

Н.О. Карпенко, Н.Н. Чуб  
Г.А. Бризгалова, М.Ю. Алесіна

Чорнобильський НТЦ  
міжнародних досліджень,  
м. Чорнобиль

Інститут проблем кріобіології  
та кріомедицини НАНУ,  
м. Харків

Інститут проблем  
ендокринної патології  
ім. акад. В.Я. Данилевського  
АМН України,  
м. Харків

## Сперматологічні показники у щурів після низькодозового опромінювання статевих клітин самців-батьків протягом двох циклів гаметогенезу

### Sperm parameters in rats after low-dose irradiation of sex cells in male parents during two cycles of gametogenesis

**Цель работы:** Изучить действие низкодозового комбинированного (внутреннего и внешнего) облучения самцов крыс в течение 2 циклов гаметогенеза на сперматологические показатели животных родительского и первого поколений и сопоставить их чувствительность к облучению слабой мощности.

**Материалы и методы:** Самцов крыс линии Вистар подвергли комбинированному облучению разной мощности (радиоактивная вода из бассейна-барботера 4-го блока ЧАЭС 3 уровня загрязнения и радиоактивный корм) в течение 4 мес. и спаривали их с интактными самками. Затем у животных оценивали их эпидидимальные сперматозоиды и проводили спектрометрию мышц и костей для расчета поглощенных доз (ПД). Оценивали жизнеспособность потомства в первый месяц жизни и сперматологические показатели в 9-месячном возрасте. Часть животных 1-го поколения подвергли минимальной радиационной нагрузке с 4-го по 9-й мес. жизни, после чего проводили спектрометрию и исследовали спермограммы.

**Результаты:** Установлено, что облучение в течение 4 мес. с ПД 0,4–3,6 сГр сопровождается увеличением концентрации сперматозоидов, среди которых увеличивается процентное содержание аномальных клеток. От интактных самок, спаренных с облученными самцами, было получено нормальное количество детенышей. Жизнеспособность потомства самцов, облученных с ПД 0,7 и 3,6 сГр, была достоверно ниже контрольных показателей, а в половозрелом возрасте у них снижалась концентрация эпидидимальных сперматозоидов. При дополнительной минимальной радиационной нагрузке длительностью 5 мес. (ПД 0,4 сГр) у потомства самцов, получивших наибольшую дозовую нагрузку (ПД 3,6 сГр), концентрация сперматозоидов еще больше уменьшалась (в среднем на 17%).

**Выводы:** Хроническое комбинированное (внутреннее и внешнее) облучение в малых дозах (поглощенная доза в диапазоне 0,24–3,6 сГр) на протяжении 2 циклов гаметогенеза приводит к неполноценному усилению сперматогенеза у самцов крыс и оказывает генотоксический эффект. Для потомства (при дозе облучения самцов 0,7 и 3,6 сГр) характерна сниженная жизнеспособность и олигозооспермия в зрелом возрасте. Потомство облученных самцов (ПД 3,6 сГр) характеризуется повышенной чувствительностью, при которой усиливается степень имеющейся олигозооспермии. Данные согласуются с представлениями о большей генетической радиорезистентности премейотических клеток при гаметогенезе.

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

**Objective:** To investigate the influence of combined (internal and external) low-dose irradiation in male rats (during two gametogenesis cycles) on sperm parameters in parents and offsprings (F1) and to compare the sensitivity to low-dose irradiation in the above.

**Material and Methods:** Wistar male rats were exposed to combined irradiation of different dose rate (radioactive water with three levels of activity from the pool-bubbler of the Chernobyl Atomic Power Plant (4th block) and radioactive forage) during 4 months and were mated with intact females. Then epididymis spermatozoa were evaluated and spectroradiometric measurement of the muscles and bones was performed to calculate absorbed doses (AD). The offspring viability at 1 month of age and sperm parameters at 9 month age were evaluated. Part of the offspring were exposed to a minimum radioactive load from 4 till 9 months of life, and then spectroradiometric measurements and sperm investigation were performed.

**Results:** It was revealed that irradiation during 4 months with AD 0.4–3.6 cGy was accompanied by increase in spermatozoon concentration with a high percentage of abnormal cells. After mating of irradiated males with intact females a normal quantity of pups was received. Viability of the offsprings from the fathers with AD 0.7 and 3.6 cGy was significantly lower than in the controls and concentration of epididymis spermatozoa was reduced in sex-mature age. The offsprings under additional minimal radioactive load during 5 months (AD 0.4 cGy) had more significant reduction in concentration (on an average by 17%).

**Conclusion:** Chronic combined (internal and external) irradiation in low doses (absorbed doses 0.4–3.6 cGy) during two cycles of gametogenesis results in defective stimulation of spermatogenesis in male rats and provokes genotoxic action. The offspring from fathers with 0.7 and 3.6 cGy irradiation have decreased viability and oligozoospermia in mature age. The offsprings from the father with 3.6 cGy have increased sensitivity to weak irradiation and react by increased oligozoospermia. The data are accord with the idea about more pronounced genetic radioresistance of premeiosis cells during gametogenesis.

**Key words:** chronic combined irradiation, low doses, rats, spermatozoa, genetic sensitivity.

Небезпека опромінювання самців, крім порушень сперматогенезу та атрофії гонад, криється в його вірогідних генетичних наслідках. Значною мірою вони залежать від ступеня та характеру радіаційних ушкоджень гамет батьків, відносна генетична радіочутливість яких найбільша на постмейотичних стадіях сперматогенезу. Віро-

гідність передачі потомству генетичних порушень по лінії чоловічих гамет майже не знижується зі збільшенням періоду після опромінювання або при пролонгації терміну останнього, що пояснюють більшою радіочутливістю нових клітин, які утворюються з резервної радіорезистентної популяції стовбурових сперматогоніїв [1, 2].

У разі хронічного внутрішнього опромінення мають місце не тільки рівномірне опромінювання, але й вибіркоче та взаємоопромінювання окремих органів і систем, коли гонади отримують сумарні поглинуті дози у 2–3 рази вищі, ніж усе тіло [3]. При рівних його потужностях постійне внутрішнє опромінювання є найбільш несприятливим за біологічною дією, зокрема у зв'язку із внеском опосередкованих ефектів опромінення всього тіла, який може сягати 50% від сумарного ефекту [4].

Роботи, виконані в лабораторії або в натурних умовах Чорнобильського полігону, підтверджують положення про важчі генетичні наслідки тривалого надходження нуклідів, що проявляються генотоксичною дією на статеві клітини, погіршенням показників відтворення, якості потомства у щурів та мишей у 4–5 поколіннях або повною стерильністю тварин наступних поколінь [5–10]. Питання про вплив постійного внутрішнього опромінювання на генетичні структури статевих клітин залишається відкритим. Вважають, що при одноразовому введенні радіонуклідів генетичні uszkodження мають місце лише у постмейотичних клітинах [11], тобто uszkodжені клітини не проходять мейотичного відбору. У зв'язку з посиленням екологічного преса на населення територій, забруднених радіонуклідами, більше значення має дія хронічного внутрішнього опромінювання у діапазоні малих доз на сперматогенний епітелій. Саме тому метою нашого дослідження було вивчення наслідків для потомства низькопотужного комбінованого (внутрішнього та зовнішнього) опромінювання самців-батьків протягом 2 циклів сперматогенезу.

## Методика дослідження

Самці щурів лінії Вістар віком 3,5–4 міс. та масою 160–180 г були розподілені на 4 групи батьківського покоління ( $P_0$ ):  $P_0$ -контроль,  $P_0$ - $D_1$ ,  $P_0$ - $D_2$  та  $P_0$ - $D_3$ , по 10 тварин у кожній. Протягом 4 міс. (до парування з неопроміненими самками) піддослідні тварини (крім контрольної групи) перебували під дією хронічного зовнішнього та внутрішнього опромінювання різної потужності. Далі тварин  $P_0$  було забито для вивчення показників спермограм та спектрорадіометрії. Самці першого покоління ( $F_1$ , 69 щурів) з груп  $F_1(P_0$ -контроль),  $F_1(P_0$ - $D_1$ ),  $F_1(P_0$ - $D_2$ ) та  $F_1(P_0$ - $D_3$ ) перебували в умовах нормального радіаційного фону або додатково опромінювалися з 4-го по 9-й місяці життя. У них ви-

вчали життєздатність протягом 1-го місяця життя та сперматологічні показники у 9-місячному віці.

Внутрішнє опромінювання моделювали за допомогою радіоактивної води з басейну-барботера 4-го блока ЧАЕС (яку використовували як питну). Її питома сумарна гамма-активність за сумою ізотопів цезію становила для групи  $P_0$ - $D_1$  —  $(1,51 \pm 0,2)S10^5$ ,  $P_0$ - $D_2$  —  $(1,6 \pm 0,35)S10^4$ ,  $P_0$ - $D_3$  і всіх груп опромінених потомків —  $(2,3 \pm 0,2)S10^3$  Бк/кг. Активність радіоактивно забрудненого корму (продукти із Зони відчуження) за  $^{137}\text{Cs}$  сягала  $(2,8 \pm 0,2)S10^3$ , за  $^{90}\text{Sr}^{90}\text{Y}$  —  $(0,16 \pm 0,03)S10^3$  Бк/кг. Контрольні групи тварин, утримуваних у «чистому» віварії (гамма-фон не вище 18 мкР/год), одержували чисті повноцінні гранульовані корми та питну воду.

При паруванні самців на 8 діб підсаджували до інтактних самок у співвідношенні 1: 3–4. У тварин  $F_1$  життєздатність оцінювали за кількістю живих щуренят в гнізді на 30-й день життя, підготовку та оцінку препаратів для світлової мікроскопії сперматозоїдів проводили згідно з [12].

Вміст ізотопів цезію оцінювали спектрорадіометрично у м'язах та кістках тварин  $P_0$  і опромінених тварин  $F_1$  з використанням напівпровідникового детектора ДГДК-140В з лінійкою фірми «NOKIA» та аналізатора «AFORA». Стронцій у кістках визначали радіохемічним методом після попереднього концентрування (озолення).

Сумарні поглинені дози (СПД) розраховували, складаючи внески зовнішнього та внутрішнього опромінювання.

Оцінку поглиненої дози (ПД) від зовнішнього та взаємного опромінювання (гамма-фон віварію та взаємоопромінювання щурів) проводили, користуючись величинами потужності дози у 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  $P_0$  —  $D_1$  —  $(0,60 \pm 0,10)$ , для  $P_0$  —  $D_2$  —  $(0,35 \pm 0,07)$ ,  $P_0$  —  $D_3$  —  $(0,25 \pm 0,05)$  мкГр/год.

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

Статистичну обробку результатів проводили стандартними методами варіаційної статистики. При обробці спермограм використовували об'єднані дані лівого та правого епідидимусів. Вірогідність розбіжностей оцінювали за t-критерієм Стьюдента [13]. Розрахунки здійснювали за допомогою пакета програм «Excel 7.0».

## Результати та їх обговорення

Шляхом інтегрування складових усіх видів опромінювання було знайдено, що за 4 міс. сумарні ПД на все тіло самців щурів при мінімальному радіоактивному забрудненні води сягали  $0,4 \pm 0,18$ , а при найбільшому —  $3,6 \pm 0,7$  сГр (табл. 1). Такого режиму опромінювання було достатньо для помітних змін процесу сперматогенезу у піддослідних тварин. Треба зазначити, що за час досліду (4 міс.) у щурів  $P_0$  відбулося більше 2 циклів сперматогенезу, тобто

вивчалися гамети, які утворилися зі стовбурових сперматогоніїв, що вже зазнали певного радіаційного впливу, а мейотичний поділ та сперматогенез також проходили за постійного слабого радіаційного навантаження. При цьому ми спостерігали значне збільшення концентрації сперматозоїдів в усіх групах (табл. 2). Рівень вірогідності розбіжностей з групою  $P_0$ -контроль для  $P_0-D_1$  та  $P_0-D_2$  становив  $p < 0,05$ , а для  $P_0-D_3$  —  $0,05 < p < 0,1$ . Аналогічну активацію проліферації сперматогенного епітелію, яку вважають проявом компенсаторної реакції на тривале внутрішнє опромінювання, відмічали при введенні собакам розчину  $^{90}\text{Sr}$ , коли поглинена доза на скелет сягала 50–80 рад [5, 14]. У нашому досліді ми не знайшли змін у рухливості сперматозоїдів, але при всіх режимах опромінювання зростала кількість морфологічно неповноцінних клітин, серед яких переважали гамети з патологією хвоста.

У піддослідних щурів зберігалася здатність до відтворення. При паруванні з інтактними самками  $F_1(P_0$  — контроль) народилося  $8,6 \pm 0,4$  щуреняти, у групах  $F_1(P_0-D_1)$ ,  $F_1(P_0-D_2)$  і  $F_1(P_0-D_3)$  відповідно по  $9,1 \pm 1,0$ ;  $8,4 \pm 0,7$  та  $8,4 \pm 0,8$ . Життєздатність потомства залежала від дозового навантаження батьків. Так, на 30-й день життя в групах  $F_1(P_0$  — контроль) та  $F_1(P_0-D_3)$  на 1 самку, що лактує, було живих відповідно  $7,2 \pm 0,3$  та  $6,4 \pm 1,4$  тваринки ( $p < 0,05$ ), тоді як у групах  $F_1(P_0-D_1)$  і  $F_1(P_0-D_2)$  —  $5,0 \pm 1,3$  та  $5,6 \pm 0,9$  ( $p < 0,05$ ). З огляду на те, що виживання потомства у 1-й місяць розглядається як інтегральний показник дії радіації на статеві клітини самців [15], зменшення жит-

Таблиця 1 — Величини сумарних поглинених доз у самців-плідників ( $P_0$ ) під час парування та у їх потомків ( $F_1$ ) ( $n=10$ ,  $M \pm m$ )  
Total absorbed dose in male rats ( $P_0$ ) at mating and in their offsprings ( $F_1$ ) ( $n=10$ ,  $M \pm m$ )

Група тварин	Сумарна поглинена доза на все тіло (сГр)
$P_0-D_1$	$3,6 \pm 0,70$
$P_0-D_2$	$0,7 \pm 0,30$
$P_0-D_3$	$0,4 \pm 0,18$
$F_1$ -Контроль	$0,4 \pm 0,18$
$F_1-D_1$	$0,4 \pm 0,23$
$F_1-D_2$	$0,4 \pm 0,15$
$F_1-D_3$	$0,4 \pm 0,20$

тєздатності щуренят вказує на деякий генотоксичний вплив опромінювання з ПД 3,6 та 0,7 сГр (за 4 міс.) і, можливо, виникнення у потомства домінантних напівлєтєлей.

У потомків груп  $F_1(P_0$  — контроль) та  $F_1(P_0-D_3)$  у віці 9 міс. концентрація та рухливість сперматозоїдів була звичайною для цієї лінії щурів (табл. 3). Але у тварин груп  $F_1(P_0-D_1)$  та  $F_1(P_0-D_2)$ , батьки яких за 4 міс. опромінювання одержали ПД 3,6 та 0,7 сГр, концентрація гамет (хоч і без змін у рухливості та морфології клітин) вказує на уроджені порушення регуляції сперматогенезу.

Для оцінки радіочутливості потомства було застосовано низькопотужне іонізувальне випромінєння. Результати табл. 4 показують, що і в цьому разі простєжуєтьсє деяка залежність відповіді у щурів  $F_1$  від дозового навантаження батьків. Так, при додатковому опромінюванні з ПД близько 0,4 сГр, яка утворилася за 4 міс. досліді (див. табл. 1), у потомків контрольних щурів та самців із найменшим та середнім дозовим навантаженням сперматогенез був на контрольному рівні. У разі більшої ПД батьків ( $P_0-D_1$ ) у їх потомків при опромінюванні ще більше зменшувалася концентрація сперматозоїдів (приблизно на 17%,  $p < 0,05$ ) порівняно з їх неопроміненними сібсами. Спермограми потомків усіх груп (відсоток рухливих та морфологічно повноцінних клітин) якісно майже не відрізнялися від контрольних.

Таким чином, отримані результати свідчать, що генотоксична дія тривалого низькопотужного опромінювання під час утворення гамет із стовбурових сперматогоніїв (що вже були опромінені) і подальшої диференціяції та дозрівання сперматозоїдів виявляється при більшій поглиненій дозі

Таблиця 2 — Спермограма щурів батьківського покоління, яких опромінювали протягом 4 місяців ( $n=10$ ,  $M \pm m$ )  
Spermogram of parent rats irradiated for 4 month ( $n = 10$ ,  $M \pm m$ )

Група	Концентрація (млн/мл)	Рухливість (%)	Патологічні форми (%)
$P_0$ -Контроль	$19,4 \pm 2,3$	$41,0 \pm 6,4$	$29,4 \pm 2,6$
$P_0-D_1$	$30,5 \pm 3,0^*$	$40,4 \pm 3,3$	$40,0 \pm 0,6^*$
$P_0-D_2$	$45,7 \pm 4,7^*$	$50,4 \pm 4,2$	$53,3 \pm 2,0^*$
$P_0-D_3$	$46,3 \pm 12,1^\circ$	$43,3 \pm 3,2$	$54,7 \pm 7,1^*$

Примітка. \* —  $p < 0,05$  ( $^\circ$  —  $0,05 < p < 0,1$ ) — рівні вірогідності розбіжностей з контрольною групою.

Таблиця 3 — Параметри спермограми щурів  
покоління  $F_1$  ( $n$ ,  $M \pm m$ )  
Sperm parameters in  $F_1$  ( $n$ ,  $M \pm m$ )

Група	Концентрація (млн/мл)	Рухливість (%)	Патологічні форми (%)
$F_1(P_0\text{-Контроль})$	41 19,2±0,5	14 45,1±2,9	10 33,4±5,8
$F_1(P_0\text{-D}_1)$	37 16,3±0,6*	14 62,4±3,8*	9 29,4±3,3
$F_1(P_0\text{-D}_2)$	27 15,6±0,6*	11 56,3±5,0*	8 30,2±1,8
$F_1(P_0\text{-D}_3)$	40 17,5±1,6	15 42,0±2,5	15 31,5±1,1

Примітка. \* — вірогідні розбіжності з контрольною групою.

Таблиця 4 — Параметри спермограми щурів  
покоління  $F_1$  після додаткового опромінювання  
( $n$ ,  $M \pm m$ )  
Sperm parameters in  $F_1$  after additional irradiation  
( $n$ ,  $M \pm m$ )

Група	Концентрація (млн/мл)	Рухливість (%)	Патологічні форми (%)
$F_1(P_0\text{-Контроль})$ + опромінювання	56 20,1±0,4	13 55,0±6,0	10 27,5±1,9
$F_1(P_0\text{-D}_1)$ + опромінювання	14 13,6±0,9***	8 71,0±6,5	8 28,0±3,5
$F_1(P_0\text{-D}_2)$ + опромінювання	49 18,0±0,5***	12 65,0±4,8	8 38,9±6,6
$F_1(P_0\text{-D}_3)$ + опромінювання	22 19,0±0,9**	6 62,5±4,0**	6 36,8±8,1

Примітка. \* — вірогідні розбіжності з контролем;  
\*\* — з «чистими» сібсами.

(0,7 сГр), ніж у разі опромінювання тільки постмейотичних клітин (потрібна доза близько 0,24 сГр (див. попереднє повідомлення), що збігається з уявленням про більшу генетичну радіорезистентність премейотичних клітин. За нашими спостереженнями, перебіг процесу сперматогенезу цілком в умовах тривалого низькопотужного опромінювання тварин має важчі генетичні наслідки для їх потомства (олігозооспермія у неопромінених тварин  $F_1$ ) у разі такого ж опромінювання постмейотичних клітин (збільшення частки патологічних форм на фоні нормозооспермії). У зв'язку з тим, що генетична радіочутливість гамет різного рівня зрілості залежить від багатьох причин, у тому числі й інтенсивності роботи систем репарації, використання препаратів з адаптогенною дією може бути перспективним для посилення генетичної радіорезистентності клітин.

## Висновки

1. Опромінювання щурів батьківського покоління протягом 4 міс. з ПД у межах

0,7–3,6 сГр призводить до неповноцінного посилення сперматогенезу (підвищення відсотка патологічних форм) та дає генотоксичний ефект.

2. Потомство  $F_1$  опромінених батьків має ознаки уроджених порушень регуляції сперматогенезу (олігозооспермії).

Щури  $F_1$ , батьки яких одержали ПД 3,6 та 0,7 сГр, чутливіші до дії іонізуючого випромінювання і на додаткове радіаційне навантаження реагують підвищенням ступеня існуючої олігозооспермії.

## Література

1. Шевченко В.А., Померанцева М.Д. Генетические последствия действия ионизирующих излучений. — М.: Наука, 1985. — 279 с.
2. Внешняя среда и развивающийся организм. — М.: Наука, 1977. — 384 с.
3. Лягинская А.М., Осипов В.А., Дементьев С.И.: Тез. докл. 3-го съезда по радиац. исслед. (Москва, 14–17 окт. 1997 г.) — Пуццино, 1997. — Т.1. — С. 446–447.
4. Ветух В.А., Малаховский В.Н. // Радиобиол. — 1991. — Т.31, № 3. — С. 302–310.
5. Бурыкина Л.Н., Рыикова Н.Н., Титова Л.А. и др. Распределение и биологическое действие радиоактивных изотопов / Под ред. Ю.И. Москалева. — М.: Атомиздат, 1966. — С. 295–313.
6. Шевцов В.Л., Корытный В.С. // Там же. — С. 408–417.
7. Сирацький Й.З., Рясенко Є.М., Масицька О.О. та ін. Вплив зовнішнього та внутрішнього опромінювання на репродуктивну та травну систему норки. — К.: ТОВ «Міжнародна фінансова агенція», 1998. — 149 с.
8. Померанцева М.Д., Тестов Б.В., Рамайя Л.К. и др. // Цитол. и генет. — 1990. — Т.24, № 4. — С. 46–51.
9. Столина М.Р., Соломко А.П., Малюта С.С. и др. // Чернобыль-94: Сб. докл. IV междунар. науч.-техн. конф. (Зеленый Мыс, 1994). — Чернобыль, 1996. — Т. 2. — С. 322–327.
10. Индик В.М., Серкіз Я.І., Данко І.М., Алістратов О.В. та ін. : Тез. докл. Междунар. науч.-техн. конф. «Чернобыль-96» (Зеленый Мыс, 8–12 марта 1996 г.) — Чернобыль, 1996. — Т. 2. — С. 451.
11. Shevchenko V.A., Ramaya L.K., Pomerantseva M.D., Lyaginskaya A.M., Dementiev S.I. // Mutat. Res. — 1989. — Vol.226, № 2. — P. 87–91.
12. Методические указания по изучению эмбриотоксического действия фармакологических веществ и влияния их на репродуктивную функцию. — М.: Фармакол. комитет МЗ СССР, 1986. — 27 с.
13. Каминский Л.С. Статистическая обработка лабораторных и клинических данных — 2-е изд. — Л.: Медицина, 1964. — 251 с.
14. Москалев Ю.И. Отдаленные последствия воздействия ионизирующих излучений. — М.: Медицина, 1991. — 464 с.
15. Nefyodov I., Nefyodova I., Palyga G. // Contr. papers of Intern. Confer. «Low doses of ionizing radiation: biological effects and regulatory control» (Seville, Spain, 17–21 Novemb. 1997) — IAEA, 1997. — P.293–297.

Дата надходження: 14.03.2000.

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