

© Саковська Л. В., Горбань Л. В., Мотрина О. А., Грубська Л. В., Клепко А. В.

УДК 577.1:611.013.11/57.042

**Саковська Л. В., Горбань Л. В., Мотрина О. А., Грубська Л. В.,
Клепко А. В.**

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ НА ВИЖИВАННЯ ТА РОЗВИТОК СПЕРМАТОГОНІЙ ПРИ ЛОКАЛЬНОМУ ОПРОМІНЕННІ ТЕСТИКУЛ ЩУРІВ

**Державна установа «Національний науковий центр
радіаційної медицини НАМН України» (м. Київ)**

alla.klepko@gmail.com

Дослідження виконано в рамках науково-дослідної роботи лабораторії радіаційної біохімії Інституту експериментальної радіології ДУ «Національний науковий центр радіаційної медицини НАМН України» «Розробка прогностичних маркерів оцінки спермопродукуючої функції генеративного епітелію за умов дії іонізуючої радіації», № державної реєстрації 0115U002698.

Вступ. Клітини сперматогенного епітелію сім'яних каналців ссавців, до яких відносяться сперматогонії, сперматоцити, сперматиди та сперматозоїди вже впродовж цілого століття є об'єктом різноманітних радіобіологічних досліджень [2,3,8].

За цей час вдалось встановити, що тестикулярна паренхіма є однією з найбільш радіочутливих тканин організму до дії рентгенівських та гамма-променів, оскільки пошкоджуюча дія радіації на неї має прояв вже при дозах 0,15-0,3 Гр. У людини, наприклад, це стає причиною появи тимчасової олігозооспермії [9,14]. По-друге, виявилось, що гермінативні клітини теж відрізняються за своєю радіочутливістю. Так, у щурів найбільш чутливими до радіації є проміжні (A_{in}) та В-сперматогонії, а також недиференційовані А-сперматогонії з коротким клітинним циклом (A_{pr} , A_{ai}), котрі гинуть при опроміненні в дозах менше за 1,0 Гр. В той же час, стовбурові Аs-сперматогонії можуть витримувати дози до 10,0 Гр [10,11]. Саме за рахунок радіорезистентних Аs-сперматогоніїв відбувається репопуляція та відновлення сперматогенного епітелію сім'яних каналців. В той же час, для сперматоцитів характерна помірна радіорезистентність, що дає їм змогу виживати при дозах 2,0-3,0 Гр, тоді як найбільша радіорезистентність притаманна сперматидам та сперматозоїдам, причому останні здатні зберігати свою рухливість та морфологічні ознаки після опромінення в дозах до 1000 Гр [1,5,6,16].

Аварія на ЧАЕС та велика кількість екологічно небезпечних індустріальних підприємств сприяли у значній мірі тому, що більшість чоловічого населення України зараз проживає на радіоактивно та хімічно забруднених територіях і, внаслідок цього, утворює групу ризику щодо розвитку репродуктивної та онкологічної патології. Крім того, застосування радіотерапії при лікуванні онкозахворювань теж з великою імовірністю може спричинити радіаційне пошкодження генеративних клітин. В цьому зв'язку

виникає потреба в розробці адекватних підходів для оцінки складності та тривалості радіоіндукованої чоловічої інфертильності за допомогою сучасних молекулярних маркерів.

Враховуючи, що основним критерієм відновлення репродуктивної системи є здатність до відтворення потомства, використання тваринних модельних систем є дуже корисним. До того ж, для більшості видів лабораторних тварин, зокрема щурів, чітко встановлені тривалість циклу сперматогенного епітелію і повна довжина сперматогенезу, що дорівнює 12,9 та 65 днів, відповідно. Крім того, показано, що ці величини не змінюються при дії радіації. Проте, післярадіаційні ефекти в значній мірі мають генотип-специфічну залежність, що зумовлює появу різних променевих реакцій у відповідь на опромінення не тільки на рівні виду, але й навіть інбредної лінії [4]. В зв'язку з цим виникає потреба у проведенні попередньої деталізації поведінки конкретної модельної системи на дію радіації.

Мета дослідження – вивчення динаміки виживання та розвитку сперматогоній, а також особливостей репопуляції звивистих сім'яних каналців за умов дії гострого локального опромінення тестикул щурів в дозах 1,0-7,0 Гр.

Об'єкт і методи дослідження. Експерименти проведені на статевозрілих білих лабораторних щурах віком 12-14 тижнів. Тварин утримували на штучному світловому дні (12-годинний день/12-годинна ніч) та звичайному харчовому раціоні, що складався з сухого корму та питної води в необхідній кількості. Експерименти здійснено у відповідності до конвенції Ради Європи щодо захисту хребетних тварин, яких використовують у наукових цілях.

Локальне опромінення тестикул тварин здійснювали на установці «РОКУС» (джерело гамма-квантів – ^{60}Co ; потужність поглинутої дози 106,6 сГр/хв) в дозах 1,0; 2,0; 4,0 та 7,0 Гр. Все тіло тварин, окрім тазової частини, було захищене свинцевим жилетом. Тварин умертвляли за допомогою дислокації шийних хребців після надмірного вдихання CO_2 . Тривалість пострадіаційних термінів складала 7, 21, 45 днів з моменту проведення опромінення.

Мікроскопічний аналіз особливостей структурної архітекtonіки сім'яників здійснювали з використанням морфологічних методів дослідження [15]. Для цього шматочки органів спочатку фіксували у

Таблиця 1.

Вплив локального гамма-опромінення тестикул лабораторних щурів в різних дозах на кількість стовбурових (As) та диференційованих (A) сперматогоній на VII-VIII стадії сперматогенного циклу в різні терміни пострадіаційного періоду

Доза, Гр	As — сперматогонії						A — сперматогонії					
	7 діб		21 доба		45 діб		7 діб		21 доба		45 діб	
	n	%†	n	%†	n	%†	n	%†	n	%†	n	%†
0 (контроль)	2,31±0,16	-	2,31±0,16	-	2,31±0,16	-	12,2±0,4	-	12,2±0,4	-	12,2±0,4	-
1,0	2,21±0,20	96	2,41±0,18	104	4,25±0,18*	184	3,8±0,2*	31	11,0±0,8	90	12,1±0,7	99
2,0	2,05±0,14	89	1,95±0,21	84	3,02±0,27*	130	1,4±0,2*	11	10,3±0,7*	83	11,9±0,9	98
4,0	1,25±0,17*	54	2,04±0,16	88	2,21±0,32	96	0,5±0,1*	4	6,3±0,5	52	8,5±0,6*	70
7,0	0,71±0,15*	31	1,39±0,17*	60	1,72±0,19*	74	0,1±0,1*	1	0,4±0,2	3	0,7±0,2*	6

Примітки:

1) n — кількість клітин на 100 клітин Сертолі (M±m);

2) † — % від контролю;

3) * — статистично достовірні розбіжності з контролем (p≤0,05).

суміші Боуена, а потім переносили до 70% етанолу і в ньому зберігали. Гермінативні клітини звивистих сім'яних канальців фарбували гематоксиліном і еозинном. Для оцінки репопуляційного індексу готували парафінові зрізи товщиною 4-6 мкм та їх також фарбували гематоксиліном та еозином. Кількісний аналіз гермінативних клітин та визначення стадій сперматогенного епітелію проводили за допомогою мікроскопу «NU» (Карл-Цейсс, Німеччина). Дані експериментів були статистично оброблені методами дисперсійного аналізу та непарного тесту Стьюдента з поправкою Бонфероні за використанням пакету програм STATISTIKA 6.0 (StatSoft 2001) та Microsoft Excell 2000. Розбіжності між даними експериментів вважались статистично значущими при p<0,05 [7].

Результати досліджень та їх обговорення.

На першому етапі дослідження нами було вивчено вплив гострого локального опромінення тіла лабораторних щурів на кількісні зміни стовбурових (As) і диференційованих сперматогоній (ΣA₁+A₂+A₃+A₄) генеративного епітелію звивистих канальців в залежності від експозиційної дози, котра знаходилась в інтервалі 1,0-7,0 Гр (табл. 1).

Встановлено, що локальне опромінення тестикул найбільш позначається на виживанні A-сперматогоній в перші дні пострадіаційного періоду, причому якщо для дози в 1,0 Гр виживання становило 31% контролю, то для доз 2,0; 4,0 та 7,0 Гр воно було в межах 10% контролю. Показано, крім того, що для дози у 7 Гр відновлення пулу A-сперматогоній йде дуже повільно, тому після 45-ої доби A-сперматогоній було зареєстровано в кількості, що дорівнювала лише 6% контрольної величини. Для доз 1,0; 2,0 та 4,0 Гр відновлення проходило значно швидше, що зумовило майже повне оновлення пулу A-сперматогоній через 45 діб після опромінення в дозах 1,0 та 2,0 Гр, та на 70% – при дозі в 4,0 Гр. As-сперматогонії, як виявилось, зазнали значно меншої шкоди при опроміненні, оскільки їх кількість лише при дозах 4,0 та 7,0 Гр зменшилась до 54 та 31% контролю, відповідно, а при дозах 1,0 та 2,0 Гр статистично майже не відрізнялась від контрольної величини. При всіх експозиційних дозах

відбувалось відновлення пулу As-сперматогоній протягом 21-денного терміну. Крім того, відмічено активну проліферацію As-сперматогоній при дозах 1,0 та 2,0 Гр, коли їх кількість в 1,8 та 1,3 рази, відповідно, перевищила контрольний показник.

Не зважаючи на достатнє відновлення пулу As-сперматогоній при дозі в 7,0 Гр (74% контролю за 45 діб після опромінення), кількість A-сперматогоній в цей же термін була мізерна (6% контролю), що вказує на ймовірність посилення апоптозу As-сперматогоній.

Дійсно, дослідження тотальних препаратів сім'яних канальців встановило появу гігантських стовбурових клітин, котрі могли перебувати на різних стадіях сперматогенного циклу. Такі клітини, як вказують деякі автори [12,13,18], здатні довгий час перебувати у стані спокою, а потім або входити в некроз та гинути, або відновлюватись і перетворюватись в активні A-сперматогонії. Як видно з **таблиці 2**, гігантські клітини повністю відсутні в контролі, а при дозі в 7,0 Гр їх кількість у 4,3 рази перевищувала таку ж величину для дози в 1,0 Гр.

Дослідження генеративного епітелію звивистих сім'яних канальців встановило, що дози 1,0-2,0 Гр

Таблиця 2.

Вплив локального гамма-опромінення тестикул лабораторних щурів в різних дозах на появу гігантських стовбурових клітин (Asg) на 7-му добу пострадіаційного періоду

Доза, Гр	Гігантські стовбурові клітини (Asg)	
	кількість на 100 клітин Сертолі	% від загальної кількості стовбурових клітин
0	<0,01	0
1,0	0,39±0,04*	15
2,0	0,59±0,05*	22
4,0	1,26±0,09*	50
7,0	1,30±0,20*	65

Примітка: * — статистично достовірні розбіжності з контролем (p≤0,05).

Таблиця 3.
Вплив локального опромінення тестикул лабораторних щурів гамма-радіацією на збереження генеративного епітелію в сім'яних каналцях у різні терміни пострадіаційного періоду

Доза, Гр	Процентна кількість сім'яних каналців, де відбувається сперматогенез		
	7 діб після опромінення	21 доба після опромінення	45 діб після опромінення
0 (контроль)	100	100	100
1,0	100	100	100
2,0	100	100	100
4,0	72±5*	59±3*	43±3*
7,0	37±4*	1±1*	0*

Примітка: * – статистично достовірні розбіжності з контролем ($p \leq 0,05$).

не спричиняють їх спустошення через втрату гермінативних клітин (**табл. 3**). Однак доза в 4,0 Гр локального опромінення тестикул зумовлювала появу порожніх каналців, кількість яких зростала в залежності від тривалості пострадіаційного періоду. Так, якщо за 7 діб порожніми було зареєстровано лише 8% від усіх каналців, то через 45 діб ця величина збільшилась до 87% (**табл. 2**). При дозі в 7,0 Гр, починаючи з 21-ї доби пострадіаційного періоду, спостерігалась майже повна інволюція генеративного епітелію звивистих сім'яних каналців.

В подальшому було проаналізовано здатність стовбурових клітин до репопуляції спустошених звивистих сім'яних каналців шляхом їх клоноподібного перетворення спочатку у А₁-сперматогонії, а згодом – послідовно у А₂, А₃, А₄, А_{in} та В-сперматогонії. Останні, як відомо, дають початок сперматоцитам. Визначення репопуляційного індексу сім'яних каналців показало (**табл. 4**), що при локальному опроміненні тестикул в дозі 1,0 Гр з'являється приблизно 0,07% спустошених сім'яних каналців, причому середня кількість стовбурових клітин порівняно з контролем зменшується до ~ 4,96 клітин/каналець. При збільшенні дози локального опромінення тестикул середня кількість А_s-сперматогоній поступово зменшилась спочатку в 3,5 рази при дозі в 4,0 Гр,

Таблиця 4.
Вплив різних доз локального гамма-опромінення тестикул лабораторних щурів на відновлення сперматогенезу у звивистих сім'яних каналцях та виживання стовбурових клоноутворюючих клітин на 45 добу пострадіаційного терміну

Параметр	Доза, Гр				
	0	1,0	2,0	4,0	7,0
Репопуляційний індекс	100	99,3	99,1	76,4	21,0
Середня кількість клоноутворюючих сперматогоній, що міститься на поперечному зрізі сім'яних каналців товщиною в 4 мкм	70	4,96	4,71	1,40	0,24

а потім досягла найнижчого рівня 0,24 клітин/каналець при дозі в 7,0 Гр.

Вивчення мітотичної активності А₁-сперматогоній при локальному опроміненні тестикул встановило, що на відміну від контролю, де поява клонів з 2, 4, 8 та 16 клітин характеризувалась рівномірністю за процентним розподілом в сперматогенному епітелію звивистих сім'яних каналців, при дозах 1,0-7,0 Гр спостерігалось поступове зменшення кількості 16-клітинних клонів з 3-7% при дозах 1,0-2,0 Гр до 0 при 7,0 Гр (**рис. 1**). Одночасно при дозах 4,0 та 7,0 Гр кількість клонів з 8 клітин також зменшилась до рівня 4-10%.

Варто зауважити, що у всьому діапазоні доз характерним було суттєве збільшення порівняно з контролем процентної кількості 2-клітинних клонів, причому при дозі в 7,0 Гр їх кількість була найбільшою і становила 64% від загальної кількості всіх клонів.

Одночасно при дозі в 2,0 Гр максимально зросла процентна частка 4-клітинних клонів (42%). Ці дані вказують на посилення регенерації стовбурових сперматогоній, що мала сприяти відновленню зменшеного дією радіації пулу гермінативних клітин та подальшій ефективній репопуляції сім'яних каналців. Натомість, прискорена диференціація стовбурових сперматогоній відразу після їх регенерації, навпаки, індукує передчасне входження в апоптоз дочірніх клітин, що зумовлює втрату репопуляційного потенціалу сперматогенним епітелієм. Подібне явище було описано Роулі із співавторами при дослідженні яєчок людини [17].

Аналіз динаміки регенерації А-сперматогоній показав, що в перші терміни після опромінення вони значно зменшувались в своїй кількості на 7-му добу, а згодом на 21-шу та 45-ту добу поступово відновлювали свою кількість. Такі закономірності були відмічені для всіх досліджених доз радіації (**рис. 2**).

Проведені дослідження встановили, що спустошення сперматогенного епітелію відбувалось поступово в залежності від дози опромінення, причому спочатку в перші дні пострадіаційного періоду зникали найбільш радіочутливі гермінативні клітини, а саме А-сперматогонії та прелетотенні сперматозоїди, у яких LD₅₀ становить приблизно 1,0-2,0 Гр. Відомо, що як сперматогонії, так і прелетотенні сперматозоїди розташовані перед гематотестикулярним бар'єром, тоді як інші гермінативні клітини, починаючи з лептотенних сперматозитів, перебувають за межами цього бар'єру. В результаті виживші сперматозоїди і сперматозоїди продовжують просуватися по хвилі сперматогенного епітелію і поступово звільняють простір сім'яного каналця, потрапляючи спочатку до тестикулярного сплетіння, а потім вже через еферентну протоку до епідидимісів та сім'явиносної протоки.

Така послідовність подій зумовлювала різке зменшення присутності спермійів у тестикулах на

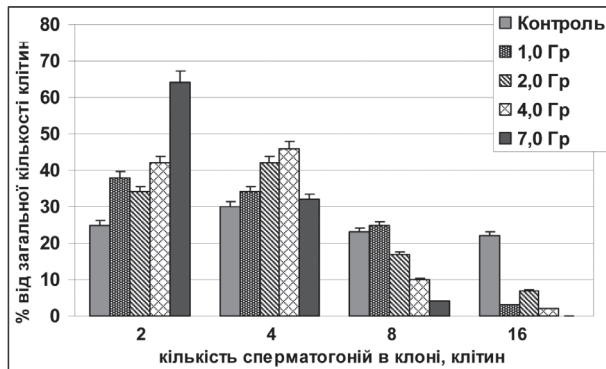


Рис. 1. Вплив локального гамма-опромінення тестикул лабораторних щурів в різних дозах на процентний розподіл А-сперматогоній по клонах з 2; 4; 8 та 16 клітин на VII-VIII стадіях сперматогенного циклу через 45 діб після опромінення.

пізніх термінах пострадіаційного періоду та суттєве зниження денного спермоутворення до мінімального рівню при дозі в 7,0 Гр. Це спричинило спочатку появу ознак глибокої олігозооспермії, котра потім переходила в азооспермію в більш пізні терміни пострадіаційного періоду.

Висновки

1. Встановлено, що локальне опромінення тестикул щурів гамма-променями в дозах 1,0-7,0 Гр спричиняє дозозалежне зменшення пулу А-сперматогоній на 7 добу пострадіаційного періоду. Згодом цей пул починає відновлюватись і на 45 добу досягає рівня контролю при дозі в 4,0 Гр, тоді як при дозах 1,0 та 2,0 Гр він перевищує контрольні величини в 1,8 та 1,3 рази, відповідно. На відміну, при дозі опромінення в 7,0 Гр відновлення А-сперматогоній було неповним.

2. Відновлення пулу А-сперматогоній протягом 45 діб пострадіаційного періоду було повним при дозах опромінення 1,0 та 2,0 Гр. В той же час, при дозі в 4,0 Гр відновлення становило 70% контрольної величини, а при 7,0 Гр – лише 6% контролю.

3. Встановлено, що локальне гамма-опромінення тестикул білих щурів спричиняє появу гігантських

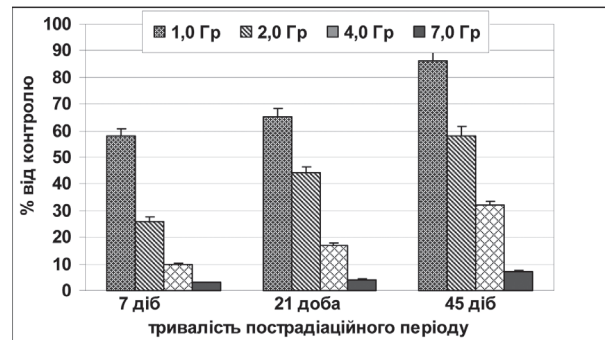


Рис. 2. Вплив локального гамма-опромінення (1,0; 2,0; 4,0 та 7,0 Гр) тестикул лабораторних щурів на процентний розподіл сперматогоній на VIII стадії циклу сперматогенного епітелію звивистих канальців в різні терміни післярадіаційного періоду.

А₁-сперматогоній та переважне утворення клонів А₁-сперматогоній в 2-4 клітини.

4. Показано, що повне спустошення звивистих сім'яних канальців відбувається при дозі опромінення в 7,0 Гр протягом 21 доби пострадіаційного періоду. При дозі радіації в 4,0 Гр заселення гермінативними клітинами спостерігалось в 43% канальців ще на 45 добу після опромінення. Доза 1,0 та 2,0 Гр спричинили лише часткове спустошення звивистих сім'яних канальців в тестикулах щурів.

5. З'ясовано, що локальне опромінення тестикул в дозах 1,0-7,0 Гр не спричиняє повної загибелі клоноутворюючих стовбурових сперматогоній, що передбачає можливість відновлення сперматогенезу та репопуляції звивистих сім'яних канальців гермінативними клітинами для всіх досліджених доз.

Перспективи подальших досліджень. В подальшому планується проаналізувати властивості сперматогенного епітелію звивистих сім'яних канальців щурів в більш віддалені терміни пострадіаційного періоду, зокрема 30 та 60 тижнів, а також встановити, наскільки відновлюється спермопродукуюча функція тестикул у вказаний період.

Література

1. Андрейченко С.В. Радиационно измененные мужские гаметы в реконструированном эукариотическом геноме: автореф. доктор. дисс. / С.В. Андрейченко. – Киев, 1992. – 36 с.
2. Гродзинський Д.М. Радиобіологія: Підруч. для студ. біол. спец. вищ. навч. закл. / Д.М. Гродзинський. – К.: Либідь, 2001. – 448 с.
3. Ярмоненко С.П. Радиобиология человека и животных. Учебное пособие / С.П. Ярмоненко, А.А. Вайнсон. – М.: Высшая школа, 2004. – 549 с.
4. Abuelhija M. Differences in radiation sensitivity of recovery of spermatogenesis between rat strains / M. Abuelhija, C.C. Weng, G. Shetty [et al.] // Toxicol. Sci. – 2012. – Vol. 126 (2). – P. 545-553.
5. Ahmadi A. Developmental capacity of damage spermatozoa / A. Ahmadi, S-Ch. Ng // Hum. Reprod. – 1999. – Vol. 14 (9). – P. 2279-2285.
6. Ahmadi A. Fertilization and development of mouse oocytes injected with membrane-damaged spermatozoa / A. Ahmadi, S-Ch. Ng // Hum. Reprod. – 1997. – Vol. 12 (12). – P. 2797-2801.
7. Bland M. An introduction to medical statistics / M. Bland. – 3rd ed. – Oxford: Oxford Univ. Press, 2007. – 405 p.
8. Bushong S.C. Radiation science for technologists: physics, biology and protection / S.C. Bushong. – 8th ed. – Elsevier: Elsevier Mosby, 2004. – 638 p.
9. Colpi G.M. Testicular function following chemo-radiotherapy / G.M. Colpi, G.F. Contalbi, F. Nerva [et al.] // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. – 2004. – Vol. 113. – P. 2-6.
10. Erikson B.H. Comparison of stem-spermatogonial renewal and mitotic activity in the γ -irradiated mouse and rat / B.H. Erikson, G.G. Hall // Mut. Res. – 1983. – Vol. 108. – P. 317-335.
11. Erikson B.H. Effect of ^{60}Co gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the postpubertal rat / B.H. Erikson // Radiat. Res. – 1976. – Vol. 68. – P. 433-448.

12. Erikson B.H. Effect of continuous gamma-radiation on the stem and differentiating spermatogonia of the adult rat / B.H. Erikson // *Mut. Res.* – 1978. – Vol. 52. – P. 117-128.
13. Henriksen K. Stage-specific apoptosis in the rat seminiferous epithelium: quantification of irradiation effects / K. Henriksen, J. Kulmala, J. Toppari [et al.] // *J. Androl.* – 1996. – Vol. 17 (4). – P. 394-402.
14. Little M.D. Endocrine and reproductive dysfunction following fractionated total body irradiation in adults / M.D. Little, S.M. Shalet, G.R. Morgenstern, D.P. Deakin // *Quart. J. Med. New Ser.* – 1991. – Vol. 78 (287). – P. 265-274.
15. Meistrich M.L. Spermatogonial stem cells: assessing their survival and ability to produce differentiated cells / M.L. Meistrich, M.E.A.B. van Beek // *Methods Toxicol.* – 1993. – Vol. 3A. – P. 106-123.
16. Pandey K.K. Genetic transformation in chicken by the use of irradiated male gametes / K.K. Pandey, M.R. Patchell // *Mol. Gen. Genet.* – 1982. – Vol. 186 (3). – P. 295-300.
17. Rowley M.J. Effect of graded doses of ionizing radiation on the human testis / M.J. Rowley, D.R. Leach, G.A. Warner [et al.] // *Radiat Res.* – 1974. – Vol. 59. – P. 665-678.
18. West A. X-irradiation-induced changes in the progression of type B spermatogonia and preleptotene spermatocytes / A. West, J. Landetie // *Mol. Reprod. Dev.* – 2001. – Vol. 58. – P. 78-87.

УДК 577.1:611.013.11/57.042

ОСОБЛИВОСТІ ВПЛИВУ ІОНІЗУЮЧОЇ РАДІАЦІЇ НА ВИЖИВАННЯ ТА РОЗВИТОК СПЕРМАТОГОНІЙ ПРИ ЛОКАЛЬНОМУ ОПРОМІНЕННІ ТСТИКУЛ ЩУРІВ

Саковська Л. В., Горбань Л. В., Мотрина О. А., Грубська Л. В., Клепко А. В.

Резюме. Вивчали вплив локального опромінення тестикул щурів гамма-променями на виживання та розвиток стовбурових (As) та А-сперматогоній, а також динаміку репопуляції звивистих сім'яних канальців в післярадіаційний період тривалістю в 45 діб. Встановлено, що кількість As-сперматогоній в перший тиждень після опромінення в діапазоні доз 1,0-7,0 Гр зменшилась до мінімального значення дозозалежним чином, а згодом почала зростати, причому при дозах 1,0 та 2,0 Гр на 45 добу спостерігалось перевищення контрольної величини в 1,8 та 1,3 рази, відповідно. При опроміненні в дозі 4,0 Гр відмічено повне оновлення пулу As-сперматогоній, тоді як при 7,0 Гр відновлення становили лише 70%.

Крім того, показано, що кількість А-сперматогоній зі збільшенням дози опромінення також зменшилась і досягла мінімального значення 6% від контролю на 45 добу при дозі радіації в 7,0 Гр. За таких умов відмічено появу гігантських As-сперматогоній та переважне утворення клонів А₁-сперматогоній з 2, 4 клітин. Дози іонізуючої радіації в 1,0 та 2,0 Гр не спричинили будь-якого суттєвого спустошення звивистих сім'яних канальців, тоді як доза в 7,0 Гр зумовила повне зникнення з них гермінативних клітин. Виявлено здатність As-сперматогоній, що вижили після опромінення тестикул в дозах 1,0-7,0 Гр, до регенерації, клоноутворення та диференціації.

Ключові слова: сперматогонії, локальне опромінення, щури, сперматогенез, регенерація, репопуляція.

УДК 577.1:611.013.11/57.042

ОСОБЕННОСТИ ВЛИЯНИЯ ИОНИЗИРУЮЩЕЙ РАДИАЦИИ НА ВЫЖИВАНИЕ И РАЗВИТИЕ СПЕРМАТОГОНИЙ ПРИ ЛОКАЛЬНОМ ОБЛУЧЕНИИ ТСТИКУЛ КРЫС

Саковская Л. В., Горбань Л. В., Мотрина О. А., Грубская Л. В., Клепко А. В.

Резюме. Изучали влияние локального облучения тестикул крыс гамма-лучами на выживание и развитие стволовых (As) и А-сперматогоний, а также динамику репопуляции извитых семенных канальцев в пострadiaционный период продолжительностью в 45 суток. Установлено, что количество As-сперматогоний в первую неделю после облучения в диапазоне доз 1,0-7,0 Гр уменьшалось до минимального значения дозозависимым образом, а потом начинало увеличиваться, причем при дозах 1,0 и 2,0 Гр в конце пострadiaционного периода наблюдалось превышение контрольного уровня в 1,8 и 1,3 раза, соответственно. При дозе радиации в 4,0 Гр обновление А-сперматогоний происходило в полной мере, а при дозе 7,0 Гр составляло лишь 70% контроля.

Кроме того, показано, что количество А-сперматогоний с увеличением дозы облучения также уменьшалось и достигало минимального значения в 6% контрольной величины при дозе в 7,0 Гр. В таких условиях отмечено появление гигантских As-сперматогоний и преимущественное образование клонов А₁-сперматогоний, состоящих из 2, 4 клеток. Дозы облучения в 1,0 и 2,0 Гр не вызывали какого-либо опустошения извитых семенных канальцев тестикул крыс, тогда как доза в 7,0 Гр обуславливала полное исчезновение из них герминативных клеток. Обнаружена способность As-сперматогоний, выживших после облучения тестикул в дозах 1,0-7,0 Гр, к регенерации, клонообразованию и дифференциации.

Ключевые слова: сперматогонии, локальное облучение, крысы, сперматогенез, регенерация, репопуляция.

UDC 577.1:611.013.11/57.042

PECULIARITIES OF IONIZING RADIATION INFLUENCE ON THE SPERMATOGONIA VIABILITY AND DEVELOPMENT AFTER LOCAL TESTICULAR IRRADIATION OF RATS

Sakovska L. V., Gorban L. V., Motrina O. A., Grubaska L. V., Klepko A. V.

Abstract. Laboratory white rats in the age of 10 months were irradiated by gamma rays of ⁶⁰Co in the dose range 1,0-7,0 Gy with a dose rate 1.0 Gy/min in the zone including testicles and lower quarter of the body, the other body parts being shielded by protective cloth containing lead plates of 3 mm thickness. The absorbed dose

was measured by ferum sulfate method using rat phantom. In the pre-radiation and post-radiation periods animals were held in cages under mixed illumination of natural and artificial light (12 hour day/12 hour night) on dry food and water ad libitum.

The quantity of germ cells along with Sertoli cells were calculated in 4 μm testicular cross-sections stained with hematoxylin and eosin. Primarily, the removed testes were fixed in Bouen's solution, dehydrated in alcohol series and then embedded in paraffin.

Gamma-irradiation did not cause any shifts of Sertoli cell amount for 1,0 Gy. At 2,0 Gy small abatement of Sertoli cell quantity below the control level was seen just after 7 weeks post-irradiation, while in the other time intervals their mean values showed complete recovery. However, dose lifting sequentially to 4,0 Gy and 7,0 Gy resulted in degeneration of approximately 20% of Sertoli cells on the 7th week post-irradiation with no recovery in the later term, i. e. 15 and 30 weeks.

The data received corroborate high radioresistance of Sertoli cells, whose LD_{50} had been determined to be 15-20 Gy. Spermatogonia, especially differentiating ones such as A_1 , A_2 , A_3 , A_4 , A_{in} , B, along with preleptotene spermatocytes are considered to be the most radiosensitive germ cells. In view of this, their amount significantly fell down already on the 7th day post-irradiation and then partially restored up to control value at the dose of 1 Gy. At 4 Gy recovery of spermatogonia did not exceed 30% of control whereas the dose 7 Gy caused their more pronounced disappearance from seminiferous epithelium in the post-irradiation period. The latter two doses proved to be detrimental also for spermatocytes and spermatids.

Incidentally seminiferous tubules showed dose dependant depletion of germ cell stocks inside them with simultaneous preservation of somatic Sertoli cells in sufficient abundance that was favorable for further regeneration of stem spermatogonia (As) and subsequent repopulation of tubules.

Upon local irradiation of rat testicles by gamma-rays in doses 4,0 and 7,0 Gy the emergence of giant As-spermatogonia along with 2 and 4 cell clones of A-spermatogonia was observed. Apart from this, the survived As-spermatogonia were shown to be prone to regeneration and further repopulation of seminiferous tubules by germ cells.

Keywords: spermatogonia, local irradiation, rats, spermatogenesis, regeneration, repopulation.

Рецензент — проф. Почерняєва В. Ф.

Стаття надійшла 03.12.2016 року