

Н.О. Карпенко, Н.Н. Чуб
Г.А. Бризгалова
М.Ю. Алесіна, В.В. Ляб'юк

Чернобильський науково-технічний центр міжнародних досліджень, м. Чернобиль

Вплив тривалого низькодозного опромінювання статевих клітин самців у постмейотичній фазі гаметогенезу на сперматогенез у їх потомства

Influence of continuous low-dose irradiation of male sex cells in postmeiotic phase of gametogenesis on spermatogenesis in their offsprings

Цель работы: Изучить сперматологические показатели у самцов, подвергшихся действию хронического комбинированного (внутреннего и внешнего) облучения в малых дозах в постмейотическую фазу гаметогенеза, и их потомства, а также сопоставить их чувствительность к облучению слабой мощности.

Материалы и методы: От облученных в течение 1,5 мес. самцов и интактных самок крыс было получено потомство, а сами самцы забиты для изучения сперматологических показателей и определения поглощенных доз от комбинированного облучения. Различная интенсивность внутреннего облучения моделировалась путем использования трех разведений радиоактивной воды из бассейна-барботера 4-го блока ЧАЭС и радиоактивного корма. У потомства облученных животных, которое находилось в условиях нормального радиационного фона или с 4 по 9-й мес. получало минимальную радиационную нагрузку, были изучены эти же показатели.

Результаты: Установлено, что у самцов крыс, которые получали загрязненные радионуклидами корм и воду в течение 1,5 мес., концентрация и процентное содержание подвижных и морфологически нормальных сперматозоидов соответствовали контрольным показателям. При спаривании их с интактными самками получено нормальное количество жизнеспособных детенышей. У взрослого потомства, находящегося в условиях нормального радиационного фона, спермограммы отличались увеличенным количеством морфологически аномальных клеток. При использовании минимальной дополнительной радиационной нагрузки у потомства родителей, облученных с поглощенной дозой от 0,24 до 1,4 сГр, отмечалось снижение концентрации сперматозоидов (в среднем от 19 до 37 %).

Выводы: Хроническое комбинированное (внутреннее и внешнее) облучение в малых дозах (поглощенная доза в диапазоне 0,15—1,4 сГр) не влияет на сперматологические показатели самцов крыс Вистар и не имеет генотоксического действия. Полученное от них потомство имеет признаки нарушения морфогенеза гамет (тератоспермия) и большую чувствительность к слабому облучению (с развитием олигозооспермии).

Ключевые слова: хроническое комбинированное облучение, малые дозы, крысы, сперматозоиды.

Objective: To study spermatologic parameters both in males which were exposed to chronic combined (internal and external) irradiation in low doses in postmeiotic phase of gametogenesis, and in their offsprings, as well as to estimate their sensitivity to low-dosage irradiation.

Material and Methods: The offsprings were received from Wistar rat males irradiated for 1.5 month and intact females. The males of parental generation were decapitated to study spermatologic parameters and to determine absorbed doses from combined irradiation. Various intensity of internal irradiation was simulated by the use of three dilutes of radioactive water from pool-bubbler of the Chernobyl Atomic Power Plant (4th block) and radioactive forage. The same parameters were investigated in offsprings (from irradiated animals) which were kept at normal radiation background or received minimum radiation load from the 4th till the 9th months of the life.

Results: It was established that in the male rats, which received contaminated forage and water for 1.5 months the concentration and percentage of mobile and the morphology normal spermatozoa were similar to those in the control. When mated with intact females, a normal amount of viable pups was obtained. In adult offsprings at normal radiation background the spermograms differed by increased amount of abnormal cells. The offsprings of the parents exposed to absorbed dose of 0.24-1.4 cGy had decreased spermatozoa concentration at minimum additional radiation load (mean 19-37%).

Conclusion: Chronic combined (internal and external) low doses irradiation (absorbed dose 0.15-1.4 cGy) does not influence spermatologic parameters in Wistar male rats and does not have genotoxic action. The offsprings, received from them, have the features of disturbance of gamete morphogenesis (teratospermia) and increased sensitivity to weak irradiation (with development of oligozoospermia).

Key words: chronic combined irradiation, low doses, rat, spermatozoa.

Відомо, що генеративні структури сім'яників найбільш чутливі до різних пошкоджуючих факторів навколишнього середовища, в тому числі радіації. В залежності від потужності, виду та режиму опромінювання сперматогенез може припинитися (що призводить до тимчасової або постійної стерильності) або гальмуватися з утворенням меншої кількості повноцінних сперматозоїдів [1, 2]. Радіаційні ушко-

дження генетичних структур гамет можуть зумовлювати модифікаційні або мутаційні зміни у наступних поколіннях, внаслідок чого можлива загибель потомства опроміненних у різні періоди онтогенезу батьків [3—5], його схильність до появи уроджених вад розвитку [6], порушень репродуктивної функції [7, 8], деяких соматичних захворювань [1, 2]. Однак більшість таких даних одержані при використанні гамма-

випромінення у достатньо великих дозах (понад 1,0 Гр) [8, 9], і небезпека хронічного, переважно внутрішнього, опромінення у малих дозах інколи оцінюється шляхом лінійної екстраполяції радіаційних ефектів «великих» доз [10]. У сучасних умовах дуже важливим є питання гігієнічного нормування безпечних рівнів опромінення в умовах тривалого надходження радіонуклідів з раціоном. Саме тому метою даного дослідження було вивчення сперматологічних показників у щурів, народжених від самців, підданих дії хронічного комбінованого випромінення у малих дозах протягом 1,5 міс., і порівняння чутливості батьків та їх потомків до випромінення малої потужності.

Методика дослідження

Самці щурів лінії Вістар батьківського покоління (P_0) віком 3,5–4 міс. та масою 160–180 г були розподілені по 4 групах: P_0 —контроль, P_0 — D_1 , P_0 — D_2 та P_0 — D_3 , по 10 тварин у кожній. Щурів, за винятком контрольної групи, протягом 1,5 міс. піддавали дії хронічного зовнішнього та внутрішнього випромінення різної потужності. Після парування з неопроміненими інтактними самками самців покоління P_0 було забито для вивчення показників спермограм та спектрорадіометрії. Сперматологічні показники також вивчали у 76 самців першого покоління (F1): групи F1 (P_0 —контроль), F1(P_0 — D_1), F1(P_0 — D_2) та F1(P_0 — D_3), які або перебували в умовах нормального радіаційного фону, або додатково опромінювалися з 4-го по 9-й місяці життя.

Внутрішнє опромінювання проводили, використовуючи замість питної радіоактивну воду з басейну-барботера 4-го блоку ЧАЕС (питома сумарна α -активність за сумою ізотопів цезію для групи P_0 — D_1 — $(1,51 \pm 0,2) \cdot 10^5$ Бк/кг, P_0 — D_2 — $(1,6 \pm 0,35) \cdot 10^4$, P_0 — D_3 і всіх груп опромінених потомків — $(2,3 \pm 0,2) \cdot 10^3$ Бк/кг. Гамма-активність корму з продуктів, одержаних у зоні відчуження, за ^{137}Cs становила $(2,8 \pm 0,2) \cdot 10^3$ Бк/кг, за $^{90}\text{Sr} + ^{90}\text{Y}$ — $(0,16 \pm 0,03) \cdot 10^3$ Бк/кг.

Неопромінені тварини утримувалися у «чистому» віварії (α -фон не вище 18 мкР/год) і отримували повноцінний гранульований корм та чисту питну воду.

Парування самців проводили протягом 8 діб, вміщуючи їх у клітки з інтактними самками у співвідношенні 1 : 3–4.

Життєздатність тварин покоління F1 оцінювали за кількістю живих щуренят у гнізді на 30-й день життя [10].

Підготовку та оцінку препаратів сперматозоїдів для світлової мікроскопії проводили згідно з [10].

Вміст ізотопів цезію оцінювали спектрорадіометрично у м'язах та кістках тварин P_0 та половини тварин F1 з використанням напівпровідникового детектора ДГДК-140В з лінійкою фірми "NOKIA" та аналізатора "AFORA". Стронцій у кістках визначали радіохімічним методом після попереднього концентрування (озолення).

Сумарні поглинені дози (СПД) розраховували сумарною складових зовнішнього та внутрішнього опромінення.

Оцінку поглинених доз (ПД) від зовнішнього та взаємного опромінювання (α -фон віварію та взаємоопромінювання щурів) проводили, користуючись величина-

ми потужності дози в центрі кліток щурів на різні терміни експерименту за допомогою радіометра-дозиметра МКС-01. В середньому за весь термін опромінювання потужність ПД у клітках становила для групи P_0 — D_1 $0,60 \pm 0,10$ мкГр/год, для P_0 — D_2 — $0,35 \pm 0,07$ мкГр/год, P_0 — D_3 — $0,25 \pm 0,05$ мкГр/год.

Розрахунок поглиненої дози від інкорпорованих радіонуклідів (внутрішнє опромінення) проводили, спираючись на динаміку їх накопичення в органах та тканинах. Для оцінки накопичення ^{137}Cs використовували експоненційні моделі, а для ^{90}Sr — показникові, порівнюючи при цьому розрахункові модельні значення з реальним вмістом цих радіонуклідів в органах та тканинах на час забивання.

Математичну обробку результатів проводили стандартними методами варіаційної статистики [11]. При обробці спермограм використовували об'єднані дані лівого та правого епідидимусів. Вірогідність розбіжностей оцінювали, користуючись t-критерієм Стьюдента. Розрахунки вели за допомогою пакета програм Excel 7.0.

Результати та їх обговорення

Наші дослідження показали, що у тварин, які протягом 1,5 міс. отримували радіоактивні воду та корм, сумарні поглинені дози на все тіло були у межах $0,15$ — $1,41$ сГр (табл. 1). За цей час у тварин покоління P_0 зрілості досягали сперматозоїди, які на початку опромінювання були на стадії сперматоцитів [12].

Як свідчать дослідження спермограм, одержані ПД не призводили до істотних змін кількісних (концентрація) і якісних характеристик статевих клітин (табл. 2), що дозволило отримати від опромінених самців та «чистих» самок звичайну кількість щуренят: в групі F1(P_0 —контроль) — $8,6 \pm 0,4$; в групі F1(P_0 — D_1) — $8,1 \pm 0,5$; F1(P_0 — D_2) — $10,4 \pm 0,4$ та F1(P_0 — D_3) — $9,1 \pm 0,5$ тварини.

Таблиця 1 — Сумарні поглинені дози у самців-плідників (P_0) під час парування та їх потомків (F1) ($n = 10$, $M \pm m$)
Total absorbed doses in male rats (P_0) at mating and in their offsprings (F1) ($n=10$, $M \pm m$)

Група тварин	Сумарна поглинена доза на все тіло (сГр)
P_0 — D_1	$1,41 \pm 0,40$
P_0 — D_2	$0,24 \pm 0,03$
P_0 — D_3	$0,15 \pm 0,05$
F1(P_0 —контроль)	$0,20 \pm 0,10$
F1(P_0 — D_1)	$0,21 \pm 0,03$
F1(P_0 — D_2)	$0,23 \pm 0,03$
F1(P_0 — D_3)	$0,21 \pm 0,04$

Таблиця 2 — Спермограма щурів батьківського покоління, яких опромінювали протягом 1,5 міс. ($n=10$, $M \pm m$)
Spermatogram of parent rats irradiated for 1.5 months ($n=10$, $M \pm m$)

Група	Концентрація (млн/мл)	Рухливість (%)	Патологічні форми (%)
P ₀ —контроль	17,4±1,8	45,4±7,2	31,5±2,4
P ₀ —D ₁	20,4±3,0	38,9±9,1	36,6±1,4
P ₀ —D ₂	16,8±2,4	42,2±6,1	30,9±4,5
P ₀ —D ₃	19,2±2,4	40,3±3,2	33,6±7,0

Вважається, що виживання потомства у перший місяць життя є важливим інтегральним показником, який підсумовує дію вірогідних негативних наслідків радіації на статеві клітини самців [9, 13]. У нашому випадку життєздатність отриманого потомства була не меншою, ніж у контрольних тварин, і на 30-й день життя в гнізді живих щуренят було: у групі F1(P₀—контроль) — 7,2±0,3 на одну самку, яка лактує: в групі F1(P₀—D₁) — 6,8±0,5, F1(P₀—D₂) та F1(P₀—D₃) по 9,0±1,0 та 6,2±0,9 ($p > 0,05$). Це свідчить про те, що в умовах, коли значної дії інкорпорованих радіонуклідів зазнають гамети, які вже пройшли мейотичний поділ, порушення сперматогенної функції сім'яників не спостерігається, а народження життєздатного потомства вказує на відсутність генотоксичного впливу іонізуювального випромінювання використаної потужності.

Таблиця 3 — Параметри спермограми щурів покоління F1 (n , $M \pm m$)
Spermatogram of F1rats (n , $M \pm m$)

Група	Концентрація (млн/мл)	Рухливість (%)	Патологічні форми (%)
F1(P ₀ —контроль)	14	14	10
	22,3±0,9	56,2±5,0	21,1±1,8
F1(P ₀ —D ₁)	9	10	12
	24,3±3,4	48,3±2,6	31,1±4,4*
F1(P ₀ —D ₂)	12	12	10
	21,1±1,7	40,3±3,7*	31,2±3,2*
F1(P ₀ —D ₃)	14	12	14
	20,0±3,3	49,1±3,5	26,5±1,2*

Примітка. * — вірогідні розбіжності з контрольною групою.

В отриманого потомства концентрація сперматозоїдів не змінилася, але відсоток рухливих клітин дещо зменшився (див. табл. 3). При цитологічній оцінці сперматозоїдів усіх груп знайдено вірогідне збільшення кількості патологічних форм, серед яких відсоток клітин із множинною патологією був вищим у групах F1(P₀—D₂) та F1(P₀—D₃), а з патологією голови — в групі F1(P₀—D₁). Таким чином, у самців F1 від опроміненних у малих дозах батьків сперматологічні показники дещо гірші, ніж у контрольних тварин, що вказує на уроджені порушення регуляції сперматогенезу.

Іонізувальне випромінювання низької потужності може служити своєрідним навантажувальним тестом, котрий дає змогу виявити резервні функціональні можливості потомства при дії чинника, який впливав на їх батьків. Як видно з табл. 2 та 4, застосований мінімальний рівень радіаційного навантаження не справляв спермотоксичної дії у щурів, батьки яких не зазнавали дії радіації — група F1(P₀—контроль). Реакція на додаткове радіаційне навантаження була відсутня і у тварин групи F1(P₀—D₃), батьки яких мали найменшу ПД (0,15 сГр). Але у потомків щурів, які зазнали більше радіаційне навантаження (ПД 1,4 та 0,24 сГр), концентрація сперматозоїдів була вірогідно меншою, ніж у контрольних тварин та їх «чистих» сібсів: у групі F1(P₀—D₁) у середньому на 37, а в групі F1(P₀—D₂) — на 17%.

Таблиця 4 — Параметри спермограми щурів покоління F1 після додаткового опромінення (n , $M \pm m$)
Spermatogram of F1 rats after additional irradiation for 1.5 months (n , $M \pm m$)

Група	Концентрація (млн/мл)	Рухливість (%)	Патологічні форми (%)
F1(P ₀ —контроль)	16	14	14
	20,1 ± 0,4	49,2 ± 2,6	22,1±2,4
F1(P ₀ —D ₁) + опромінення	12	12	10
	14,8 ± 0,6*,**	47,4 ± 3,4	21,5±1,3**
F1(P ₀ —D ₂) + опромінення	14	12	12
	16,8 ± 1,4*,**	50,9 ± 4,2	21,6±0,6**
F1(P ₀ —D ₃) + опромінення	14	14	10
	19,5 ± 3,0	45,7 ± 7,0	21,8±2,1

Примітки: * — вірогідні розбіжності з контролем; ** — з «чистими» сібсами.

Рухливість та морфологічні характеристики гамет при цьому не відрізнялися від контролю. Необхідно відзначити, що в опромінених сібсів груп F1(P₀—D₁) та F1(P₀—D₂) паралельно зі зниженням концентрації сперматозоїдів спостерігалось зниження відносної кількості аномальних гамет. Можливо, у нашому випадку збіднення морфологічної гетерогенності популяції сперматозоїдів є наслідком появи гамет зі значними хромосомними порушеннями в умовах радіаційного опромінення, які елімінуються у процесі сперматогенезу.

Вважають, що морфологічно аномальні сперматозоїди мають меншу здатність до пенетрації ооцитів [14]. Хоч імовірність успішного запліднення більшою мірою корелює з концентрацією статевих клітин у спермі, відносно збільшення морфологічно повноцінних форм сперматозоїдів (тобто добір повноцінних сперматозоїдів в умовах дії іонізувального випромінювання в дуже малих дозах) може забезпечувати достатню фертильність тварин F1, але це припущення потребує подальшої перевірки.

З огляду на те, що у поколінні P₀ радіаційному впливу був підданий тільки самець, а далі вагітні самки та тварини F1 перебували в умовах нормального радіаційного фону, знайдені відмінності у потомків є наслідками змін переважно в генетичному апараті сперматозоїдів, що призводить до відхилень у регуляції морфогенезу гамет у потомства першого покоління, можливо, внаслідок порушення фенотипової експресії генетичної інформації [15].

Висновки

1. Хронічне комбіноване (зовнішнє та внутрішнє) опромінення з ПД у межах 0,15—1,4 сГр не позначається на спермограмах самців щурів батьківського покоління і не має генотоксичної дії.

2. Потомство F1 опромінених батьків має ознаки уроджених порушень сперматогенезу (тератоспермія).

3. Щури F1, батьки яких одержали ПД 1,4 та 0,24 сГр, чутливіші до дії іонізувального випромінювання і на додаткове радіаційне навантаження реагують

розвитком олігозооспермії з відносним збільшенням морфологічно повноцінних гамет.

4. Застосування іонізувального випромінювання низької потужності може служити чутливим навантажувальним тестом для оцінки реакції потомства на чинник, який впливав на їх батьків.

Література

1. Шевченко В.А., Померанцева М.Д. Генетические последствия действия ионизирующих излучений. — М.: Наука, 1985. — 279 с.
2. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия воздействия ионизирующих излучений. — М.: Медицина, 1991. — 464 с.
3. Столина М.Р., Соломко А.П., Малюта С.С. и др. // «Чернобыль—94»: Сб. докл. IV междунар. науч.-техн. конф. — Чернобыль, 1996. — Т.2. — С. 322—327.
4. Индик В.М., Серкіз Я.І., Данко І.М., Алістратов О.В. та ін. Тез. докл. междунар. науч.-техн. конф. «Чернобыль-96»: — Чернобыль, 1996. — С. 451.
5. Шашкаров В.П., Конюхов Г.В., Низамов Р.Н. и др.: Тез. докл. III съезда по радиац. исследованиям: — Пуццино, 1997. — Т.1. — С. 421—422.
6. Сірацький Й.З., Рясенко С.М., Масицька О.О., Рясенко В.І. Вплив зовнішнього та внутрішнього опромінення на репродуктивну та травну систему норки. — К.: ТОВ «Міжнародна фінансова агенція», 1998. — 149 с.
7. Лягинская А.М., Карелина Н.М., Овдиенко Н.И.: Тез. докл. конф. СНГ «Актуальные проблемы влияния ионизирующих излучений на репродуктивную функцию». — Обнинск: Мед. радиол. науч. центр РАМН, 1992. — С.42—44.
8. Нефедов И.Ю., Палыга Г.Ф., Нефедова И.Ю. // Радиационная биол. Радиоэкол. — 1995. — Т. 35, вып. 3. — С. 370—374.
9. Лягинская А.М., Василенко И.Я., Осипов В.А. и др.: Тез. докл. конф. СНГ «Актуальные проблемы влияния ионизирующих излучений на репродуктивную функцию». — Обнинск: Мед. радиол. науч. центр РАМН, 1992. — С.40—42.
10. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию. — М.: Фармакол. комитет МЗ СССР, 1986. — 27 с.
11. Каминский Л.С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных. — 2-е изд. — Л.: Медицина, 1964. — 251 с.
12. Разен-Рунге Э. Сперматогенез у животных. — М.: Мир, 1980. — 255 с.
13. Воробьева О.А., Леонтьева О.А., Корсак В.С. // Цитол. — 1996. — Т. 38, № 12. — С. 1248—1252.
14. Нефедов И.Ю., Палыга Г.Ф. // Радиационная биол. Радиоэкол. — 1995. — Т. 35, вып. 3. — С. 375—380.
15. Беляев Д.К. История и теория эволюционного учения. Эволюционные взгляды Шмальгаузена (к 90-летию со дня рождения). — Л., 1984. — С. 76—84.

Дата надходження: 14.03.2000.

Адреса для листування:
Карпенко Ніна Олексіївна,
Чернобильський НТЦ міжнародних досліджень,
вул. Шкільна, 6, Київська обл., Чернобиль, 255620, Україна