

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ООЦИТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» (м. Київ)

Дослідження проведені в рамках науково-дослідної роботи № 405 «Дослідити вплив іонізуючої радіації на статеві клітини тварин» (№ держреєстрації 0106U002355) лабораторії радіаційної біохімії Інституту експериментальної радіології ДУ «ННЦРМ НАМН України».

Вступ. Яйцеклітина, що формується в процесі оогенезу, на відміну від сперматозоїда, який містить залишки цитоплазми, мітохондрії, редукований комплекс Гольджі, характеризується добре розвинутою цитоплазмою з повним набором клітинних органелів та великим запасом поживних речовин, цитоплазматичних ферментів та довго живучих матричних РНК [3, 10]. Процес утворення ооцитів I порядку з оогоніїв закінчується ще в ембріогенезі. Так, у семимісячному ембріоні людини більша частина з 7 млн. оогоніїв гине, а решта вступає в мейоз, досягає стадії диплотени і з цього моменту призупиняє подальший розвиток до початку статевого дозрівання, залишаючись весь час на стадії ооцитів I порядку. При народженні дитини в яєчниках знаходиться приблизно 1 мільйон примордіальних фолікулів [7], кожний з яких являє собою ооцит I порядку, що оточений одним шаром епітеліальних клітин гранульоци. Хоча велика кількість фолікулів здатна до росту, лише деякі з них утворюють ооцити II порядку, що залишають яєчник в процесі овуляції. Вважається, що протягом репродуктивного життя жінки лише приблизно 400–500 зрілих ооцитів є здатними до потенційного запліднення.

Аналізу впливу іонізуючого опромінення на яйцеклітини тварин присвячена певна низка наукових публікацій, в яких радіочутливість яєчників деяких видів ссавців наводиться у наступній послідовності: миша→людина→золотистий хом'як, щур→мурчак, кролик. Встановлено, що кінцева реакція яйцеклітини на дію іонізуючого опромінення залежить не тільки від дози, потужності та режиму опромінення, але й від стадії її розвитку [5, 9]. Так, γ -опромінення білих щурів у період формування репродуктивної системи в ембріогенезі призводило до зниження життєздатності посліду при дозах 0,5–2 Гр та появи вроджених вад при дозах вище 1,5 Гр [1, 2, 4, 11]. Однак вказані дози радіації можуть не тільки викликати у опромінених тварин загибель примордіальних ооцитів, але й прискорювати подальший розвиток цих клітин [12]. В цьому зв'язку було помічено, що інколи після опромінення статевозрілих тварин в яєчниках спостерігаються ефекти постпроменевої стимуляції [5]. Хоча факт постпроменевої суперовуляції є підтвердженим, однак механізм цього явища до теперішнього часу достеменно не з'ясований. В той же час, чітко доведеним є те, що після опромінення у нестерилізуючих дозах при надмірній овуляції суттєво знижується відносна кількість повноцінних гамет,

а утворене потомство характеризується геномними порушеннями та зниженою життєздатністю.

Результати досліджень радіаційних ефектів в яєчниках довели, що опромінення призводить до порушення морфології та функції яєчників, розладів циклу, зниження плодючості та життєздатності потомства. Також показано, що радіочутливість жіночих гамет залежить від стадії оогенезу і віку самок на момент опромінення [13, 14].

Мета досліджень полягала у вивченні функціональних властивостей та життєздатності ооцитів II порядку після проведення їх опромінення як в ізолюваних яйцеходах на поживному середовищі, так і після тотального опромінення експериментальних тварин гамма- та рентгенівськими променями в різних дозах і режимах.

Об'єкт і методи дослідження. Дослідження проводились на статевозрілих білих безпородних щурах-самках масою 180–250 г розведення місцевого віварію, що утримувались на стандартному раціоні за умов 12-годинного світлового дня. Експерименти здійснені у відповідності до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Експериментальних тварин було поділено на дві групи. I групу склали тварини, яких опромінювали тотально, а II групу – тварини, у яких вилучали матку з яйцеходами для опромінення в умовах *in vitro*.

Першу групу тварин тотально опромінювали на установці «РОКУС» (джерело гамма-квантів – ^{60}Co ; потужність дози 1,06 Гр/хв) в дозах 0,5; 1,0 та 2,0 Гр. Тварин декапітували через 2, 7, 14, та 30 днів після опромінення та вилучали у них ооцити II порядку. Перед декапітацією тваринам робили підшкірно ін'єкцію гонадотропіну сироватки жеребої кобили, 5–10 од. ("Sigma", Німеччина), а через 48 год – внутрішньочеревно ін'єкцію хоріонічного гонадотропіну людини, 5–10 од. („Sigma", Німеччина) для стимуляції суперовуляції [6].

У другій групі тварин також проводили стимуляцію суперовуляції, а через 14–15 год щурів декапітували і вилучали матку з яйцеходами, котрі поміщали в скляні бюкси з ізотонічним розчином хлориду натрію (NaCl) при кімнатній температурі для подальшого опромінення.

Опромінення ізолюваних органів проводили на установці РУМ-17 (потужність дози 0,34 Гр/хв, фільтри 0,5 мм Cu та 1 мм Al, сила струму 10 mA, напруга 200 кВ) та гамма-променями $\text{Co}60$ на установці „Дослідник” при потужності дози 0,20 Гр/с різними дозами в широкому дозовому діапазоні від 1 до 600 Гр.

Ооцити вимивали з ампул яйцеходів в середовище KSOM-H (95 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 0,35 mM KH_2PO_4 , 0,2 mM MgSO_4 , 10 mM лактат натрію, 0,2 mM глюкоза, 0,2 mM піруват натрію, 25 mM NaHCO_3 ,

1,71 мМ CaCl₂, 1 мМ глутамін, 0,01 мМ ЕДТО, 1,0 мг/мл БСА, 1 % HEPES). Для видалення клітин кумулюса ооцити інкубували в краплі середовища KSOM-H з гіалуронідазою в концентрації 80–100 од./мл („Sigma”, Германія) протягом 5 хв, потім відмивали в середовищі KSOM-H, знову переносили в середовище KSOM-H і зберігали протягом 2–5 год при 37 оС [6].

Для довгострокового зберігання частини ооцитів в поживне середовище додавали 1,5 Н DMSO як криопротектант, а потім поступово знижували температуру до +5 оС, -20 оС та -56 оС. Згодом зразки переносили у рідкий азот.

Життєздатність ооцитів оцінювали за допомогою вітального барвника – 1% метиленового синього.

Статистичну обробку результатів дослідження з використанням критерію Стюдента для оцінки достовірності проводили за допомогою програми Statistica 7.0. Відмінності вважали достовірними при $p < 0,05$ [8].

Результати досліджень та їх обговорення.

На **рис. 1** представлена діаграма, що описує вплив різних доз гамма-опромінення на вихід ооцитів II порядку після суперовуляції у опроміненних самок.

Так, на 2 день після опромінення в дозі 0,5 Гр вдалося отримати 21 ооцит II порядку, що складало 70% від контрольного значення. Через 7 та 14 діб чисельність ооцитів II починала збільшуватись до 74% та 87% відповідно, однак все одно не поверталась до рівня контролю. Зі збільшенням післярадіаційного періоду до 30 діб кількість ооцитів II повністю відновлювалась до контрольного значення та становила 31 ооцитів II порядку.

При дозі тотального опромінення в 1 Гр вихід ооцитів II через 2 доби після опромінення достовірно зменшувався майже в 2 рази відносно контролю. Виявлений ефект зберігався і на 7 добу після опромінення, коли кількість отриманих яйцеклітин після суперовуляції становила лише 16 ооцитів II. Через 14 та 30 діб після тотального опромінення шурів вихід супервовульованих ооцитів II поступово зростає до 19 та 23 яйцеклітин відповідно, але все ж таки не повертався до контрольного значення (**рис. 1**).

Застосування дози в 2 Гр призводило до суттєвого зменшення виходу ооцитів II через 2 доби і 7 діб після опромінення, що становив відповідно 13% та 19% контрольного рівня. У більш віддалені строки пострадіаційного періоду (14 та 30 діб) чисельність ооцитів II складала лише 10 та 11 клітин, відповідно, що в 3 рази менше значення контролю (**рис. 1**).

Виявлені ефекти впливу тотального опромінення шурів-самиць на вихід ооцитів II порядку після суперовуляції свідчать, що після дії іонізуючої радіації в дозах 0,5-1 Гр зберігається здатність до відновлення процесу утворення ооцитів II в фолікулах, тоді як опромінення в дозі 2 Гр призводить до різкого пригнічення процесу оогенезу, відновлення якого не спостерігається навіть після 30 діб пострадіаційного періоду.

При визначенні кількості життєздатних ооцитів II порядку, отриманих в результаті суперовуляції опроміненних самок в післярадіаційний період виявилось, що доза тотального опромінення в 0,5 Гр зумовлювала зменшення кількості життєздатних ооцитів II порядку до 55% через 2 доби. Починаючи з 7 доби, цей показник пропорційно зростає зі збільшенням

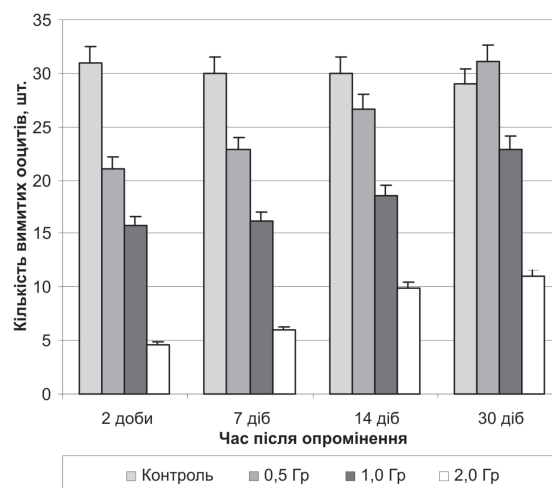


Рис. 1. Вихід ооцитів II порядку за умов тотального опромінення самок після проведення суперовуляції ($M \pm m$; $n=8$).

Примітка: * - статистичні відмінності порівняно з контролем при $p < 0,05$.

терміну. Так, життєздатність дорівнювала 70% від загальної кількості ооцитів II через 7 діб, 83% - через 14 діб та 91% - після 30 діб (**рис. 2**). Слід звернути увагу, що через 30 діб після опромінення кількість життєздатних ооцитів II майже повністю відновлювалась.

При опроміненні в дозі 1,0 Гр на 2 добу вихід життєздатних ооцитів становив 42%, а вже через 7 діб після опромінення утворювалось 58% життєздатних клітин. На 14 та 30 добу пострадіаційного періоду вихід життєздатних ооцитів II порядку наближався до 62% та 71%, відповідно, але все ж таки не повертався до контрольного значення (**рис. 2**).

Опромінення тварин в дозі 2 Гр призводило до суттєвого падіння кількості життєздатних ооцитів II, що складало лише 32% від загальної кількості яйцеклітин через 2 доби після дії іонізуючої радіації. Зі збільшенням тривалості післярадіаційного періоду відновлення пулу життєздатних ооцитів II не спостерігалось навіть через 30 діб. Досліджуваний показник залишався досить низьким та був на рівні 42% (**рис. 2**).

Проведені дослідження по вивченню життєздатності ооцитів II порядку шурів за умов дії іонізуючої радіації показали, що зменшення кількості життєздатних яйцеклітин мало дозозалежний характер, при цьому найбільше падіння показника спостерігалось при опроміненні в дозі 2 Гр. Повне відновлення чисельності життєздатних ооцитів через 30 діб спостерігалось лише при опроміненні в дозі 0,5 Гр, тоді як доза в 1,0 Гр після 30 діб пострадіаційного періоду призводила лише до часткового відновлення пулу життєздатних ооцитів II, що становило 72% відносно контрольного значення.

При проведенні опромінення зрілих ооцитів, що знаходились в ізольованих яйцеводах, в різних дозах іонізуючої радіації з потужністю в 0,2 Гр/сек було показано, що дозова крива мала помітне плече ($D_q = 75$ Гр) (**рис. 3**). При фракціонованому опроміненні (двома напівдозами з тією ж потужністю) плече на дозовій кривій збільшувалось ($D_q = 110$ Гр),

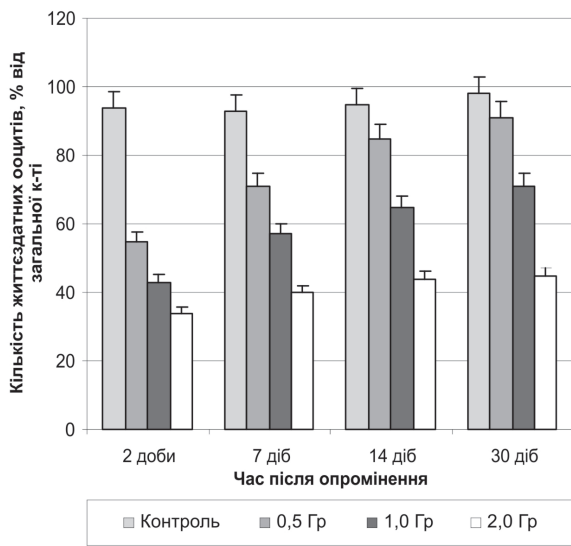


Рис. 2. Вплив дози тотального опромінення та часу витримування на життєздатність супервовульованих ооцитів II порядку щурів ($M \pm m$; $n=8$).
Примітка: * - статистичні відмінності порівняно з контролем при $p \leq 0,05$.

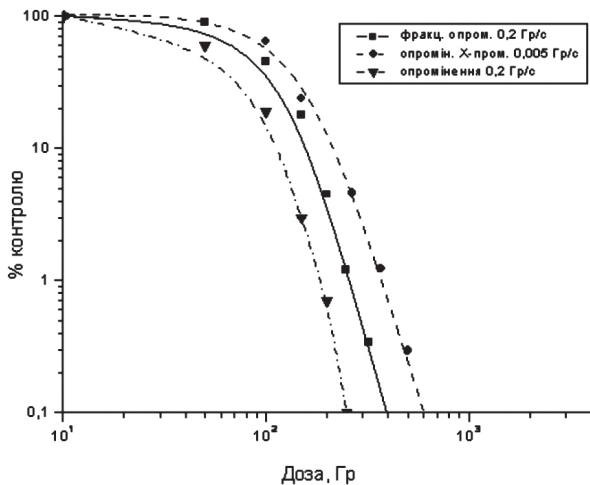


Рис. 3. Вплив дози та режиму опромінення на виживання ооцитів II порядку щурів.

що вказувало на реалізацію процесів відновлення сублетальних пошкоджень в опроміненних ооцитах II. Зменшення потужності дози іонізуючого опромінення зумовлювало появу ще більш вираженого плеча на дозовій кривій ($Dq = 150$ Гр), що на нашу думку, вказує на посилення репараційних процесів в жіночих гаметах і на зростання їх радіорезистентності в умовах низькоінтенсивного радіаційного впливу.

Таким чином, проведені дослідження показали, що статеві жіночі системи тварин здатні протидіяти

шкідливому впливу радіаційного чинника, оскільки достатня частина ооцитів I порядку після дії іонізуючого випромінювання могла утворювати життєздатні гаплоїдні ооцити II порядку.

В свою чергу, репарація променевих пошкоджень в гаплоїдних ооцитах II відбувається при дозах значно перевищуючих порогові значення для виживання самих тварин. Це дає підстави стверджувати про існування подвійного протирадіаційного захисту в жіночих статевих клітинах щурів як на диплоїдному, так і гаплоїдному рівні. Встановлений феномен свідчить про наявність у самок щурів підвищеного репродуктивного потенціалу для існування в екстремальних умовах зовнішнього середовища.

Висновки.

1. Тотальне опромінення щурів в дозах 0,5-1 Гр пригнічує процеси утворення ооцитів II порядку та дозрівання фолікулів в перші два тижні після опромінення, після чого поступово відбувається поновлення процесу протягом 30 днів. При опроміненні в дозі 2 Гр відновлення процесу супервовуляції було лише частковим.

2. Перевірка життєздатності ооцитів II за допомогою вітального забарвлення виявила, що початкове зменшення життєздатності клітин в перші дні після опромінення при дозах 0,5-1,0 Гр поступово зникає в більш віддалені терміни. Швидкість нормалізації вказаного критерію прямим чином залежала від дози тотального опромінення.

3. Дозова залежність виживання ооцитів II порядку після опромінення іонізуючою радіацією з потужністю дози 0,2 Гр/с описується кривою з чітко вираженим плечем і має значення Dq в 75 Гр. Зменшення потужності дози опромінення до 0,005 Гр/с зумовлює збільшення плеча дозової кривої і зростання радіорезистентності ооцитів II в результаті реалізації процесів після радіаційного відновлення.

4. Показано здатність зрілих ооцитів II до ліквідації сублетальних пошкоджень, що відбувалось в умовах фракціонованого опромінення двома напівдозами і мало прояв в зростанні Dq з 75 Гр до 110 Гр при потужності в 0,2 Гр/с. Отримані дані свідчать про надійність механізму протирадіаційного захисту репродуктивної функції у самок щурів.

Перспективи подальших досліджень. Враховуючи те, що кількість життєздатних ооцитів II порядку при опроміненні іонізуючою радіацією зменшується та повністю відновлюється лише в окремих випадках, в подальших дослідженнях планується вивчити шляхи радіаційної загибелі, а саме розвиток процесів апоптозу та некрозу, в ооцитах II за умов тотального та локального опромінення експериментальних тварин.

Список літератури

1. Банецкая Н.В. Динамика фолликулогенеза в яичнике потомства от облученных в эмбриогенезе и ранней постнатальной жизни животных / Н.В. Банецкая, А.П. Амвросьев // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2000. – Т.43, №3. – С.250-253.
2. Банецкая Н.В. Развитие зародышей крысы после пролонгированного облучения овоцитов на стадии примордиальных фолликулов / Н.В. Банецкая, В.С. Павленко // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т.43, №6. – С.613-617.
3. Гилберт С. Биология развития. Т.3 / С. Гилберт. – М.: Мир, 1995. – 352с.

4. Палыга Г.Ф. Последствия для потомства двух поколений облучения беременных самок-крыс Вистар в малых дозах в период закладки репродуктивной системы плодов. Развитие потомства первого поколения / Г.Ф. Палыга, О.Ф. Чибисова // Радиационная биология. Радиоэкология. – 2003. – Т.43, №4. – С. 439-442.
5. Пожидаев Е.А. Оогенез млекопитающих (его значение для эмбрионального развития в норме и патологии) / Е.А. Пожидаев. – Л.: Медицина, 1967. – 171с.
6. Федорова И.Д. Цитогенетический анализ сперматозоидов человека с использованием внутрицитоплазматической инъекции в ооциты мыши / И.Д. Федорова, Т.В. Кузнецова, В.С. Баранов // Генетика. – 2005. – Т. 41, № 3. – С. 396-404.
7. Baker T.G. Oogenesis and ovulation. In: Reproduction in Mammals. 2nd ed. / T.G. Baker – Cambridge: Cambridge University Press, 1982. – P.17–45.
8. Bland M. An introduction to medical statistics. 3rd editor / M. Bland. – Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. – 405p.
9. Jacquet P. Sensitivity of germ cells and embryos to ionizing radiation / P. Jacquet // Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents. – 2004, Vol.23. – P. 106-114
10. Kashir J. Oocyte activation, phospholipase C zeta and human infertility / J. Kashir, B. Heindryckx, C. Jones, P. De Sutter, J. Parrington, K. Coward // Human Reproduction Update. – 2010. – Vol. 16, No.6. – P. 690–703.
11. Martinez-Flores I. Effects of ionizing radiation on oocytes of prepubertally irradiated rats / I. Martinez-Flores, C. Saez, J. Egozcue, M. Garcia // Int. J. Radiat. Biol. – 2000. – Vol. 76, №10. – P. 1403-1407.
12. Romanova L.K. The radiation effects of low doses of irradiation on human embryos and fetuses / L.K. Romanova, E.S. Zhorova // Ontogenez. – 1994. –Vol. 25, № 3 – P. 55-65.
13. Russell W.L. Recent studies on the genetic effects of radiation in mice / W.L. Russell // Pediatrics. – 2000. – Vol. 41. – P. 223-230.
14. Wallace W.H. The radiosensitivity of the human oocyte / W.H. Wallace, A.B. Thomson, T.W. Kelsey // Hum. Reprod. – 2003. – Vol. 18, № 1. – P. 117-121.

УДК 612.621.9:591.391:612.014.4

ВПЛИВ ІОНІЗУЮЧОГО ВИПРОМІНЮВАННЯ НА ООЦИТИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНИХ ТВАРИН

Ватліцова О.С., Кондратова Ю. А., Клепко А.В., Андрейченко С.В.

Резюме. Досліджували вплив різних доз іонізуючої радіації на зрілі ооцити щурів при проведенні одноразового та фракціонованого (двома напівдозами) опромінення, а також при застосуванні випромінювання різних інтенсивностей. Встановлена здатність ооцитів II до здійснення репараційних процесів та ліквідації сублетальних пошкоджень. Крім того, показано, що тотальне опромінення в дозах 0,5-1 Гр призводило до пригнічення суперовуляції в перші 2 тижні після опромінення. Незворотне зменшення суперовуляції спостерігалось при дозі в 2 Гр. Встановлено пряму залежність між дозою тотального опромінення та тривалістю терміну нормалізації процесу суперовуляції, якщо його оцінювати по критерію життєздатності ооцитів II.

Ключові слова: рентгенівське опромінення, гамма-опромінення, суперовуляція, ооцит II порядку, сублетальні пошкодження.

УДК 612.621.9:591.391:612.014.4

ВЛИЯНИЕ ИОНИЗИРУЮЩЕГО ИЗЛУЧЕНИЯ НА ООЦИТЫ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫХ ЖИВОТНЫХ

Ватліцова О. С., Кондратова Ю.А., Клепко А.В., Андрейченко С.В.

Резюме. Исследовали влияние разных доз ионизирующей радиации на зрелые ооциты крыс при проведении одноразового и фракционированного (двумя полудозами) облучения, а также при использовании излучения разных интенсивностей. Установлена способность ооцитов II осуществлять репарационные процессы и ликвидировать сублетальные повреждения. Кроме того, показано, что тотальное облучение животных в дозах 0,5-1 Гр оказывало угнетающий эффект на суперовуляцию в первые 2 недели после облучения. Необратимое уменьшение суперовуляции наблюдалось при дозе в 2 Гр. Установлено также существование прямой зависимости между дозой тотального облучения и длительностью срока по нормализации процесса суперовуляции, оцениваемого по критерию жизнеспособности ооцитов II.

Ключевые слова: рентгеновское облучение, гамма-облучение, суперовуляция, ооцит II порядка, сублетальные повреждения.

UDC 612.621.9:591.391:612.014.4

Effects Of Ionizing Radiation On Oocytes Of Laboratory Animals

Vatlitsova O.S., Kondratova Y. A., Klepko A.V., Andreychenko S.V.

Summary. The effects of ionizing radiation in various doses on rat mature oocytes for single dose and fractional (two half-doses) irradiation as well as for the irradiation with different dose input have been studied. Oocyte II were shown to be able to repair radiation lesions and sublethal damages. Apart from this, it has been elucidated that the total body irradiation in the doses 0.5 and 1 Gy resulted in inhibitory impact on superovulation in the first 2 weeks of post-irradiation period. Irreversible suppression of superovulation under 2 Gy irradiation was observed. In addition, the existence of direct dependence between the dose of total body irradiation and the time longevity for superovulation normalization by the criterium of oocyte II viability has been established.

Key words: irradiation, X-rays, gamma-rays, superovulation, oocytes II order, sublethal damages.

Стаття надійшла 21.02.2012р.