр) показывает, что эти показатели у животных всех возрастных групп (2, 4 и 6 мес) снижаются. Однако падение данного показателя имеет более значимый характер для крыс-самцов в возрасте 4 мес, когда и абсолютная и относительная масса семенников достоверно уменьшается на 13,2 и 9,3 % соответственно. В то же время показатели массы эпидидимисов опытных и контрольных крыс-самцов уменьшаются только у 2-месячных животных, а в возрасте 4 и 6 мес они от контроля практически не отличаются (табл. 1).

Т а б л и ц а 1. Изменение массы тела, абсолютной и относительной массы семенника и эпидидимиса крыс в различные возрастные периоды у потомства 1-го поколения, полученного от облученных в дозе 0,5 Гр самок и необлученных самцов

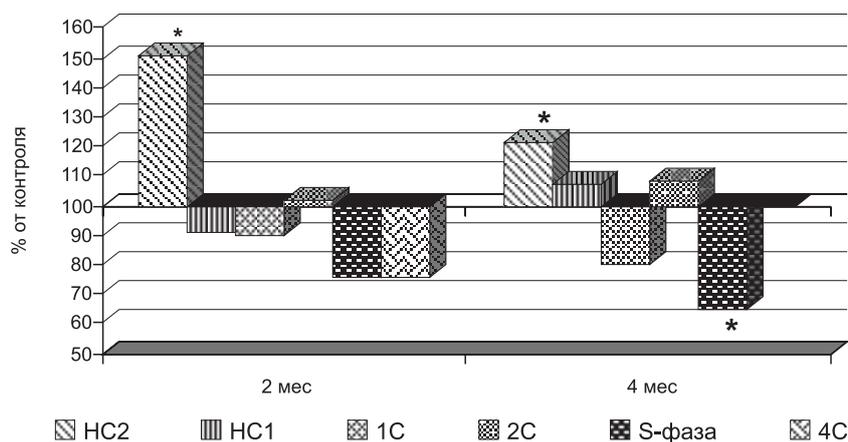
Серия опытов	Масса тела, г	АМ семенника, г	ОМ семенника, %	АМ эпидидимиса, г	ОМ эпидидимиса, %
<i>Возраст животных – 2 мес</i>					
Контроль	134,40±5,00	0,96±0,035	0,70±0,026	0,14±0,009	0,10±0,006
0,5 Гр	130,83±5,24	0,86±0,037	0,66±0,026	0,11±0,006	0,08±0,009
% к контролю	97,3	89,6	94,3	78,6	84,6
<i>Возраст животных – 4 мес</i>					
Контроль	250,75±10,04	1,36±0,058	0,54±0,020	0,43±0,011	0,17±0,005
0,5 Гр	239,00±6,10	1,18±0,024*	0,49±0,011*	0,41±0,017	0,17±0,007
% к контролю	95,3	86,8	90,7	95,4	100,0
<i>Возраст животных – 6 мес</i>					
Контроль	348,6±8,55	1,53±0,035	0,44±0,013	0,49±0,006	0,14±0,004
0,5 Гр	365,25±19,38	1,50±0,074	0,41±0,027	0,50±0,018	0,14±0,009
% к контролю	104,8	98,04	93,2	102,04	100,0

П р и м е ч а н и е. АМ – абсолютная масса, ОМ – относительная масса.

\* Достоверно при  $p < 0,05$

Процесс сперматогенеза, о котором можно судить по динамике количества различных типов сперматогенных клеток в тестикулярной ткани, на начальном этапе (сперматогонии) у крыс-самцов 1-го поколения в возрасте 2 мес близок к контролю (рисунок); последующие этапы (сперматоциты 1-го порядка и сперматоциты в S-фазе) характеризуются существенным снижением числа этих клеток (почти на 25 %), количество округлых и удлинённых сперматид также снижается, а число продолговатых сперматид достоверно повышается до 150,6 % по отношению к контролю.

Количество сперматогенных клеток различных стадий сперматогенеза в тестикулярной ткани у опытных крыс-самцов в возрасте 4 мес, хотя и несколько отличается от такового для 2-месячных животных, в основном близка к вышеописанному для 2-месячных животных,



Изменение количества различных типов сперматогенных клеток в тестикулярной ткани крыс-самцов 1-го поколения в возрасте 2 и 4 мес, полученных от облученных в дозе 0,5 Гр самок и необлученных самцов: HC2 – продолговатые сперматиды; HC1 – удлинённые сперматиды; 1C – круглые сперматиды; 2C – сперматогонии; S-phase – сперматоциты в прелетотене; 4C – сперматоциты I порядка. Звездочка (\*) –  $p < 0,05$

т. е. наблюдается падение числа сперматогенных клеток от сперматоцитов 1-го порядка до удлинённых сперматид включительно и повышение количества продолговатых сперматид по сравнению с контролем (до 121,1 %). Количественный дисбаланс состава сперматогенных клеток свидетельствует о выраженном нарушении процесса сперматогенеза у крыс-самцов 1-го поколения, полученного от облученных самок и необлученных самцов.

Считается, что сперматиды являются одной из чувствительных стадий сперматогенеза к облучению [5]. В данном случае, поскольку исследованные крысы-самцы непосредственно облучению не подвергались, изменение количества сперматид и других сперматогенных клеток обусловлено изменениями в геноме гамет облученных самок, что проявляется в виде отдаленных последствий у потомства 1-го поколения.

При сравнении количественных и качественных показателей сперматозоидов, выделенных из эпидидимиса животных 1-го поколения, полученных от облученных в дозе 0,5 Гр самок и интактных самцов, можно отметить следующее. Количество эпидидимальных сперматозоидов у крыс-самцов в возрасте 2 мес в контроле и в опыте не отличается и оно находится на низком уровне, что отражает состояние процесса сперматогенеза у неполовозрелых животных (табл. 2). У 4-месячных животных выявляется выраженная тенденция к падению числа сперматозоидов у экспериментальных животных (84,9 %) и их число остается на пониженном уровне через 2 мес (6-месячные животные).

Т а б л и ц а 2. Изменение некоторых количественных и качественных показателей сперматозоидов, выделенных из эпидидимисов крыс-самцов в различные возрастные периоды, полученных от облученных самок в дозе 0,5 Гр, и необлученных самцов

Показатель	2 мес		4 мес		6 мес	
	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт	Контроль	Опыт
СПЗ · 10 <sup>8</sup> /г ткани	0,012 ± 0,003	0,012 ± 0,002	0,054 ± 0,005	0,046 ± 0,001	0,057 ± 0,004	0,053 ± 0,005
% к контролю	100,0	100,0	100,0	84,9	100,0	93,2
Жизнеспособность	58,00 ± 3,11	53,80 ± 2,78	23,00 ± 3,61	12,33 ± 1,33*	31,8 ± 5,04	35,25 ± 6,27
% к контролю	100,0	92,8	100,0	53,6	100,0	110,8
Продукция АФК · 10 <sup>6</sup> кл <sup>-1</sup> · 1 ч <sup>-1</sup>	0,14 ± 0,06	0,20 ± 0,04	0,27 ± 0,01	0,28 ± 0,03	0,28 ± 0,04	0,33 ± 0,02
% к контролю	100,0	142,8	100,0	103,7	100,0	117,8
Индекс DFI, %	1,15 ± 0,15	0,61 ± 0,09*	1,00 ± 0,24	0,66 ± 0,06	3,04 ± 0,36	1,96 ± 0,52
% к контролю	100,0	52,7	100,0	65,4	100,0	64,3

\* Достоверно при  $p < 0,05$ .

Жизнеспособность сперматозоидов у животных 2- и 4-месячного возраста опытной группы существенно уменьшается (соответственно до 92,8 и 53,6 %) и повышается до 110,8 % у крыс-самцов в возрасте 6 мес (табл. 2). В зрелых половых клетках крыс 1-го поколения, полученных

от облученных самок (0,5 Гр), также наблюдается повышение продукции АФК. В большей степени оно выражено у животных в возрасте 2 мес (142,8 %), в 4-месячном возрасте почти не отличается от контрольного уровня (103,7 %), вновь увеличиваясь у 6-месячных животных (117,8 %). Как известно, избыточная генерация АФК может оказывать дестабилизирующее влияние на клетку, вызывая в ней окислительный стресс, нарушение структуры ДНК, что может отразиться на оплодотворяющей способности сперматозоидов [13].

В зрелых половых клетках животных, полученных от облученных самок (доза 0,5 Гр), также оценивали индекс фрагментации ДНК (индекс DFI). Установлено, что этот показатель, характеризующий качество клеток, отражающий количество разрывов в молекуле ДНК в сперматозоидах, значительно падает у животных всех исследованных возрастных групп (табл. 2). В данном случае речь идет о снижении повреждений ДНК в зрелых половых клетках у крыс-самцов, полученных от самок, облученных в дозе 0,5 Гр. По-видимому, данный факт требует дополнительных исследований, так как он не вполне коррелирует с тенденцией к повышению уровня АФК в сперматозоидах и, возможно, обусловлен уплотнением хроматина в половых клетках опытных животных [14].

**Заключение.** Последствия облучения самок в указанных дозах в основном проявляются у крыс-самцов 1-го поколения в снижении количества родившихся животных, падении абсолютной и относительной массы семенников (особенно значительно у 4-месячных животных) и эпидидимисов (2 мес), угнетении процесса сперматогенеза на стадиях от сперматоцитов 1-го порядка до продолговатых сперматид включительно, повышении числа удлинённых сперматид, изменении количественных и качественных характеристик эпидидимальных сперматозоидов (количества, жизнеспособности, продукции активных форм кислорода, индекса фрагментации ДНК). Причины этих изменений связаны с дестабилизацией наследственных структур у облученных самок, которые в дальнейшем отражаются на постнатальном развитии крыс-самцов 1-го поколения.

Полученные результаты указывают на высокий риск развития неблагоприятных последствий у потомства в отдаленном периоде при облучении родителей (в данном случае самок) и необходимостью разработки методов, позволяющих минимизировать реализацию негативных эффектов.

## Литература

1. Степанова Е. И., Вдовенко В. Ю., Мишарина Ж. А. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2007. Т. 47, №5. С. 523–529.
2. Ахматуллина Н. Б. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2005. Т. 45, №6. С. 680–687.
3. Палыга Г. Ф. // Радиационная биология. Радиоэкология. 2002. Т. 42, №4. С. 390–394.
4. Палыга Г. Ф., Чибисова О. Ф., Иванов В. Л. и др. // Радиация и риск. 2010. Т. 19, №4. С. 58–62.
5. Нефедов И. Ю. Наследственные последствия облучения обоих родителей (экспериментальное исследование на крысах линии Вистар): Автореф. дис. ... д-ра биол. наук. Обнинск, 1998.
6. Нефедов И. Ю., Палыга Г. Ф. // Радиационная биология. Радиоэкология. 1995. Т. 35, №3. С. 375–380.
7. Дергилев А. А., Палыга Г. Ф., Иванов В. Л., Панфилова В. В. // Бюл. Национального радиационно-эпидемиологического регистра «Радиация и риск». 2012. Т. 21, №4. С. 51–60.
8. Suresh R., Aravindan G. R., Moudgal N. R. // J. Biosci. 1992. Vol. 17, N4. P. 413–419.
9. Евдокимов В. В., Коденцова В. М., Вржесинская О. А. и др. // Бюл. экп. биол. и мед. 1997. Т. 123, №5. С. 524–527.
10. World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – 5<sup>th</sup> ed. WHO Press. Geneva. Switzerland. 2010. P. 26–28.
11. Sutherland M. W., Learmonth B. A. // Free Radic. Res. 1997. Vol. 27, N3. P. 283–289.
12. Evenson D. P., Larson K. L., Jost L. K. // J. Androl. 2002. Vol. 23, N1. P. 25–43.
13. Agarwal A., Prabakaran S. A., Said T. M. // J. Androl. 2013. Vol. 26, N6, P. 654–660.
14. Маркова Е. В., Замай А. С. // Пробл. репродукции. 2006. №4. С. 42–50.

G. G. VERESCHAKO, N. V. THUESHOVA, E. V. ANDRONOVA

## IMPLICATIONS OF BEAM EFFECTS IN THE REPRODUCTIVE SYSTEM MALE RATS 1st GENERATION RECEIVED FROM FEMALE IRRADIATED WITH A DOSE OF 0,5 Gy

### Summary

The results of studies of the reproductive system of male rats obtained from irradiated at a dose of 0,5 Gy females and intact males are presents. It is shown that in experimental animals revealed a number of deviations of the studied parameters of the reproductive system, which are treated as long-term consequences irradiated female.